

Entwicklung und Charakterisierung von neuen Liganden des
nukleären Rezeptors TLX

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Giuseppe Faudone
aus Frankfurt am Main

Frankfurt (2022)

(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec

Prof. PD. Dr. Daniel Merk

Datum der Disputation :

Für meine lieben Eltern

Inhalt

1	Einleitung zu nukleären Rezeptoren	1
1.1	Allgemein	1
1.2	Einteilung	1
1.3	Struktur und Funktion von nukleären Rezeptoren.....	3
1.3.1	Strukturelle Merkmale	3
1.3.2	Funktionale Mechanismen von nukleären Rezeptoren	9
1.3.2.1	Nukleäre Rezeptoren als Mono-, Homo- und Heterodimere.....	9
1.3.2.2	Interaktionen zwischen Ligandenbindedomäne und Coregulatoren.....	12
1.3.2.3	Coaktivatoren und Corepressoren zur Transkriptionsregulation.....	16
2	Nukleärer Rezeptor TLX.....	18
2.1	Allgemein	18
2.2	Physiologische Funktion	19
2.3	Struktur und Funktion	20
2.3.1	Strukturelle Merkmale	20
2.3.2	Funktion.....	22
2.4	Liganden des nukleären Rezeptors TLX.....	23
3	Zielsetzung.....	28
4	Ergebnisse und Diskussion	30
4.1	Etablierung orthogonaler Reporterassays zur Untersuchung der TLX- Ligandenbindedomäne	30
4.1.1	Allgemeine Einführung in den Gal4-Reporterassay zur universalen Charakterisierung von nukleären Rezeptoren	30
4.1.2	Gal4-TLX als Transkriptionsrepressor.....	34
4.1.3	Verwendung von Gal4-VP16 als Transkriptionsaktivator zur Detektionserweiterung	39
4.1.4	Mutagenese von Gal4-TLX zur Identifizierung einer potentiellen Ligandenbindungstasche.....	42
4.1.5	Heterodimerisierung von Gal4-TLX und VP16-RXR α	44
4.1.6	TLX als Transkriptionsaktivator im Volllängenformat	46
4.1.7	Übersicht der etablierten TLX-Reporterassays	47
4.1.8	Definition von TLX-Agonisten/Antagonisten und inversen TLX-Agonisten	49
4.2	Validierung literaturbekannter Referenzliganden	52
4.3	Screening einer Wirkstofffragmentbibliothek.....	53
4.4	Screening diverser Wirkstoffe	60

4.5	Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Xanthinderivaten	64
4.5.1	Methylierte Xanthinderivate als inverse TLX-Agonisten.....	64
4.5.2	Untersuchung von Purin- und Pyrimidinderivaten	70
4.5.3	8-Phenyltheophyllin als neue Leitstruktur	75
4.5.4	Xanthine als Adenosinrezeptorantagonisten und Phosphodiesteraseinhibitoren	78
4.5.5	Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von 8-Phenyltheophyllin	80
4.6	Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Propranolol	111
4.7	Design neuartiger TLX-Modulatoren anhand eines ligandenbasierten Pharmakophormodells	130
4.8	Scaffold Hopping und kombinatorische Chemie	147
5	Zusammenfassung, Ausblick und Diskussion	162
5.1	Zusammenfassung und Ausblick	162
5.2	Diskussion	173
6	Experimenteller Teil	177
6.1	Biochemische und biophysikalische Methoden	177
6.1.1	Kultivierung von HEK293T- und T98G-Zellen	177
6.1.2	Plasmidkonstrukte.....	177
6.1.3	Plasmidamplifikation und Aufreinigung.....	179
6.1.4	Gal4-basierte Reporterassays in HEK293T-Zellen	179
6.1.4.1	Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay-Etablierung und Durchführung zur Charakterisierung von TLX-Liganden	179
6.1.4.2	Reporterassay-Durchführung zur Untersuchung von Gal4-TLX in Kombination mit diversen Gal4-NRs	181
6.1.4.3	Reporterassaydurchführung zur Untersuchung der VP16-RXR α /Gal4-TLX- Heterodimer-vermittelten Reportermodulation.....	181
6.1.4.4	Gal4-NR-Reporterassay-Durchführung zur Untersuchung des NR- Selektivitätsprofil	182
6.1.5	Reporterassay-Durchführung zur Untersuchung des TLX-Volllängenproteins	182
6.1.6	Durchführung der rekombinanten TLX-LBD-Proteinexpression	183
6.1.7	Expression der rekombinanten RXR α - und TLX-Fusionsproteine	183
6.1.8	Homogene zeitaufgelöste Fluoreszenzresonanz-Energietransferassays.....	185
6.1.8.1	TLX-Coregulatorscreening	185
6.1.8.2	TLX-Coregulator-Affinitätsassay	186
6.1.8.3	TLX-Dimerisierungsassays.....	187

6.1.9	Differentielle Scanning Fluorimetrie Experimente	187
6.1.10	Isotherme Titrationskalorimetrie	188
6.1.11	Untersuchung der Protein-Ligand-Interaktion mittels ¹ H-NMR- Spektroskopie	189
6.1.12	Untersuchung der relativen mRNA-Level über qPCR in T98G-Zellen	190
6.1.13	Proliferationsassay mittels Kristallviolettfärbung in T98G-Zellen.....	191
6.1.14	Viabilitätsassay mittels WST-Reagenzes in HEK293T-Zellen.....	192
6.1.15	Viabilitätsassay mittels WST-Reagenzes in T98G-Zellen.....	192
6.1.16	Viabilitätsassay mittels LDH in T98G-Zellen	193
6.1.17	Direkter Migrationsassay mittels Boyden-Kammer in T98G-Zellen.....	194
6.1.18	Apoptoseassay in T98G-Zellen	195
6.1.19	Bestimmung der metabolischen Stabilität.....	195
6.1.20	Löslichkeitsabschätzung durch Absorptionsmessung.....	196
6.1.21	Wasserlöslichkeitsbestimmung.....	196
6.2	Design des Pharmakophormodells.....	197
6.3	Chemisch-synthetischer Teil.....	197
6.3.1	Kombinatorische Chemie	259
7	Anhang.....	261
8	Abkürzungsverzeichnis	271
9	Abbildungsverzeichnis.....	275
10	Tabellenverzeichnis	282
11	Schemaverzeichnis	284
12	Anhangverzeichnis	285
13	Literaturverzeichnis.....	286
14	Danksagung	312
15	Eidesstaatliche Erklärung	314
16	Curriculum Vitae.....	315
17	Publikationsliste	318
18	Kooperationspartner	319
19	Copyrights.....	321

1 Einleitung zu nukleären Rezeptoren

1.1 Allgemein

Nukleäre Rezeptoren (NRs) repräsentieren als intrazelluläre Rezeptoren eine große Proteinfamilie, deren erste Entdeckung mit der Bindung von Estradiol an einem damals noch unbekanntem Steroidhormonrezeptor bis in die 1960er Jahre zurückgeht¹. Knapp 20 Jahre später gelang die erste Klonierung eines NRs anhand des Glucocorticoidrezeptors^{2,3}. Seitdem wurde diese Proteinfamilie exzessiv studiert und bietet zahlreiche vielversprechende Wirkstofftargets⁴. Grund dafür ist die Funktion nukleärer Rezeptoren als ligandenmodulierbare Transkriptionsfaktoren, die dazu in der Lage sind chemische Signale durch die Erkennung kleiner endogener organischer Moleküle wie Steroide (Glucocorticoide, Androgene, Östrogene, Progesterone und Mineralocorticoide), Retinsäuren, Vitamin D und Thyroidhormone in eine zelluläre Antwort zu überführen⁵. Aktuell sind insgesamt 48 humane NRs bekannt, die in einer Vielzahl biologischer und physiologischer Vorgänge - wie metabolische, homöostatische und Entwicklungsprozesse - involviert sind⁶. Aufgrund der komplexen und vielfältigen genregulatorischen Funktionen von NRs vermutet man ihren Ursprung bereits in sehr frühen Stadien der evolutionsbiologischen Geschichte und tatsächlich wird die Identifizierung erster Vorfahren nukleärer Rezeptoren in vielzelligen, primitiven Organismen auf bis vor 700 Millionen Jahren datiert⁷.

Aus pharmazeutisch-therapeutischer Sicht gibt es zahlreiche zugelassene, an NRs angreifende Arzneistoffe, die sowohl zur Behandlung metabolischer Erkrankungen wie Fettleibigkeit, Diabetes mellitus, Dyslipidämien, koronarer Herzerkrankung, Atherosklerose etc. als auch zur Therapie neurologischer Fehlfunktionen Anwendung finden⁸. Außerdem spielen NRs zunehmend eine wichtigere Rolle bei der Behandlung von Krebserkrankungen⁹. Aus diesen Gründen ist die Erforschung von NRs immer von besonderem Interesse, da noch umfangreiches, unentdecktes Potential in ihnen als Wirkstofftarget verborgen ist.

1.2 Einteilung

Die 48 humanen NRs können basierend auf einer Initiative des *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification* (NC-IUPHAR) anhand ihrer Sequenzidentität der zwei konserviertesten Strukturen (DNA-Bindedomäne, engl. *DNA-binding domain*, DBD und Ligandenbindedomäne, engl. *ligand-binding domain*,

Einleitung zu nukleären Rezeptoren

LBD) in sechs Subfamilien unterteilt werden (siehe Tabelle 1). NRs, die eine der zuvor genannten konservierten Strukturen nicht enthalten, fallen definitionsgemäß in eine separate Gruppe (Subfamilie O)¹⁰. Für zahlreiche NRs sind die endogenen Liganden bekannt, allerdings gibt es auch noch viele NRs, deren endogene Liganden noch unbekannt sind. Diese Rezeptoren werden auch als Waisenrezeptoren (engl. *orphan receptor*) bezeichnet¹¹.

Tabelle 1: Familie der nukleären Rezeptoren (NR). Die NRs sind mit entsprechender englischer Bezeichnung und Abkürzung und der internationalen anerkannten Nomenklatur in ihren jeweiligen Subgruppen (0-6) und den dazugehörigen endogenen Liganden zusammengefasst. NRs ohne beschriebene endogene Liganden sind als Waisenrezeptoren aufzufassen.

Familie	Name	Abkürzung	Nomenklatur	Liganden
0B	dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, Gene 1	DAX1	NR0B1	-
	small heterodimeric partner	SHP	NR0B2	-
1A	thyroid hormone receptor α	THR α	NR1A1	Thyroidhormone
	thyroid hormone receptor β	THR β	NR1A2	Thyroidhormone
1B	retinoic acid receptor α	RAR α	NR1B1	Retinsäuren
	retinoic acid receptor β	RAR β	NR1B2	Retinsäuren
	retinoic acid receptor γ	RAR γ	NR1B3	Retinsäuren
1C	peroxisome proliferator-activated receptor α	PPAR α	NR1C1	Fettsäuren
	peroxisome proliferator-activated receptor β/δ	PPAR β/δ	NR1C2	Fettsäuren
	peroxisome proliferator-activated receptor γ	PPAR γ	NR1C3	Fettsäuren
1D	reverse-Erb α	REV-ERB α	NR1D1	Häm
	reverse-Erb β	REV-ERB β	NR1D2	Häm
1F	retinoic acid-related orphan receptor α	ROR α	NR1F1	Sterole
	retinoic acid-related orphan receptor β	ROR β	NR1F2	Sterole
	retinoic acid-related orphan receptor γ	ROR γ	NR1F3	Sterole
1H	liver X receptor α	LXR α	NR1H3	Oxysterole
	liver X receptor β	LXR β	NR1H2	Oxysterole
	farnesoid X receptor	FXR α	NR1H4	Gallensäuren
	farnesoid X receptor β ¹	FXR β	NR1H5	-
1I	vitamin D receptor	VDR	NR1I1	1 α ,25-dihydroxyvitamin D3
	pregnane X receptor	PXR	NR1I2	Endobiotika und Xenobiotika
	constitutive androstane receptor	CAR	NR1I3	Xenobiotika
2A	hepatocyte nuclear factor-4 α	HNF4 α	NR2A1	Fettsäuren
	hepatocyte nuclear factor-4 γ	HNF4 γ	NR2A2	Fettsäuren
2B	retinoid X receptor α	RXR α	NR2B1	9- <i>cis</i> -Retinsäure
	retinoid X receptor β	RXR β	NR2B2	9- <i>cis</i> -Retinsäure
	retinoid X receptor γ	RXR γ	NR2B3	9- <i>cis</i> -Retinsäure
2C	testicular receptor 2	TR2	NR2C1	-
	testicular receptor 4	TR4	NR2C2	-

¹ FXR β stellt beim Menschen ein Pseudogen dar.

Einleitung zu nukleären Rezeptoren

2E	tailless homolog orphan receptor	TLX	NR2E1	-
	photoreceptor-cell-specific nuclear receptor	PNR	NR2E3	-
2F	chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor α	COUP-TF α	NR2F1	-
	chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor β	COUP-TF β	NR2F2	-
	chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor γ	COUP-TF γ	NR2F6	-
3A	estrogen receptor α	ER α	NR3A1	Östrogene
	estrogen receptor β	ER β	NR3A2	Östrogene
3B	estrogen-related receptor α	ERR α	NR3B1	-
	estrogen-related receptor β	ERR β	NR3B2	-
	estrogen-related receptor γ	ERR γ	NR3B3	-
3C	glucocorticoid receptor	GR	NR3C1	Glucocorticoide
	mineralocorticoid receptor	MR	NR3C2	Glucocorticoide und Mineralocorticoide
	progesterone receptor	PR	NR3C3	Progesterone
	androgen receptor	AR	NR3C4	Androgene
4A	nerve growth factor 1B	NGF1-B	NR4A1	ungesättigte Fettsäuren
	nurr-related factor 1	NURR1	NR4A2	-
	neuron-derived orphan receptor 1	NOR-1	NR4A3	-
5A	steroidogenic factor 1	SF-1	NR5A1	Phospholipide
	liver receptor homolog-1	LRH-1	NR5A2	Phospholipide
6A	germ cell nuclear factor	GCNF	NR6A1	-

1.3 Struktur und Funktion von nukleären Rezeptoren

1.3.1 Strukturelle Merkmale

Bis auf einige wenige Ausnahmen weisen NRs eine gemeinsame Struktur auf, die - vom N-terminalen bis zum C-terminalen Ende - in sechs Domänen (A-F) unterteilt werden kann (siehe Abbildung 1).



Abbildung 1: Allgemeine Struktur von nukleären Rezeptoren (NR). Einteilung der Primärstruktur in sechs Domänen A-F. Hierbei ist A/B: N-terminale Domäne inklusive der ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion 1 (engl. *ligand-independent activation function 1*, AF-1); C: DNA-Bindedomäne (engl. *DNA-binding domain*, DBD); D: flexibles Verbindungsstück (engl. *hinge region*); E: Ligandenbindedomäne (engl. *ligand-binding domain*, LBD) inklusive der ligandenabhängigen Aktivierungsfunktion 2 (engl. *ligand-dependent activation function 2*, AF-2); F: unkonservierte Struktur¹².

Beginnend am N-Terminus (A/B) stellt die N-terminale Domäne (engl. *N-terminal domain*, NTD) eine verhältnismäßige ungeordnete und wenig konservierte Struktur dar. Aufgrund dieser intrinsischen Eigenschaft ist die strukturelle Aufklärung sehr beschränkt. Außerdem enthält die NTD eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (engl. *ligand-independent activation function 1*, AF-1), die durch Wechselwirkung mit einer Vielzahl kleiner Copeptide eine induzierte Proteinfaltung der NTD bewirkt¹³. Hierbei können sich Sekundärstrukturmodule wie α -Helices und β -Faltblätter bilden und zu einer Konformationsstabilisierung der NTD führen, die wiederum große Auswirkungen auf die Transkriptionsaktivität hat¹⁴. Darüber hinaus stellt die NTD eine Region dar, die durch posttranslationale Modifikationen (engl. *posttranslational modifications*, PTM) - wie Acetylierungs-, Phosphorylierungs-, SUMOylierungs- (engl. *small ubiquitin-related modifier*, SUMO) und Ubiquitinierungsprozesse - adressiert werden kann^{15,16}. Diese PTMs stellen einen wichtigen Modulationsmechanismus von NRs dar, der mit zahlreichen Krebs- und chronisch-entzündlichen Erkrankungen assoziiert ist. So konnte gezeigt werden, dass über den PI3K/Akt-Signalweg (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K; engl. *v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene*, Akt) die Androgenrezeptor-vermittelte Expression von p21 (engl. *cyclin dependent kinase*, CDK oder p21) inhibiert wird und dieser Mechanismus in Prostatakrebszellen negativ gekoppelt ist^{17,18}. Eine übermäßige Acetylierung des Androgenrezeptors führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Koaktivatoren, welche sich positiv auf das Wachstum von Prostatakrebszellen auswirkt¹⁹. Zahlreiche, ähnliche Zusammenhänge sind auch für weitere NR-Subtypen bekannt und zeigen die Bedeutung dieses Strukturmotivs für die Funktion von NRs auf²⁰⁻²².

Die DNA-Bindedomäne (engl. *DNA-binding domain*, DBD), deren Kernstück aus ca. 66 Aminosäuren besteht, stellt die konservierteste Struktur von NRs dar¹². Als Ausnahmen sind hier die Mitglieder der Subgruppe 0, *dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome Gene 1* (DAX1) und *small heterodimeric partner* (SHP) zu nennen. Beide NRs besitzen im Vergleich zu den restlichen NRs keine konservierte DBD^{23,24}. Die wesentliche Aufgabe der DBD besteht darin, entsprechende genregulatorische Sequenzen - auch als Hormonantwortelemente (engl. *hormone response element*, HRE) bekannt - zu erkennen und zu binden und NRs in die räumliche Nähe des Zielgens zu bringen. Die DBD kann grob in folgende Regionen unterteilt werden: N-terminaler Zinkfinger I, P-Box,

Einleitung zu nukleären Rezeptoren

D-Box, C-terminaler Zinkfinger II und die carboxyterminale Erweiterung (engl. *carboxyterminal extension*, CTE) bestehend aus einer A- und T-Box (siehe Abbildung 2).

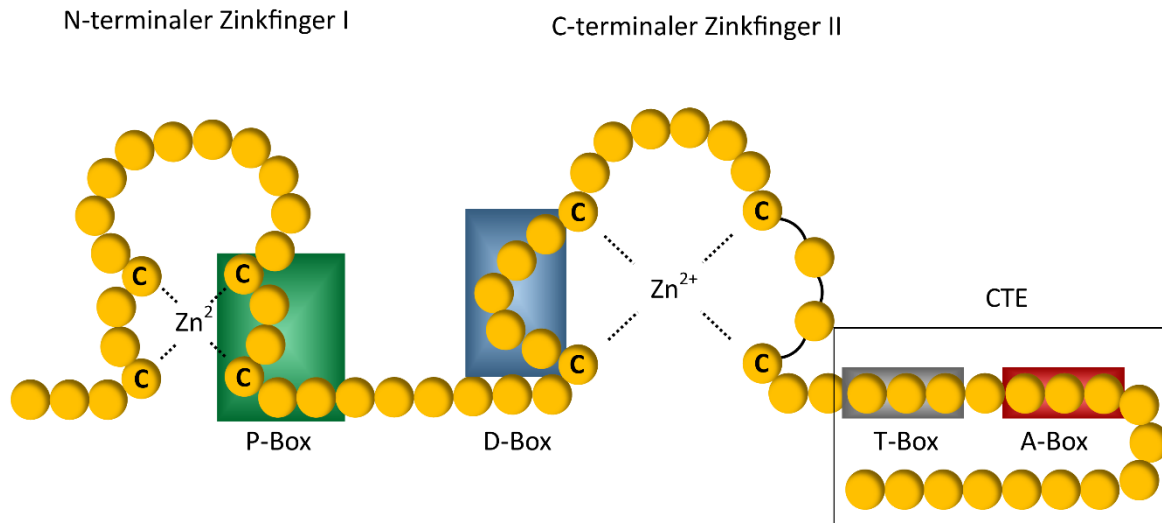


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der DNA-Bindedomäne (engl. *DNA-binding domain*, DBD). Zusätzlich ist die carboxyterminale Erweiterung (engl. *carboxyterminal extension*, CTE), die bis in das flexible Verbindungsstück (engl. *hinge region*) reicht (nach Gronemeyer et al.²⁵) abgebildet. P-Box (grün), D-Box (blau), T-Box (grau) und A-Box (rot) sind als Sequenzmotive farblich hervorgehoben.

Um die Interaktion der DBD mit den entsprechenden HREs zu gewährleisten, enthält die DBD zwei Zinkfingerstrukturen. Jedes einzelne Zinkfingermotiv entsteht hierbei durch die Koordinierung eines Zn^{2+} -Ions durch vier Cystein Aminosäuren in einer tetraedrischen Anordnung (siehe Abbildung 3)^{11,25}.

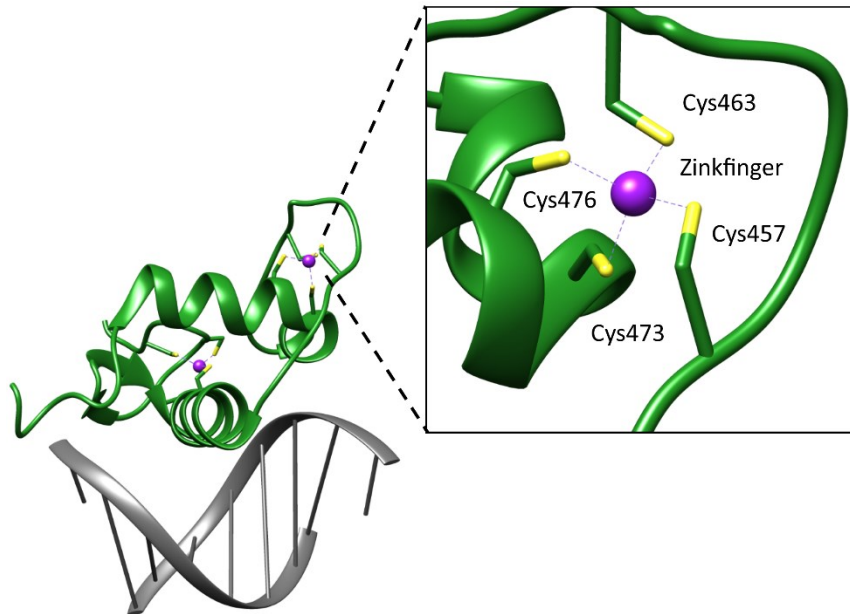


Abbildung 3: Darstellung einer monomeren DBD-Einheit (engl. *DNA-binding domain*, DBD) des Glucocorticoidrezeptors an einem kurzsträngigen HRE (engl. *hormone response element*, HRE). Die DBD (grün) interagiert über die große Furche des HREs (grau) und die Zn^{2+} -Ionen (lila) bilden über eine tetraedrische Koordinierung mittels vier Cystein Aminosäuren (gelb) die Zinkfinger (pdb-Eintrag: 3FYL).

Jeder Zinkfinger ist von jeweils zwei amphiphatischen α -Helices umgeben, die sich in einem 90° Winkel zueinander in ihrer Mitte schneiden. Die erste Helix stellt hierbei die Erkennungshelix (engl. *reading head*) dar, welche mit Hilfe eines ausgeprägten Wasserstoffbrückennetzwerks Basensequenz-spezifische Interaktionen mit der großen Furche (engl. *major groove*) der Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) ermöglicht^{26,27}. Die P-Box - eine Abfolge von zwei bis drei Aminosäuren - stellt ein Motiv dar, welches eine präzise Unterscheidung zum Beispiel zwischen dem GR-HRE und dem ER-HRE ermöglicht und damit für die selektive Erkennung des entsprechenden HREs verantwortlich ist^{28,29}. Die D-Box - eine Abfolge von fünf Aminosäuren - erfüllt eine Dimerisierungsfunktion³⁰. Die zweite Helix interagiert nur durch eine schwache unspezifische Wechselwirkung mit der DNA^{26,27}. Ähnlich zur NTD sind Kinase-vermittelte Phosphorylierungen im Sinne einer PTM bekannt (A-Box in HNF4 α)³¹. Hierbei kann die Bindungsaffinität der DBD durch die Einführung einer negativen Ladung, die sich repulsiv zum negativ geladenen DNA-Rückgrat auswirkt, vermindert und die transkriptionelle Aktivität des NRs somit reduziert werden^{12,31}. Darüber hinaus fungiert eine wenig konservierte carboxyterminale Erweiterung (engl. *carboxyterminal extension*, CTE) als wichtiges Motiv für eine spezifische und erhöhte Bindungsaffinität zum HRE^{32,33}. Die CTE gewährleistet durch Wechselwirkung mit der kleinen Furche, welche über

die kanonischen hexameren Sequenzen hinausgeht, eine Erweiterung der Protein-DNA-Interaktionsoberfläche³⁴. Mit Hilfe der A/T-Boxen können einige NRs im ungebundenen Zustand eine α -Helix ausbilden, die aber durch Deformierung der 3D-Struktur additive nicht-spezifische Wechselwirkungen mit der DNA ermöglicht und somit die Bindungsaffinität zum HRE erhöht^{35,36}. Außerdem trägt die CTE durch sterischen Anspruch am HRE zur selektiven Erkennung von RXR-NR-Heterodimeren bei³⁷. In anderen NRs wie ERR2 besitzt die CTE in der A/T-Region eine eher flexible ungeordnete Struktur, die ebenfalls mit einer erhöhten Bindungsaffinität von monomeren NRs verbunden ist^{38,39}.

Der Bereich D (siehe Abbildung 1) - die am wenigsten konservierte Struktur über alle NRs - fungiert als kurzes flexibles Gelenkstück (engl. *hinge region*), das die DBD mit der LBD verbindet¹². Für den ER ist gezeigt worden, dass diese Region essentiell für die synergistische Wirkung zwischen der AF-1 und AF-2 der LBD ist⁴⁰. Zusätzlich enthält diese Region Lokalisationssignale, die die zelluläre Distribution der NRs steuern⁴¹. Auch für diese Domäne sind beispielsweise für RAR α modulierbare Transkriptionsaktivitäten in Abhängigkeit von PTMs (Phosphorylierungen) bekannt⁴².

Region E (siehe Abbildung 1) stellt die Ligandenbindedomäne (engl. *ligand-binding domain*, LBD) dar. Sie besteht typischerweise aus zwölf α -Helices, zum Teil zwei β -Faltblättern und mehreren Schleifenregionen, die in der Gesamtheit ein antiparalleles α -helicales Sandwich bilden⁴³ (siehe Abbildung 4).

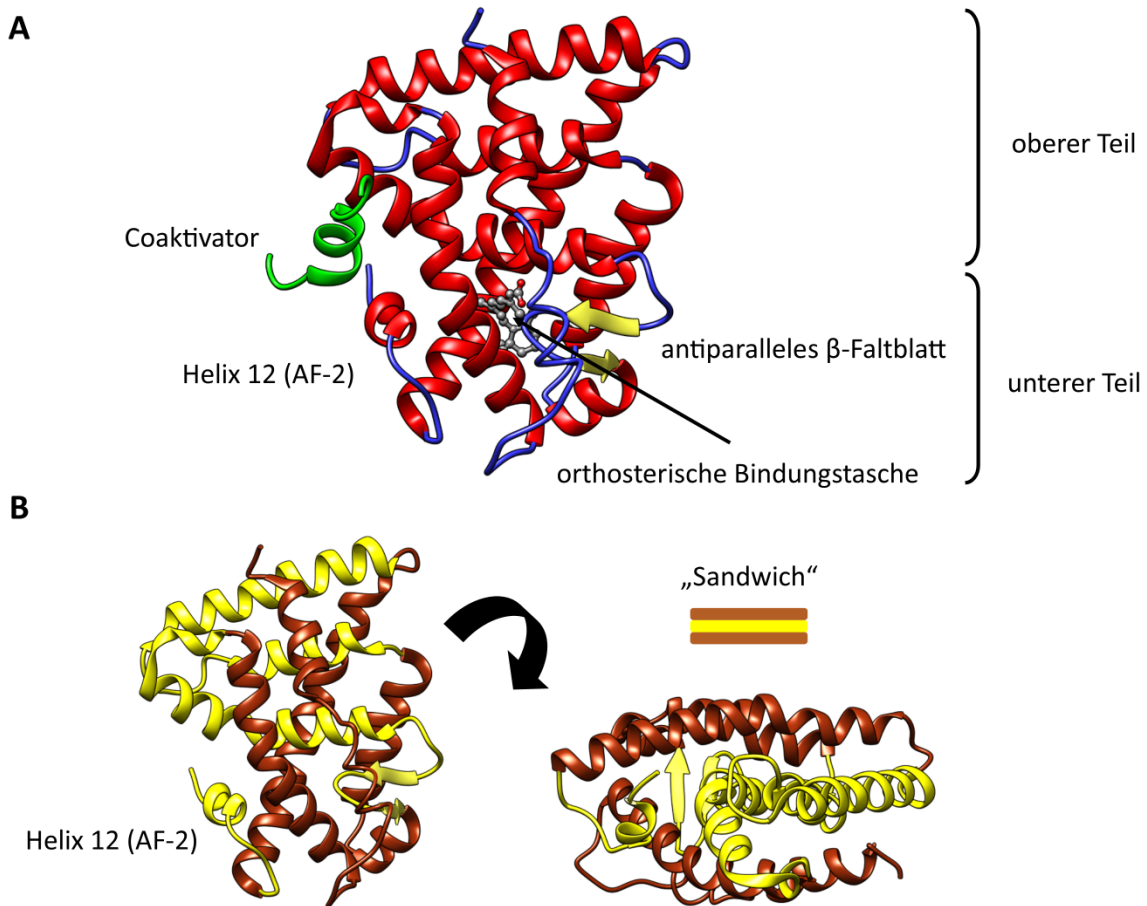


Abbildung 4: Darstellung der kanonischen Ligandenbindedomäne (engl. *ligand-binding domain*, LBD). **A**) Cokristall von RXR α mit dem Steroidrezeptor-Coaktivator-2 (grün, engl. *steroid receptor coactivator 2*, SRC-2) und mit 9-*cis*-Retinsäure (grau) gebunden in der orthosterischen Bindungstasche. Zwölf α -Helices (rot), zwei β -Faltblätter (gelb) und Schleifenstrukturen (blau) bilden die Tertiärstruktur der LBD (pdb-Eintrag: 1XLS). **B**) Struktur aus **A** wurde um 90° gedreht und die Sekundärstrukturelemente entsprechend markiert (braun und gelb), um die Sandwichstruktur hervorzuheben.

Als multifunktionale Domäne ist die LBD in der Lage mit Hilfe einer hydrophoben Ligandenbindungstasche (engl. *ligand-binding pocket*, LBP) kleine organische Moleküle zu erkennen. Zudem ermöglicht sie über ihre Oberfläche die Homo- bzw. Heterodimerisierung mit anderen NRs und vermittelt zusätzlich die Interaktion zu einer großen Anzahl an Coregulatoren⁴⁴.

Die kanonische orthosterische LBP von NRs besitzt eine äußerst variable Größe von 0-1500 Å³⁴⁵. Aufgrund der Diversität der LBP - sowohl in Größe als auch in der Struktur - können NRs ein breites Spektrum an Liganden erkennen. Sowohl NMR-Untersuchungen (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) als auch kristallographische Analysen belegen, dass der obere Teil der LBD starrer im Vergleich zum unteren Teil der LBD ist (siehe Abbildung 4 A)^{46,47}.

Das weitaus wichtigste Motiv der LBD stellt Helix 12 dar, welche auch als Aktivierungsfunktion-2 (engl. *activation function 2*, AF-2) bekannt ist. Die AF-2 bildet mit Hilfe der Helices 3 und 4 eine zusätzliche hydrophobe Tasche, die als Interaktionsoberfläche mit weiteren Coregulatoren fungiert⁴⁸. Ähnlich wie zu den vorher genannten Regionen unterliegt auch die LBD PTMs. So wird beispielsweise die FXR-regulierte Zielgenexpression durch einen Proteinkinase C *zeta* (PKC ζ)-abhängigen Phosphorylierungsschritt aktiviert, indem durch Phosphorylierung an Thr-442 die Translokation von FXR in den Zellkern begünstigt wird⁴⁹. Eine andere Studie belegt, dass durch SUMOylierung der PPAR γ -LBD eine verstärkte Rekrutierung von NCoR (engl. *nuclear receptor corepressor*, NCoR) und HDAC3 (engl. *histone deacetylase-3*, HDAC3) stattfindet, sodass eine transrepressive Wirkung pro-inflammatorischer Gene erfolgt⁵⁰.

Die C-terminale Region F (siehe Abbildung 1) ist aufgrund hoher Sequenzvariabilität sowohl strukturell als auch funktional verhältnismäßig wenig verstanden. Eine Kristallstrukturaufklärung der PR-LBD hat gezeigt, dass Region F eine β -Faltblattstruktur annimmt, welche mit der Dimerisierungsoberfläche zwischen PR und RXR schwache hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen eingeht⁵¹. In ER α haben computergestützte Sekundärstrukturberechnungen zusätzlich eine α -Helix vorherhergesagt und anhand von Mutagenesestudien bewiesen, dass die F-Domäne eine wichtige Rolle in der Sensitivität bezüglich der Ligandenerkennung spielt⁵². Außerdem konnte im Fall von HNF-4 α bestätigt werden, dass die F-Domäne an der Interaktionsvermittlung zwischen LBD und Coregulator beteiligt ist⁵³.

1.3.2 Funktionale Mechanismen von nukleären Rezeptoren

1.3.2.1 Nukleäre Rezeptoren als Mono-, Homo- und Heterodimere

Die vollständige Entfaltung der biologischen Wirkung von NRs erfolgt über ein komplexes, dynamisches Gleichgewicht, das auf DNA-Bindung, NR-Dimerisierung und Coregulatorrekrutierung basiert. Wie oben beschrieben erfolgt die Interaktion von NRs mit der DNA über spezifische Erkennungssequenzen, sogenannten Hormonantwortelementen (engl. *hormon response element*, HRE). Typischerweise handelt es sich bei der Mehrheit der HREs um die Anordnung von zwei hexameren Sequenzen, welche von 0-5 Nukleotiden getrennt werden. Zwar herrscht hier eine gewisse Sequenzvariabilität, die wiederum für die spezifische Erkennung der jeweiligen Rezeptorsubtypen verantwortlich ist, allerdings haben

Einleitung zu nukleären Rezeptoren

sich die Sequenzmotive 5'-AGAACA-3' und 5'-AGGTCA-3' als konservierte Konsensus-Sequenzen manifestiert²⁶. Darüber hinaus trägt die Länge der Basenabfolge (engl. *spacer*), die die hexameren Konsensus-Sequenzen räumlich trennt, zur selektiven Erkennung der NR-Dimere bei. Die hexameren Konsensus-Sequenzen können hierbei durch unterschiedliche Symmetriekonstitution als direkte Wiederholungen (engl. *direct repeat*, DR), invertierte Wiederholungen (engl. *inverted repeat*, IR) oder Palindrome vorliegen (siehe Abbildung 5)¹².

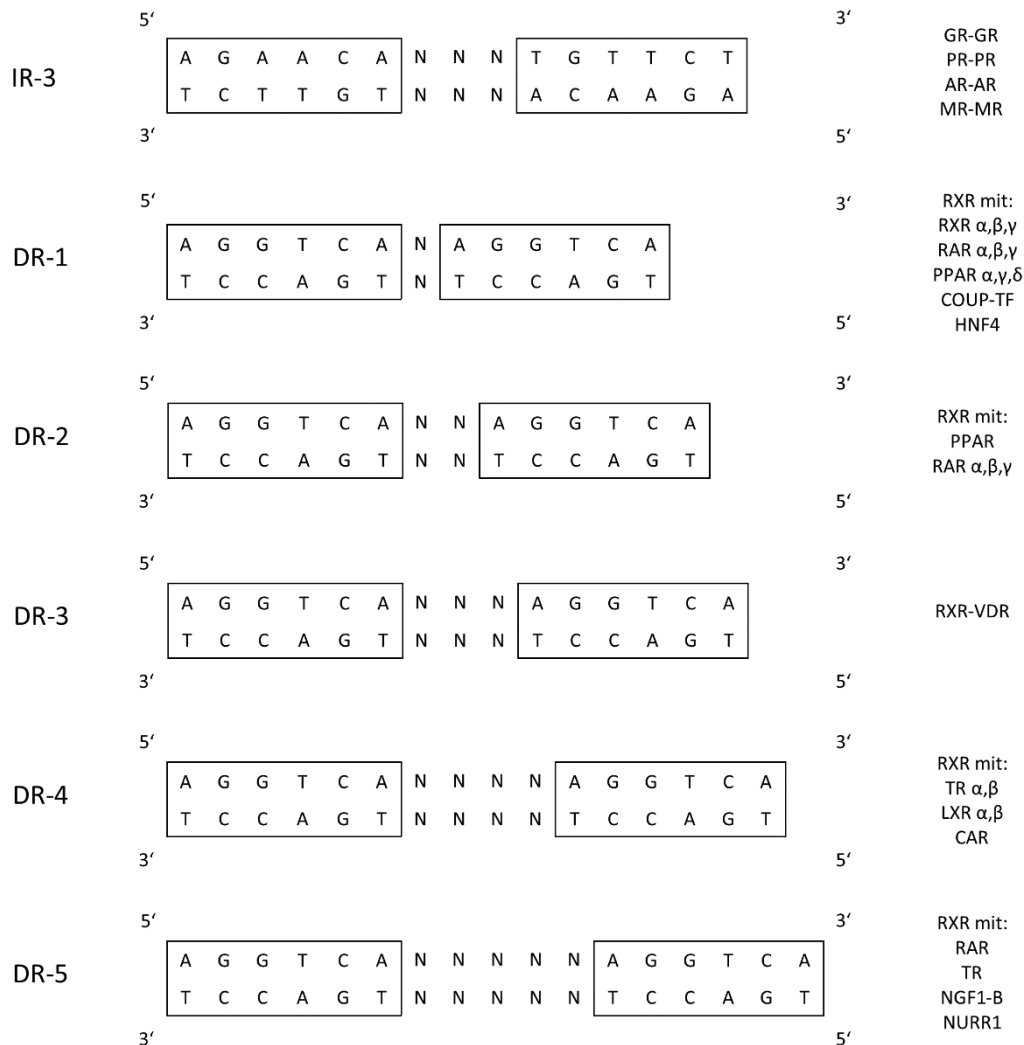


Abbildung 5: Schematische Darstellung der kanonischen Hormonantwortelemente (engl. *hormon response element*, HRE). Abgebildet ist eine invertierte Wiederholung (engl. *inverted repeat*, IR) mit drei beliebigen Nukleotiden (N = 3) als typische Erkennungssequenz von homodimeren Steroidhormonrezeptoren. Direkte Wiederholungen (engl. *direct repeat*, DR) werden von RXR-Heterodimeren nach der „1,2,3,4,5-Regel“ (N = 1-5) selektiv in Abhängigkeit des jeweiligen Heterodimerpartners erkannt^{12,54}.

Klassischerweise binden Steroidhormonrezeptoren als Homodimere an IR-3 Elementen, nachdem sie sich durch Ligandenbindung von Chaperonen befreit haben und anschließend in

den Zellkern diffundiert sind (Gruppe I, siehe Abbildung 6 A). Die restlichen NRs bilden häufig Heterodimere mit RXR und binden in Abhängigkeit der Spacersequenzlänge (auch als „1-2-3-4-5“ Regel bekannt) die jeweiligen HREs, welche DR-1 bis DR-5 Sequenzmotive sein können (Gruppe II, siehe Abbildung 6 B)^{55,56}. Zusätzlich spielt die RXR-Bindungsposition am 5'- oder 3'-Ende der hexameren Sequenzwiederholungen eine bedeutende Rolle für die transkriptionelle Aktivität des Heterodimers. So besetzt RXR an DR-2 und DR-5 Elementen das 5'-Ende der hexameren Konsensus-Sequenz und RAR dementsprechend das 3'-Ende. Diese Anordnung ist an DR-1 Elementen umgekehrt, sodass als Konsequenz RAR-Agonisten in dieser Konformation keine transkriptionelle Antwort hervorrufen, weil überwiegend Corepressoren (NCoR) - bedingt durch die DR-Geometrie - rekrutiert werden¹². Des Weiteren lassen sich RXR-NR-Heterodimere in permissive und nicht-permissive RXR-Heterodimere unterteilen. Während permissive RXR-Heterodimere (PPARs, LXRs und FXR) durch einen der Agonisten eines jeweiligen Heterodimerpartners aktivierbar sind, können nicht-permissive RXR-Heterodimere (RARs und VDR) nur durch die Anwesenheit eines Agonisten des Partners aktiviert werden⁵⁷. Hierbei ist zu erwähnen, dass permissive Rezeptorpaare durch die Anwesenheit der jeweiligen Agonisten pro Partner eine synergistische biologische Antwort im Vergleich zur alleinigen Bindung eines einzigen Agonisten aufweisen^{58,59}. Neben den RXR-Heterodimeren können an DR-Elementen auch Homodimere binden, welche überwiegend Waisenrezeptoren betreffen (Gruppe III, siehe Abbildung 6 C)⁶⁰.

Neben den zahlreichen dimeren Bindungsmodi können NRs auch als monomere Einheiten entsprechende HREs erkennen (Gruppe IV, siehe Abbildung 6 D). In diesem Zusammenhang bindet beispielsweise Nurr1 als Monomer ein 5'-AGGTCA-3' Sequenzmotiv, dem eine Adenin/Thymin-reiche Sequenz in 5'-Richtung vorgeschaltet ist⁶¹.

Zusammenfassend kann man also die NR-Familie neben ihrer phylogenetischen Gruppierung (Kapitel 1.2) ebenfalls anhand ihrer Dimerisierungsmodi einteilen (siehe Abbildung 6).

Einleitung zu nukleären Rezeptoren

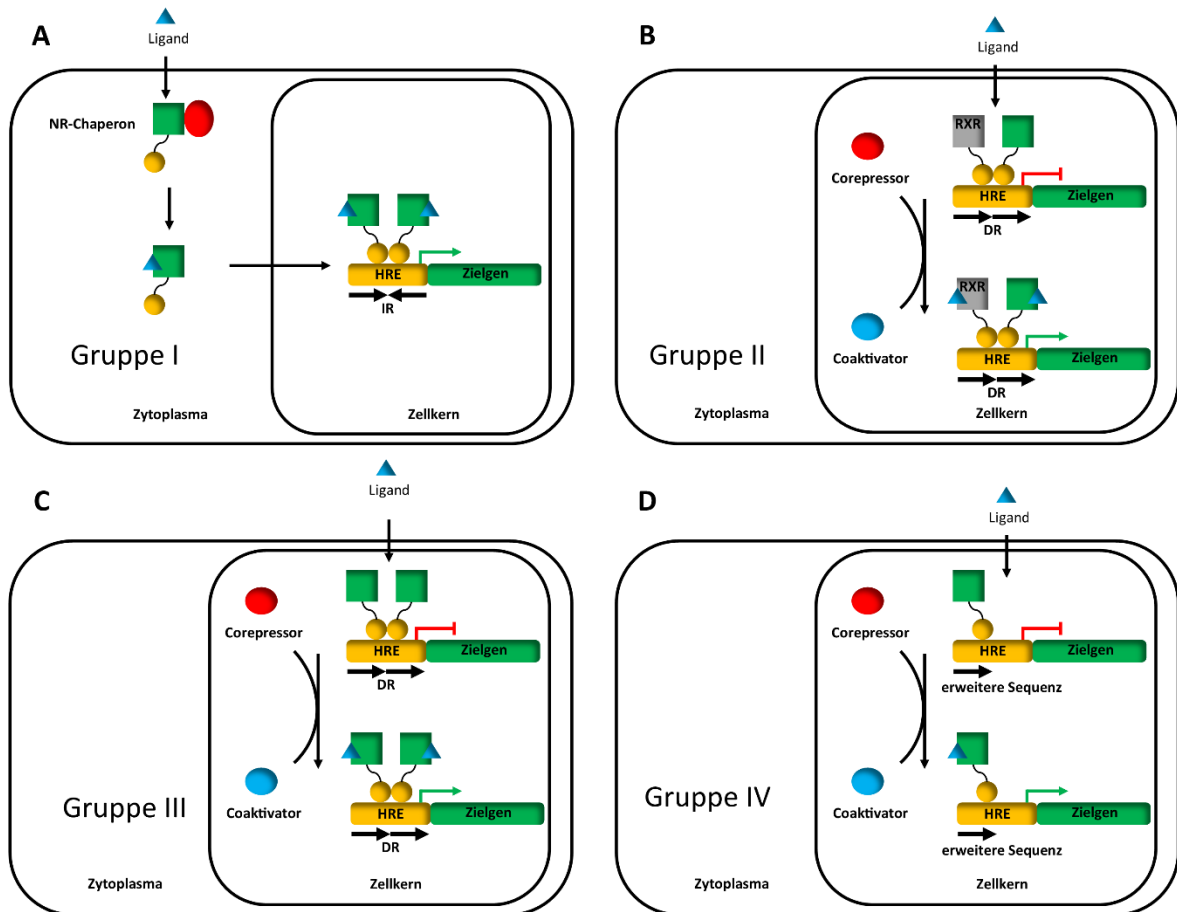


Abbildung 6: Einteilung der nukleären Rezeptoren (NR) anhand ihrer Dimerisierungseigenschaft. Gruppe I: Nach Ligandenbindung werden Steroidhormonrezeptoren (SHR) von Chaperonen (rot) befreit und diffundieren in den Zellkern. Dort binden SHRs als Homodimere an invertierte Wiederholungssequenzen (engl. *inverted repeat*, IR); Gruppe II: RXR-Heterodimere binden an direkte Wiederholungssequenzen (engl. *direct repeat*, DR); Gruppe III: Waisenrezeptoren binden als Homodimere an DR-Elementen; Gruppe IV: Waisenrezeptoren binden als Monomere an erweiterten Sequenzen¹¹.

1.3.2.2 Interaktionen zwischen Ligandenbindedomäne und Coregulatoren

Bindet ein NR mit Hilfe der entsprechenden DBD an das jeweilige HRE und bringt somit die gesamte multifunktionale Oberfläche des NR in die räumliche Nähe des zu regulierenden Zielgens, erfolgt die tatsächliche biologische Antwort über einige charakteristische und wesentliche Grundzüge. Prinzipiell unterscheidet man die Steroidhormonrezeptoren (SHR) von der RXR-Heterodimerrezeptorfamilie. Für SHRs gilt, dass sie sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern in Komplexen mit Chaperonen vorzufinden und somit nicht am entsprechenden HRE gebunden sind. Die übrigen NRs liegen hingegen bereits im Zellkern an den jeweiligen HREs mit Corepressoren gebunden vor und führen somit bereits in apo-Form zur aktiven Unterdrückung der Genexpression.

Einleitung zu nukleären Rezeptoren

Nach Ligandenbindung befreien sich SHRs von den Chaperonen und diffundieren in den Zellkern, sodass eine Bindung am HRE erfolgen kann und die Genregulation über eine weitere Coregulatorrekrutierung stattfindet^{44,62}. Für Mitglieder der RXR-Heterodimerrezeptorfamilie erfolgt nach Ligandenbindung eine konformationelle Änderung der AF-2 Funktion in Helix 12, die den reaktionsbestimmenden Schritt darstellt. Hierbei wurde lange das „Mausfalle-Model“ vertreten, welches aus dem Strukturvergleich von holo/apo-RXR α - und RAR γ -Kristallen abgeleitet wurde⁶³. Dieses postuliert, dass Helix 12 zum Teil in einer ungeordneten Struktur in der apo-Form parallel und relativ abseits zur Helix 3 steht. Erfolgt die Ligandenbindung klappt Helix 12 ähnlich wie in einer Mausfalle um, sodass sie in senkrechter relativer Orientierung zu Helix 3 steht (siehe Abbildung 7 A). Daneben existieren allerdings auch NRs (z.B LRH-1), die in Abwesenheit von Liganden eine intrinsische transkriptionelle Aktivität aufweisen, was sich strukturell dadurch auszeichnet, dass Helix 12 sowohl in apo- als auch in holo-Form eine aktivierte Konformation einnimmt (siehe Abbildung 7 B)¹¹.

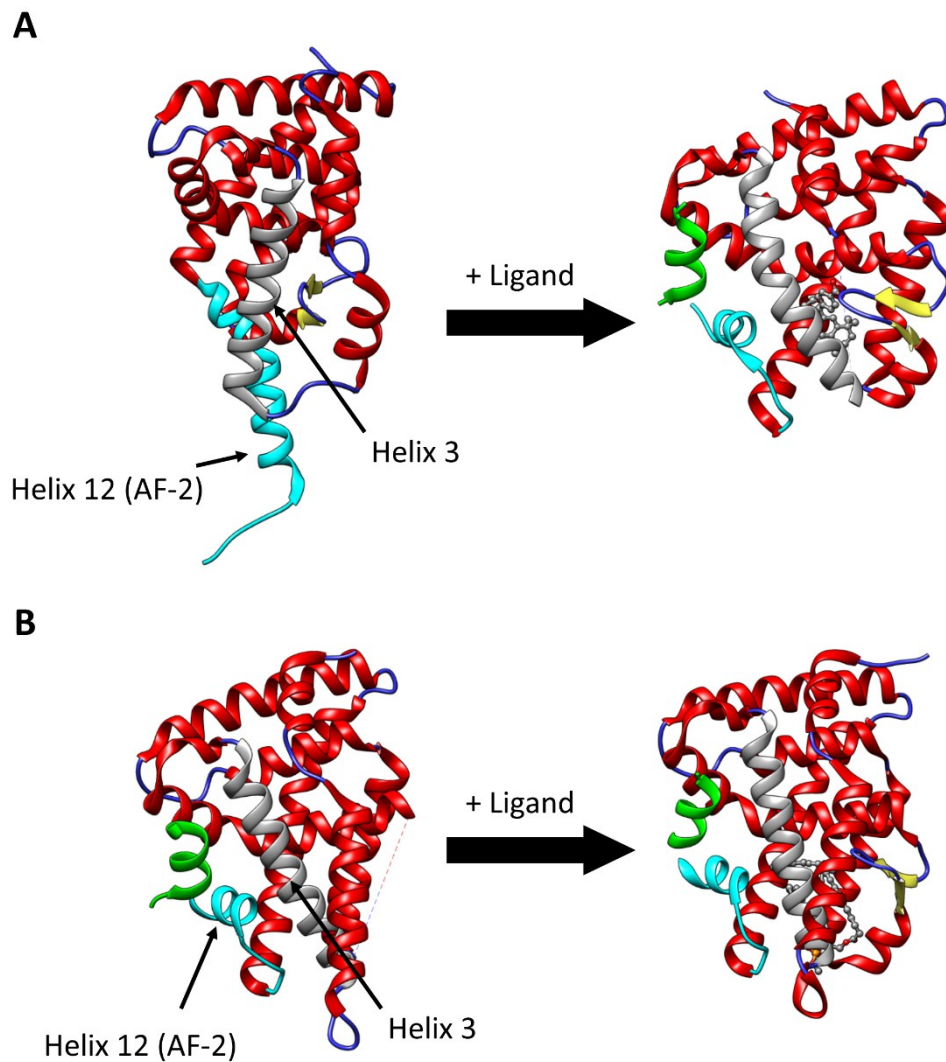


Abbildung 7: Darstellung des „Mausfalle-Modell“ durch Vergleich von apo- und holo-Kristallstrukturen. **A**) In apo-Form befindet sich Helix 12 (cyan) parallel zu Helix 3 (grau). Nach Ligandenbindung (grau) klappt Helix 12 um, sodass sie in orthogonaler Orientierung zu Helix 3 steht und ein Coaktivator (grün) rekrutiert werden kann (pdb-Einträge: apo-RXR α , 6HN6; holo-RXR α , 1MVC). **B**) Vor und nach Ligandenbindung besitzt Helix 12 von LRH-1 eine ähnliche relative Orientierung zu Helix 3 (pdb-Einträge: apo-LRH-1, 4DOR; holo-LRH-1, 4PLE)¹¹.

Die Orientierung von Helix 12 ermöglicht die Diskriminierung in der Rekrutierung zwischen Coaktivatoren und Corepressoren. Während die Rekrutierung von Coaktivatoren die NR-vermittelte Transkriptionsaktivität von Zielgenen begünstigt, tragen Corepressoren zu einer Transkriptionsrepression bei⁴⁵. Die Diskriminierung zwischen den α -helicalen Corepressoren und Coaktivatoren gelingt über kleine hoch konservierte Sequenzmotive, die die selektive Erkennung zwischen Coregulator und NR-LBDs vermitteln. Das kanonische Erkennungsmotiv für Coregulatoren wurde unter anderen NRs erstmals bei der Strukturaufklärung von PPAR γ

beobachtet. Hierbei hat man gezeigt, dass die Aminosäuresequenz LXXLL (L = Leucin, X = beliebige Aminosäure) die Konsensus-Sequenz über viele Coaktivatoren für NRs darstellt. Zusätzlich tragen die Ladungsträger Glutaminsäure (Helix 12 in AF-2) und Lysin (Helix 3) wie eine dipolartige Ladungsklammer zur exakten Positionierung des LXXLL-Motivs in eine hydrophobe Bindungstasche, die aus Helix 3, 4 und 12 gebildet wird, bei (siehe Abbildung 8)^{47,64}.

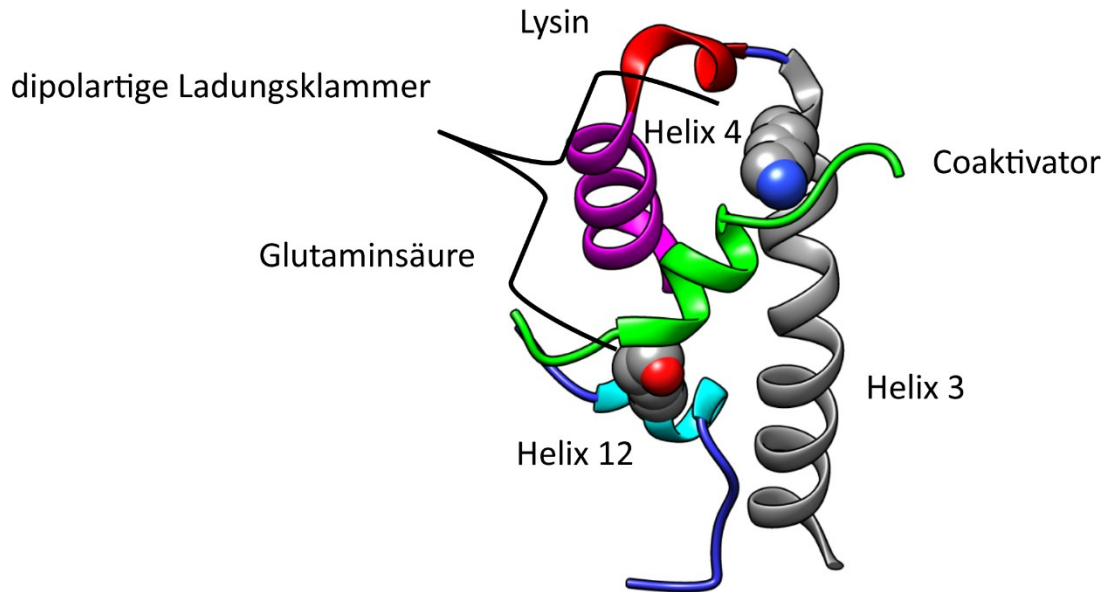


Abbildung 8: Darstellung der dipolartigen Ladungsklammer zur exakten Positionierung des Coaktivator LXXLL-Motivs (grün). Lysin (Helix 3) und Glutaminsäure (Helix 12) interagieren über ihre Ladungsträger mit den Enden des Coaktivatorpeptids, sodass schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit Helix 3 (grau), 4 (magenta) und 12 (cyan) eingegangen werden können (pdb-Eintrag: 1XLS).

Das „Mausfalle-Modell“ gilt jedoch als veraltet, daher wird aktuell das „dynamische Stabilisierungsmodell“ als zutreffenderes Bild diskutiert⁶⁵. Demnach befindet sich Helix 12 in ständiger dynamischer Bewegung, sodass ein NR in apo-Form ein Ensemble an Konformationen konstituiert und einen „quasi geschmolzenen“ Zustand widerspiegelt⁶⁶. Nach Ligandenbindung erfolgt die globale Stabilisierung der LBD, sodass Helix 12 bevorzugt in einer aktivierten Position vorliegt und eine Coaktivator-Bindungstasche bildet⁴⁵.

Die selektive Rekrutierung von Corepressoren hingegen findet unter Verwendung mehrerer konservierter Konsensus-Sequenzen statt, die beim Vergleich von NCoR (engl. *nuclear receptor corepressor*, NCoR) und SMRT (engl. *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors*, SMRT) festgestellt wurden. Hierbei haben sich (L/I)XX(I/V)I, LXXH/IIXXXL/I

und I/LXXII (I = Isoleucin, H = Histidin, V = Valin) als solche manifestiert. Die Bindungsstelle der Corepressoren überlappt mit der Bindungsstelle der Coaktivatoren, ist aber nicht identisch. Trotzdem kann anhand sterischer Gründe aufgrund unterschiedlicher Helixlängen selektiv differenziert werden, da die erweiterte Corepressor-Helix nicht durch die dipolartige Ladungsklammer stabilisiert werden kann, für die Helix 12 eine aktivierte Konformation einnehmen muss⁶⁷⁻⁶⁹.

1.3.2.3 Coaktivatoren und Corepressoren zur Transkriptionsregulation

Zusammen mit den Coregulatoren steuern NRs die Genexpression durch sogenannte Chromatin-Remodellierung. Allgemein fasst man unter Coaktivatoren eine große Gruppe von Proteinen zusammen, die in der Lage sind die Histonmodifikation durch Histonacetyltransferasen (engl. *histone acetyltransferases*, HAT) und Histonmethyltransferasen (engl. *histone methyltransferases*, HMT) zu alternieren. Durch Übertragung von Acetyl- und Methylresten an positiv geladenen Aminosäuren (überwiegend Lysin) der Histone wird die elektrostatische Anziehung zwischen dem negativ geladenen DNA-Rückgrat und der positiv geladenen Histonproteinstruktur reduziert, sodass die freigesetzte DNA, die ein Zielgen enthält, eine verbesserte Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie aufweist^{11,70}. Eine wichtige Coaktivatorklasse stellt die SWI/SNF-Proteinfamilie (engl. *mammalian homolog of Drosophila switch defective/sucrose non fermenter*, SWI/SNF) dar, die unter ATP-Verbrauch die Histon-DNA-Wechselwirkung vermindert^{71,72}. Außerdem wird angenommen, dass ein Coaktivator-Komplex aus Thyroidhormonrezeptor-assoziiierter-Proteine/Vitamin-D-Rezeptor-interagierender-Proteine/Aktivator-rekrutierender-Cofaktoren (engl. *thyroid hormone receptor-associated proteins/vitamin D receptor interacting protein/activator recruited cofactor*, TRAP/DRIP/ARC) über weitere Mediatoren die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an Promotoren verstärkt^{73,74}. Die weitaus wichtigste Coaktivatorklasse ist die p160-Familie. Allgemein beinhaltet die p160-Familie mit SRC 1-3 (engl. *steroid receptor coactivator 1-3*, SRC 1-3) drei Mitglieder, die als Coaktivator-Verbindungsglied die Rekrutierung von p300/CBP-assoziierten-Faktoren (engl. *p300/CBP-associated factor*, p/CAF), Protein-Arginin-Methyltransferasen-1 (engl. *protein arginine methyltransferase 1*, PRMT1) und die Coaktivator-assoziierte-Arginin-Methyltransferasen-1 (engl. *coactivator-associated arginine methyltransferase 1*, CARM1) katalysiert (siehe Abbildung 9 A)⁷⁵.

Einleitung zu nukleären Rezeptoren

Corepressoren hingegen fungieren über NCoR/SMRT nach Rekrutierung zusätzlicher Histondeacetylasen (engl. *histone deacetylase*, HDAC) in Komplexen mit Sin3 (engl. *transcriptional regulatory protein SIN3*, Sin3) in entgegengesetzter Weise und sorgen durch eine dichtere Chromatinpackung für eine unterdrückte Transkriptionsrate (siehe Abbildung 9 B)^{11,76}.

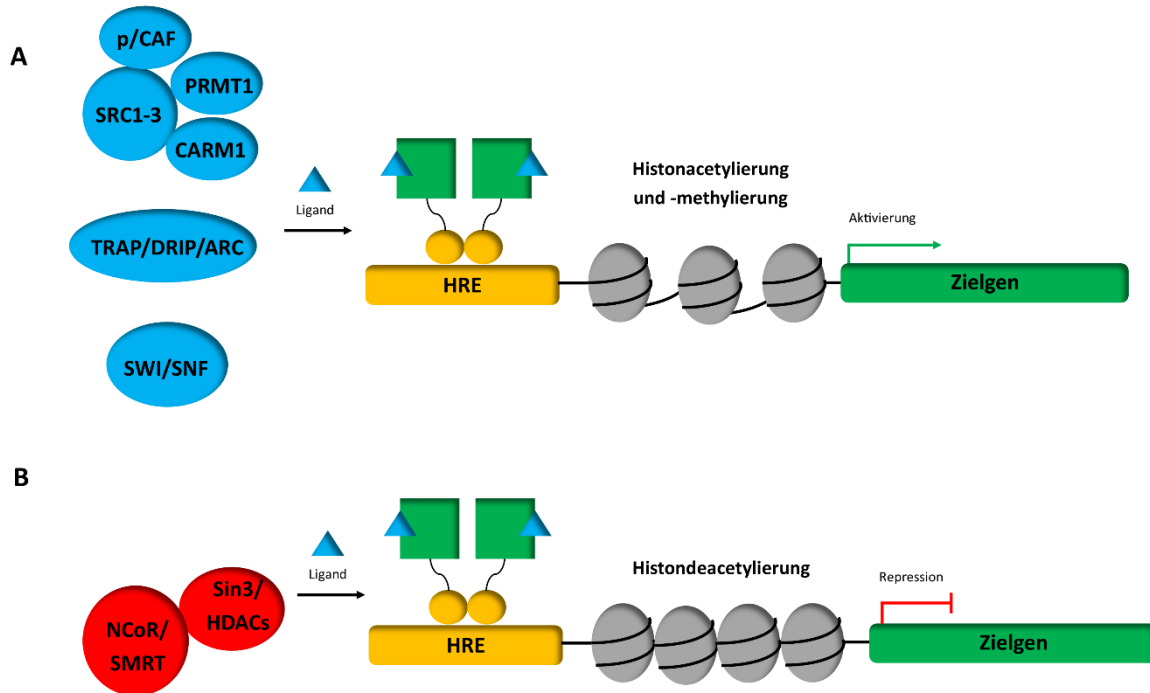


Abbildung 9: Transaktivierung und Transrepression von nukleären Rezeptoren (NR) entsprechender Zielgene. A) NR rekrutieren nach Bindung am Hormonantwortelement (engl. *hormone response element*, HRE) diverse Coaktivator-Komplexe zur Histonacetylierung und -methylierung, um die Transkription von Zielgenen zu aktivieren. B) NR rekrutieren nach Bindung am HRE diverse Corepressor-Komplexe mit einer Histondeacetylierungsfunktion zur Repression der Transkription^{11,45,77}.

2 Nukleärer Rezeptor TLX

2.1 Allgemein

Mitte der 80er Jahre wurde das Gen *tll* (engl. *tailless homolog*, *tll*) ursprünglich in einer Genmutationscreening-Kampagne als wichtiger Faktor für die Entwicklung der terminalen Kompartimente der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt⁷⁸. Nach langer Forschung in *Drosophila melanogaster* wurde *tll* die Funktion eines universellen Transkriptionsrepressors zugeschrieben, welcher überwiegend durch negative Regulation sogenannter Lückengene die Körpersegmentierung steuert⁷⁹. Aufgrund einer auffällig hohen Sequenzähnlichkeit zu charakteristischen NR-Domänen (DBD und LBD) wurde *tll* erstmals 1990 von Pignoni *et al.* als nukleärer Rezeptor klassifiziert⁸⁰. In der Literatur findet die Bezeichnung TLX (NR2E1) für das Säugetierhomolog und daher auch für die humane Form Anwendung. Der Sequenzvergleich zwischen *tll* und TLX hat gezeigt, dass die DBD mit 81 % und die LBD mit 41 % Sequenzidentität relativ gut konserviert sind. Daher liegt auch nahe, dass TLX eine ähnliche Funktion als Transkriptionsrepressor ausübt und tatsächlich hat eine ektopische TLX-Expression in *Drosophila melanogaster* Embryonen diese Hypothese bestätigt⁸¹.

Im Vergleich zu anderen NRs weist TLX ein verhältnismäßig limitiertes Expressionsmuster auf, das sich maßgeblich auf das Zentralnervensystem (ZNS) beschränkt. In Studien an Mäusen hat man gezeigt, dass die Expression von TLX im Gehirn ab Embryonaltag acht (E8) beginnt, ihren Höhepunkt an Embryonaltag 12,5 (E12,5) erreicht und ab Embryonaltag 13,5 (E13,5) sinkt. Darüber hinaus wird TLX während der Embryogenese auch in retinalen Vorläuferzellen exprimiert. Nach der Geburt ist TLX ausschließlich in adulten Gehirnarealen detektierbar, nämlich im *Gyrus dentatus* der subgranulären Zone (SGZ) und der subventrikulären Zone (SVZ)⁸²⁻⁸⁴. Interessanterweise stellen diese Bereiche den zentralen Ort dar, in dem neuronale Stammzellen (engl. *neuronal stem cells*, NSC) vorgefunden werden, die eine kontinuierliche Neurogenese gewährleisten⁸⁵. Zahlreiche Studien belegen, dass eine fehlerhafte TLX-Expression einen gravierenden Einfluss auf neurogenetisch-assoziierte Prozesse hat. Dazu gehören neben diversen Gewebemissbildungen (retinale Dystrophien, Mikrocephalien und Gehirntumorgenese) auch kognitive und mentale Verhaltensstörungen (siehe folgendes Kapitel).

2.2 Physiologische Funktion

In der Literatur wird TLX häufig als Hauptregulator der Neurogenese bezeichnet⁸⁶. Als solcher gewährleistet TLX ein Gleichgewicht zwischen undifferenzierten, proliferierenden NSCs und ausdifferenzierten Neuronen^{87,88}. Dies erfolgt durch eine negative Genregulation bestimmter Tumorsuppressoren wie p21 und das Phosphatase und Tensinhomolog (engl. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN) sowie durch eine positive Genregulation von MASH1 (engl. *achaete-scute homolog 1*, ASCL1 oder MASH1)^{88,89}. So konnte in Gehirnen von Mäusen während der Entwicklung von NSCs durch einen TLX-Knockout eine verringerte Anzahl Nestin-positiver Vorläuferzellen detektiert werden. Als mögliche Ursache wurde eine einhergehende p21 Überexpression diskutiert, die zu einem verlängerten Zellzyklus bzw. Zellzykluswiedereintritt führt⁹⁰. Ebenfalls bestätigte eine weitere Untersuchung eines TLX-Knockdowns in adulten NSCs von Mäusen den vollständigen Verlust der Selbsterneuerung von NSCs in der SVZ⁹¹. Eine weitere Studie in AHPs (engl. *adult rat hippocampus-derived progenitors*, AHP) konnte zeigen, dass durch eine positive TLX-vermittelte MASH1 Aktivierung die neuronale Differenzierung stimuliert wird⁸⁸. Auch in der Entwicklung des visuellen Systems übernimmt TLX eine tragende Rolle. So konnten durch TLX-Knockouts starke visuelle Beeinträchtigungen in Mäusen durch Degeneration der Retina und des optischen Sehnervs nachgewiesen werden, in denen das TLX-Zielgen Pax2 (engl. *paired box gene 2*, Pax2) involviert ist^{92,93}. Des Weiteren beweisen verschiedene Mausstudien den Einfluss von TLX auf kognitive, motorische und angstbezogene Verhaltensmuster⁹⁴. So bewirkte die Deletion von TLX neben einer allgemeinen geringeren Körpergröße im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auch ein vermindertes Wachstum und Entwicklung des Gehirns sowie des Riechkolbens. Verhaltenstechnisch zeigten Mäuse eine erhöhte Aggressionsbereitschaft, einen reduzierten Mutter-Kind-Instinkt (weibliche Mäuse) und verschiedene motorische Störungen⁹⁵. Gleichzeitig wiesen adoleszente Mäuse eine beeinträchtigte Angstkonditionierung mit einhergehender Hyperaktivität auf⁹⁶. Einige dieser Defizite konnten durch ektope TLX-Expression in transgenen Mäusen wieder verbessert werden^{97,98}. Darüber hinaus wird TLX ebenfalls als ein Schlüsselfaktor in der Pathologie der bipolaren Störung und Schizophrenie angesehen⁹⁹.

Zudem kann sich eine fehlerhafte TLX-Expression auch als eine maligne Form in Gehirntumorstammzellen (engl. *brain tumor stem cells*, BTSC) entfalten. So konnte über eine

Xenotransplantation von TLX-positiven primären Tumorzellen in gesunden Mäusen eine wiederkehrende Tumorbildung mit histologischen Eigenschaften spezifischer Primärtumoren nachgewiesen werden¹⁰⁰. Zusätzlich konnte in mehreren Gliomzelllinien eine TLX-Überexpression detektiert werden, welche mit einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korrelierte¹⁰¹. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Tumorgenese von Glioblastomen in Mäusen durch einen TLX-Knockout und daraus folgender Induktion der Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 3 (engl. *tet methylcytosine dioxygenase 3*, TET3) inhibiert werden konnte¹⁰². Ergänzend hat eine weitere *in vitro* Untersuchung in Neuroblastomzellen gezeigt, dass ein TLX-Knockdown zu einer verminderten Tumorsphärenbildung führt. Gleichzeitig aktivierte TLX die Expression der Matrix-Metalloproteinase-2 (engl. *matrix metalloproteinase-2*, MMP-2), was eine verstärkte invasive Migrationseigenschaft der Tumorzellen begünstigen könnte¹⁰³. Auch in Prostatakrebszellen (LNCaP und DU145) wurde eine erhöhte TLX-Expression nachgewiesen, welche mit einer onkogen-induzierten Seneszenz durch Repression von Tumorsuppressoren wie p21 assoziiert wurde¹⁰⁴. Außerdem trug eine TLX-Überexpression zur Androgeninsensitivität durch direkte Bindung am AR-Promotor und Repression der AR-Transkription bei, welches ein charakteristisches Merkmal des kastrationsresistenten Prostatakrebs darstellt¹⁰⁵. Somit stellt TLX hinsichtlich der Behandlung verschiedener Tumorformen ein äußerst vielversprechendes Wirkstofftarget dar.

2.3 Struktur und Funktion

2.3.1 Strukturelle Merkmale

TLX weist mit einer Sequenzlänge von 385 Aminosäuren die typische kanonische Sequenz von NRs wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben auf¹⁰⁶. Ein charakteristischer Unterschied liegt jedoch darin, dass TLX keine NTD besitzt¹⁰⁷. Die dreidimensionale strukturelle Aufklärung von TLX befindet sich im Vergleich zu übrigen Familienmitgliedern der NR2-Familie noch in einem Anfangsstadium, da bisher nur eine Kristallstrukturaufklärung der TLX-LBD fusioniert an ein Maltose-Bindungsprotein (engl. *maltose binding protein*, MBP) in apo-Form gelungen ist (pdb-Eintrag: 4XAJ)¹⁰⁸.

Zuvor konnten allerdings erste Einblicke mittels Homologiemodellierung der TLX-LBD (187-385) durch Benod *et al.* im Jahr 2014 in eine potentielle LBP verschafft werden¹⁰⁹. Als Vorlage wurde hierbei RXR α verwendet, dessen LBD-Sequenzidentität zu TLX mit 35 % gerade noch

ausreichend für eine zuverlässige Modellierung war¹¹⁰. Grundlegend zeigte die Strukturvorhersage die kanonischen Strukturmerkmale von NRs. Auffallend war allerdings, dass nur zehn α -Helices vorhanden sind. Die Überlagerung des Modells mit dem verwendeten RXR α -Templat, in dem RXR α durch einen Agonisten gebunden ist (pdb-Eintrag: 1RDT), wies auf eine potentielle LBP mit einer Größe von ca. 500 Å hin. Dabei kann man die LBP grob in zwei Bereiche einteilen. Ein Teil der LBP besteht aus einer hydrophoben Umgebung (V227, I230, A267 und L350) während der restliche Teil eine erhöhte Lösungsmittlexposition aufweist und überwiegend durch polare Aminosäuren gebildet wird (E187, K260, E264, S354, T357 und Y380)¹⁰⁹.

Die erste Kristallstrukturaufklärung der TLX-LBD im Komplex mit einem Corepressor gelang Zhi *et al.*¹⁰⁸. Hierbei wurden diverse Methoden in Kombination angewendet. Die erste Vereinfachung war das Auslassen der Helix 1 und 2 kodierenden Regionen, da eine prolinreiche Abfolge die Bildung der konventionellen α -helicalen Strukturen erschwerte. Daher geht man aktuell davon aus, dass die TLX-LBD nur aus zehn statt zwölf α -Helices besteht. Somit wurde nur die Aminosäuresequenz 182-385 zur Kodierung der TLX-LBD verwendet, welche fusioniert an MBP mit zusätzlichen Corepressoren der Atrophinfamilie (*Drosophila* Atrophin, dAtro; Säugetier-Atrophin-1, Atr1; Säugetier-Atrophin-2, Atr2) inkubiert wurde. Allerdings war die Röntgenstrahldiffraktion nicht zufriedenstellend, sodass durch homologen Austausch oberflächlicher Aminosäuren flexible Aminosäuren durch starrere Aminosäuren ausgetauscht wurden. Damit konnte die intrinsische Kristallisationsträgheit von TLX überwunden werden und der TLX-dAtro-Komplex mit einer Auflösung von 3,55 Å analysiert werden. Trotz des relativ artifiziellen Charakters dieses Konstrukts, ist eine ähnliche Funktionalität zum TLX-Wildtyp gegeben, welches in einem orthogonalen TLX-Atrophin Bindungsassay bestätigt wurde. Die asymmetrische Einheit der von Zhi *et al.* aufgelösten Kristallstruktur (pdb-Eintrag: 4XAJ) weist vier einzelne MBP-TLX-LBD-Monomere auf. Während zwei davon an dAtro gebunden sind und eine asymmetrische Anordnung zeigen, sind die restlichen zwei nicht an dAtro gebunden und symmetrisch angeordnet. Die dAtro Bindungsstelle befindet sich unterhalb von Helix 12 und reicht bis hin zu Helix 3. Die Interaktion erfolgt hierbei über eine Atrophin-Konsensus-Sequenz mit dem Motiv ALXXLXXY (A = Alanin, L = Leucin, X = beliebige Aminosäure, Y = Tyrosin), die sich signifikant von dem bisherigen kanonischen Corepressor-Motiv unterscheidet und wird entsprechend auch „Atro-Box“ genannt. Durch diese Anordnung besetzt Helix 12 die kanonische Coaktivator-

Bindungstasche und sorgt durch einen Knick im Übergang zwischen Helix 10 und 11 für die räumliche Blockade der klassischen orthosterischen Bindungstasche (siehe Abbildung 10).

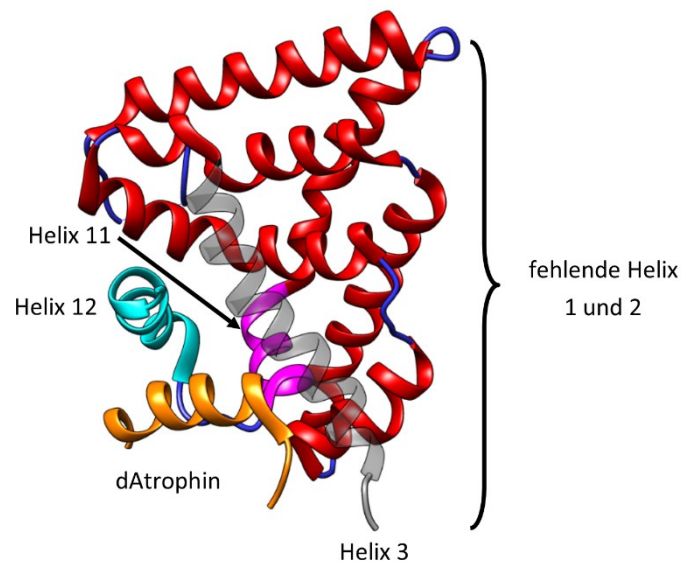


Abbildung 10: Darstellung des TLX-dAtro-Komplexes. Zur besseren Übersicht ist nur eine von zwei TLX-LBD-dAtro Einheiten ohne MBP abgebildet. dAtro (orange) besetzt unterhalb von Helix 12 (cyan) die Atro-Box-Bindungsstelle nahe Helix 3 (dunkelgrau, transparent) und zwingt Helix 12 in eine Konformation, die die klassische Coaktivator-Bindungsstelle blockiert. Außerdem ragt Helix 11 (magenta) in die orthosterische Bindungstasche hinein. Die TLX-LBD enthält keine Helix 1 und 2 (pdb-Eintrag: 4XAJ)¹⁰⁸.

Die Wechselwirkung zwischen der Atro-Box und der TLX-LBD wird hierbei durch Helix 3 (E187, A190 und F194), der Schleifenregion zwischen Helix 11 und 12 (F363) und Helix 12 (L376) vermittelt. In der Gesamtheit befindet sich TLX in einer autoreprimierten Konformation, welche typisch für die konstitutive Transkriptionsrepression von Waisenrezeptoren wie DAX-1, COUP-TF2 und PNR ist¹¹¹⁻¹¹³.

2.3.2 Funktion

Als Waisenrezeptor vermittelt TLX in monomerer Form neben wenigen transaktivierenden Signalwegen seine dominante transrepressorische Wirkung über die Erkennung des entsprechenden HREs, welches sich als erweiterte 5'-AAGTCA-3'-Sequenz manifestiert hat^{81,103,114}. Anders als bei konventionellen NRs interagiert TLX nicht mit NCoR oder SMRT. Stattdessen wechselwirkt TLX mit einem besonderen Set an Coregulatoren, welche für NRs eher untypisch sind. Dazu gehören neben den Mitgliedern der Atrophinfamilie, die Lysin-spezifische Histondemethylase 1A (engl. *lysine-specific histone demethylase 1A*, LSD-1), verschiedene HDACs und das Onkoprotein B-Zell-Lymphom/Leukämie 11A Protein (engl. *B-*

cell lymphoma/leukemia 11A, BCL11A)^{93,115–117}. Außerdem hat ein vorläufiger Mikroarray-Assay zur Echtzeit-Analyse von Coregulator-NR-Interaktionen (engl. *microarray assay for real-time analysis of co-regulator-nuclear receptor interaction, MARCoNI*) gezeigt, dass TLX neben den klassischen Coaktivatoren wie den SRCs und p300 auch mit dem Transformations/Transkriptions-Domäne-assoziierten Protein (engl. *transformation/transcription domain-associated protein, TRRAP*) und AR wechselwirken kann. Allerdings braucht dieser Befund noch weitere orthogonale Validierungsexperimente zur Bestätigung der biologischen Relevanz¹¹⁸. Nach bisherigem Stand ist somit das allgemeine Verständnis des TLX-Coregulator Mechanismus ebenfalls in einem initialen Status, sodass TLX hauptsächlich durch Corepressorrekrutierung die Transkription entsprechender Zielgene reprimiert (siehe Abbildung 11).

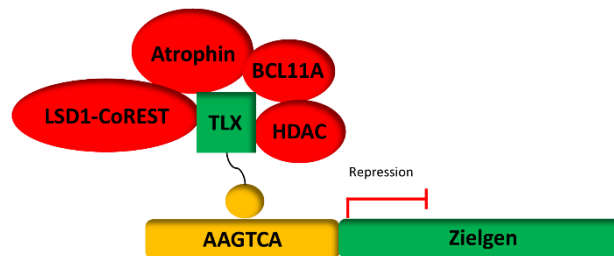


Abbildung 11: TLX als konstitutiver Transkriptionsrepressor rekrutiert weitgehend nicht-klassische Corepressoren wie Atrophin, LSD1-CoREST, HDAC und BCL11A zur Transkriptionsrepression^{89,115}.

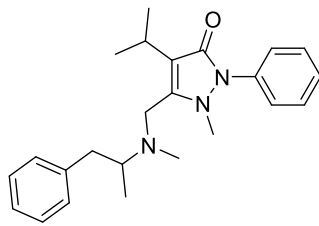
2.4 Liganden des nukleären Rezeptors TLX

Weil keine endogenen Liganden (mit hoher Affinität) identifiziert und bestätigt werden konnten, zählt TLX nach aktuellem Stand zu den Waisenrezeptoren. Außerdem war lange unklar, ob TLX in konventioneller Weise wie die übrigen NRs durch kleine organische Moleküle modulierbar ist, da die einzige Strukturinformation eine autoreprimierte Konformation mit einer geschlossenen LBP suggerierte. Einzig die Homologiemodellierung von Benod *et al.* ließ auf eine potentielle LBP schließen, die zur Bindung kleiner Moleküle geeignet schien. In den vergangenen Jahren wurden anhand verschiedener Screeningansätze erste Fortschritte in der TLX-Ligandenentwicklung gemacht. Diese Studien haben strukturell diverse, synthetische und natürliche kleine organische Moleküle identifiziert, die in zellbasierten oder zellfreien Systemen am rekombinanten Protein eine TLX-Modulation zeigen.

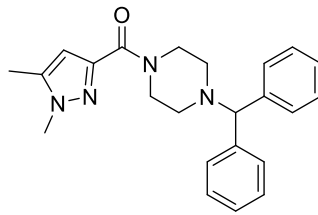
Der erste fundamentale Fortschritt gelang 2014 durch Benod *et al.*¹⁰⁹. In einem ersten Mitteldurchsatzscreening wurde hierbei eine Zusammenstellung diverser Bibliotheken mit einer Gesamtzahl von 20.000 kleinen organischen Molekülen in einem Differentiellen-Scanning-Fluorimetrie-Experiment (engl. *differential scanning fluorimetry*, DSF) auf eine mögliche Bindung an die TLX-LBD getestet. Als primäre Hits wurden Substanzen angesehen, die den Proteinschmelzpunkt der TLX-LBD um mindestens 0,9 °C verschoben. Die resultierenden 365 Kandidaten wurden anschließend durch Ausschluss von pan-Assay-Interferenz-Substanzen (engl. *pan-assay interference compounds*, PAINS) und manuelle Inspektion auf eine Anzahl von 190 reduziert. Ein orthogonaler direkter Bindungsassay unter Verwendung eines Octet Red 384 Systems reduzierte die Anzahl auf drei Moleküle. Hierbei wurde Avidin-TLX-LBD auf Super-Streptavidin Biosensoren immobilisiert. Als Referenz wurden Super-Streptavidin Biosensoren durch Biotinylierung blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den 190 Testsubstanzen bei einer Konzentration von 100 µM, von denen für 24 Moleküle ein Bindungsnachweis bestätigt werden konnte. Von diesen 24 Molekülen konnte für ccrp1 (**1**), ccrp2 (**2**) und ccrp3 (**3**) ein konzentrationsabhängiger Effekt (0,4-100 µM) nachgewiesen werden. Die weitere Untersuchung in einem Reportergenassay in HeLa-Zellen unter Expression eines Gal4-TLX-LBD Hybridkonstrukts und Verwendung des pGL4.35 Vektors als Reporterplasmid bestätigte eine biologische Wirkung von ccrp1 (**1**), ccrp2 (**2**) und ccrp3 (**3**). Aus diesem mehrstufigen Screening gingen ccrp1 (**1**, Famprofazon, $K_d = (6,6 \pm 0,07) \mu\text{M}$, $EC_{50} = (9,2 \pm 1,0) \mu\text{M}$), ccrp2 (**2**, $K_d = (0,650 \pm 0,100) \mu\text{M}$, $EC_{50} = (1,0 \pm 0,3) \mu\text{M}$) und ccrp3 (**3**, Dydrogesteron, $K_d = (27,5 \pm 3,5) \mu\text{M}$, $EC_{50} = (0,250 \pm 0,1) \mu\text{M}$) als erste TLX-Liganden hervor (siehe Abbildung 12).

Nukleärer Rezeptor TLX

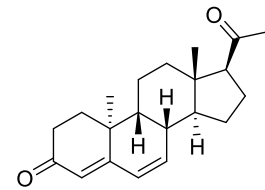
A



ccrp1
1

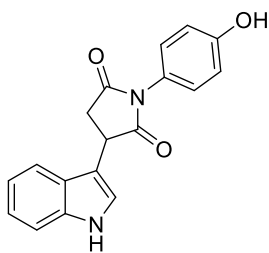


ccrp2
2

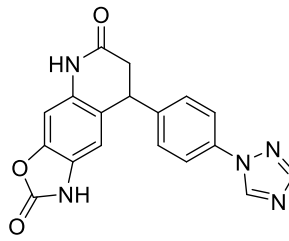


ccrp3
3

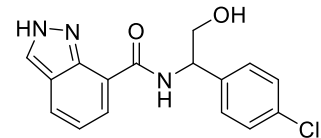
B



VPC-33010
4

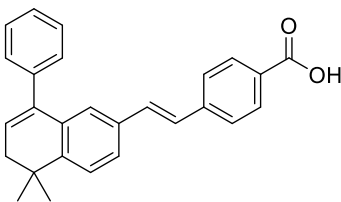


VPC-33017
5

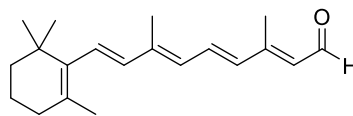


VPC-33035
6

C

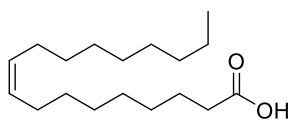


BMS453
7



ATRAL
8

D



Ölsäure
9

Abbildung 12: Darstellung bisheriger TLX-Modulatoren. **A)** TLX-Modulatoren ccrp1 (**1**), ccrp2 (**2**) und ccrp3 (**3**) nach Benod *et al.*, welche anhand eines Mitteldurchsatzscreenings identifiziert wurden¹⁰⁹. **B)** TLX-Modulatoren VPC-33010 (**4**), VPC-33017 (**5**) und VPC-33035 (**6**) nach Dueva *et al.*, die nach einer großen virtuellen Screening Kampagne *in vitro* evaluiert wurden¹¹⁹. **C)** BMS453 (**7**) als synthetischer Agonist und ATRAL (**8**) als inverser Agonist mit potentieller physiologischer Relevanz von Griffett *et al.*¹²⁰. **D)** Ölsäure (**9**) als endogener TLX-Agonist von Kandel *et al.*¹²¹.

In einem strukturbasierten Ansatz identifizierten Dueva *et al.* weitere TLX-modulierende Moleküle¹¹⁹. Ziel ihrer Herangehensweise war, die Atro-Box-Bindungsstelle durch Liganden zu

adressieren. Hierbei wurde zunächst die Zinc15 Datenbank, welche mit ca. sieben Millionen kleinen Molekülen kommerziell erhältlich ist, anhand eines Dockingverfahrens an der Atro-Box-Bindungsstelle virtuell gescreent. Anhand eines Rankings der Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung der Atompositionen (engl. *root mean square deviation*, RMSD) der gedockten Posen wurden 97 Moleküle als Kandidaten für die *in vitro* Testung ausgewählt und in einem Reporterassay in der Prostatakrebszelllinie DU145 unter Verwendung eines pGL3-Basic-3XTAE-LUC Reporterplasmids hinsichtlich Effekten auf die transkriptionelle Aktivität von TLX evaluiert. Dabei wurden VPC-33010 (**4**), VPC-33017 (**5**) und VPC-33035 (**6**) identifiziert, die bei einer Konzentration von 35 μM eine etwa 50%-ige Inhibition der intrinsischen Aktivität an TLX bewirkten. Erwähnenswert ist außerdem die Tatsache, dass die zuvor publizierten Liganden *ccrp1* (**1**) und *ccrp2* (**2**) im Reporterassay von Dueva *et al.* inaktiv waren (siehe Abbildung 12).

Griffett *et al.* haben Retinoide als erste natürliche TLX-Liganden beschrieben¹²⁰. Beginnend mit einer Serie von synthetischen Retinoiden konnte in zellbasierten Reporterassays unter Verwendung eines Gal4-TLX-LBD und eines TLX-Vollängenkonstrukts für BMS453 (**7**, Gal4-TLX: $\text{IC}_{50} = 367 \text{ nM}$; TLX-Volllänge: $\text{IC}_{50} = 159 \text{ nM}$) und BMS493 (Gal4-TLX: $\text{IC}_{50} = 125 \text{ nM}$; TLX-Volllänge: $\text{IC}_{50} = 54 \text{ nM}$) TLX-agonistische Aktivität im nanomolaren Bereich nachgewiesen werden. Diese vorläufigen Ergebnisse wurden durch Effekte auf die Aktivität an TLX in orthogonalen Systemen z.B. eine positive Proteinschmelzpunktverschiebung im DSF-Experiment, eine Peakverbreiterung im ^1H -NMR-Spektrum und Änderung der Fluoreszenzpolarisation während der TLX-Atrophin Wechselwirkung bestätigt. Ähnliche Versuchsreihen wurden für das natürliche Karotenoid Vitamin A Aldehyd (engl. *all trans-retinal*, ATRAL (**8**)) durchgeführt, welches als inverser Agonist einen EC_{50} -Wert = 1,72 μM im Gal4-Format und durch Derepression von TLX eine Hochregulation von Zielgenen in Retinalzellen zeigte. Zusätzlich haben Mutagenese-Experimente gezeigt, dass W233, F362 und F363 essentiell für die Erkennung von BMS493 und ATRAL (**8**) sind. Mit diesen Daten ist zumindest für ATRAL (**8**) als natürliches Karotenoid eine physiologische Relevanz in Retinalzellen gegeben. Allerdings ist für diese Substanzklasse mit geringer Selektivität zu rechnen, da es sich hierbei um Substanzen handelt, die ursprünglich zur Aktivierung von RXR und RAR entwickelt wurden. Außerdem ist auch hier zu erwähnen, dass die Autoren dieser Studie für *ccrp1-ccrp3* (**1-3**) keine Aktivität in ihren Systemen nachweisen konnten (siehe Abbildung 12).

Ausgehend von vorherigen Befunden, dass NSCs relativ hohe Spiegel an einfach-ungesättigten Fettsäuren aufweisen, konnten Kandel *et al.* mittels Screening einiger gesättigter, einfach- und mehrfach-ungesättigter Fettsäuren mit variabler Kettenlänge Olsäure (**9**, 18:1 ω 9) als potentiellen endogenen TLX-Liganden mit möglicher physiologischer Relevanz identifizieren¹²¹. So wurde postuliert, dass während der Ruhezeit von NSCs, Olsäure (**9**) synthetisiert und angereichert wird. Wird ein Schwellenwert überschritten, wird durch Bindung von Ölsäure (**9**) an TLX und den anschließenden Austausch von Corepressoren durch Coaktivatoren die Expression Zellzyklus-regulierender Gene induziert und der Zellzykluseintritt ermöglicht (siehe Abbildung 12).

3 Zielsetzung

Wie in Kapitel 2.2 diskutiert, stellt TLX aufgrund seiner zentralen regulatorischen Rolle in der Homöostase von NSCs eine attraktive Zielstruktur für die Wirkstoffforschung dar. Bisherige Untersuchungen weisen auf eine pathophysiologische Rolle von TLX bei neurodegenerativen, kognitiven, mentalen und visuellen Erkrankungen einerseits und tumorigenen Prozessen andererseits hin. Allerdings befindet sich der Identifizierungs- und Validierungsprozess von TLX-Liganden einschließlich synthetischer und natürlicher Moleküle auf einer sehr frühen Stufe, sodass die vollständige pharmakologische Validierung von TLX als attraktives Wirkstofftarget fehlt. Dementsprechend fehlt eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung zukünftiger, potentieller Arzneistoffe, die TLX adressieren. Dies zeigt den Bedarf an validierten, potenten und möglichst selektiven TLX-Modulatoren für funktionelle Studien an TLX auf Proteinebene, im Zellsystem und in präklinischen Studien. Die bislang publizierten TLX-Liganden erfüllen diese Kriterien nur unzureichend.

Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung mehrerer *in vitro* Testsysteme, um TLX-Liganden identifizieren und deren Aktivität an TLX studieren zu können. Hierbei sollten Reporterassays in HEK293T-Zellen (engl. *human embryonic kidney*, HEK293T) entwickelt werden, die die Untersuchung von TLX im Gal4-Format, in Kombination mit VP16-RXR α als potentiell Heterodimerpartner und als Volllängenprotein erlaubte. Die Ergebnisse werden hierzu im Kapitel 4.1 präsentiert und diskutiert. Mit Hilfe dieser *in vitro* Testsysteme sollten anschließend in Screeningansätzen und systematischen Studien der Struktur-Wirkungs-Beziehung (engl. *structure-activity relationship*, SAR) TLX-Liganden identifiziert und hinsichtlich ihrer Potenz und Selektivität optimiert und charakterisiert werden. Hierbei wurde eine Wirkstofffragmentbibliothek auf TLX-Modulation getestet und anhand von fünf Fragmenthits (**30**, **34**, **39**, **45** und **47**) vier TLX-Liganden-Chemotypen zur Entwicklung und Charakterisierung abgeleitet (siehe Abbildung 13). Bei der Optimierung der verschiedenen TLX-Liganden-Chemotypen sollten abhängig von der chemischen Struktur verschiedene Strategien zum Einsatz kommen. Die Struktur-Wirkungs-Beziehung der xanthinbasierten und von Propranolol abgeleiteten TLX-Modulatoren (**55** und **54**) wurde systematisch untersucht (siehe Abbildung 13 A und B), während für den TLX-Agonisten **45** ein ligandenbasiertes Pharmakophormodell als Grundlage für die Strukturoptimierung diente (siehe Abbildung 13 C). In einem Scaffold Hopping Ansatz sollten die Erkenntnisse aus der Optimierung der

Zielsetzung

xanthinbasierten TLX-Liganden auf weitere aktive Fragmentstrukturen (**39** und **47**) übertragen werden, wobei eine kombinatorische Substanzbibliothek generiert und anschließend *in vitro* charakterisiert wurde, um potentielle neue TLX-Modulatoren-Chemotypen zu identifizieren (siehe Abbildung 13 D). Die hierbei entwickelten TLX-Liganden sollten anschließend als *tool compounds* in funktionellen Studien eingesetzt werden, um ein erstes Verständnis der TLX-Modulation durch Liganden zu gewinnen. Hierzu sollten die jeweils potentesten Derivate der einzelnen TLX-Liganden-Chemotypen in verschiedenen zellulären Systemen (Reporterassays, TLX-Zielgenexpression, Viabilitäts-, Apoptose- und Migrationsassays), und zellfreien Systemen an rekombinantem TLX-LBD-Protein (NMR, ITC (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) und HTRF-Experimenten (engl. *homogenous time-resolved fluorescence*, HTRF)) charakterisiert werden.

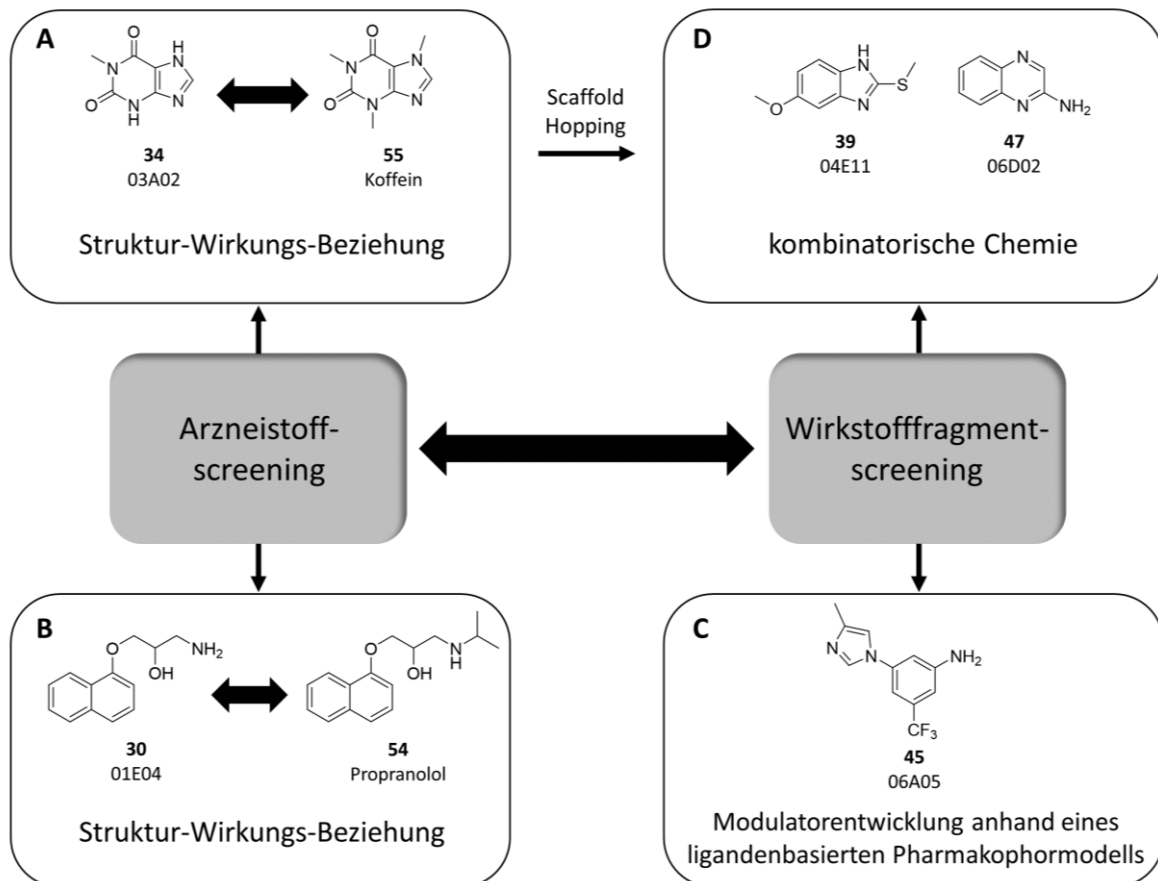


Abbildung 13: Projektübersicht zur Entwicklung neuartiger TLX-Modulatoren basierend auf vorausgegangen Screenings. **A)** SAR-Studie von Xanthinderivaten. **B)** SAR-Studie von Propranololderivaten. **C)** Entwicklung neuartiger TLX-Modulatoren anhand eines ligandenbasierten Pharmakophormodells. **D)** Scaffold Hopping auf chemische ähnliche Fragmente und Darstellung einer Substanzbibliothek mit Hilfe kombinatorischer, synthetischer Chemie.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Etablierung orthogonaler Reportergergenassays zur Untersuchung der TLX-Ligandenbindedomäne

Um die Modulation von TLX durch kleine organische Moleküle studieren zu können, bedurfte es geeigneter Testsysteme, die zunächst entwickelt werden mussten. Bei allen nachfolgenden Methoden handelt es sich um Reportergergenassays, die die Detektion eines Biolumineszenzsignals in Abhängigkeit der Aktivität von TLX erlaubten. Angewendet wurde ein Hybridassaysystem, in dem die TLX-LBD an einer Gal4-DBD (pFA-CMV-TLX) fusioniert ist, und ein Vollängenreportergergenassay, in dem die vollständige native Form des humanen TLX vorliegt (pFA-CMV-TLXfull).

4.1.1 Allgemeine Einführung in den Gal4-Reportergergenassay zur universalen Charakterisierung von nukleären Rezeptoren

Um die Aktivität von NRs zu studieren, werden häufig Reportergergenassays in Kombination mit der Gal4-Hybridisierungstechnik verwendet. Bei dieser Technik ist die LBD des zu untersuchenden NRs an einer Gal4-DBD fusioniert¹²². Die Gal4-DBD stammt aus der Hefe und dient dort ähnlich wie die NR-DBD zur Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen. Ein Vorteil des Hybridsystems liegt in der Möglichkeit in einem uniformen und universellen System verschiedene Mitglieder der NR-Familie studieren zu können, da sich jeweils nur die NR-LBD ändert. Somit ist ein Reporterplasmid ausreichend, welches das Gal4-RE (engl. *response element*, RE) enthält, wohingegen bei Vollängenassays individuelle Reporterplasmide notwendig sind. Ein Nachteil ist hingegen der artifizielle Charakter dieses Setups, da eben nicht die gesamte native Form des NRs verwendet wird.

In einem Gal4-Hybridreportergergenassay werden durch transiente Transfektion von Zellen (z.B. HEK293T) drei verschiedene Plasmidkonstrukte eingeschleust. Im vorliegenden System kodiert ein pFA-CMV-NR Plasmid unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Zytomegalovirus-Promotors (engl. *cytomegalovirus*, CMV) für das Gal4-NR Fusionsprotein, welches aus einer Gal4-DBD fusioniert an der NR-LBD das artifizielle Wirkstofftarget konstituiert. Das pFR-Luc Plasmid kodiert eine Firefly-Luciferase, die das eigentliche Reportergergen darstellt. Eine vorgeschaltete Region, die mit fünf Gal4-Bindungsstellen bestückt ist, und somit ein Gal4-RE bildet, erlaubt nach Erkennung des Gal4-NR Konstrukts die Expression des Reportergergens in

Abhängigkeit von der Aktivität des studierten Hybridrezeptors. Das pRL-SV40 Plasmid kodiert unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven SV40-Promotors (engl. *simian virus 40*, SV40) eine Renilla-Luciferase, die - in erster Linie zu Normierungszwecken dient - zur Abschätzung der Transfektionseffizienz und zur Beobachtung von Toxizitätseffekten verwendet wird. Nach transients Transfektion mit den vorher genannten Plasmiden erfolgt sowohl eine konstitutive Expression des zu untersuchenden Gal4-Hybridrezeptors als auch die Expression der Renilla-Luciferase. Die Reporterexpression wird in Abhängigkeit von der Aktivität des überexprimierten Gal4-Hybridrezeptors induziert. Durchdringt ein Ligand die Zellmembran und bindet an der LBD eines entsprechenden Gal4-Hybridrezeptors, erfolgt eine veränderte Reporterexpression in Abhängigkeit des Liganden durch Modulation des Gal4-Hybridrezeptors (siehe Abbildung 14).

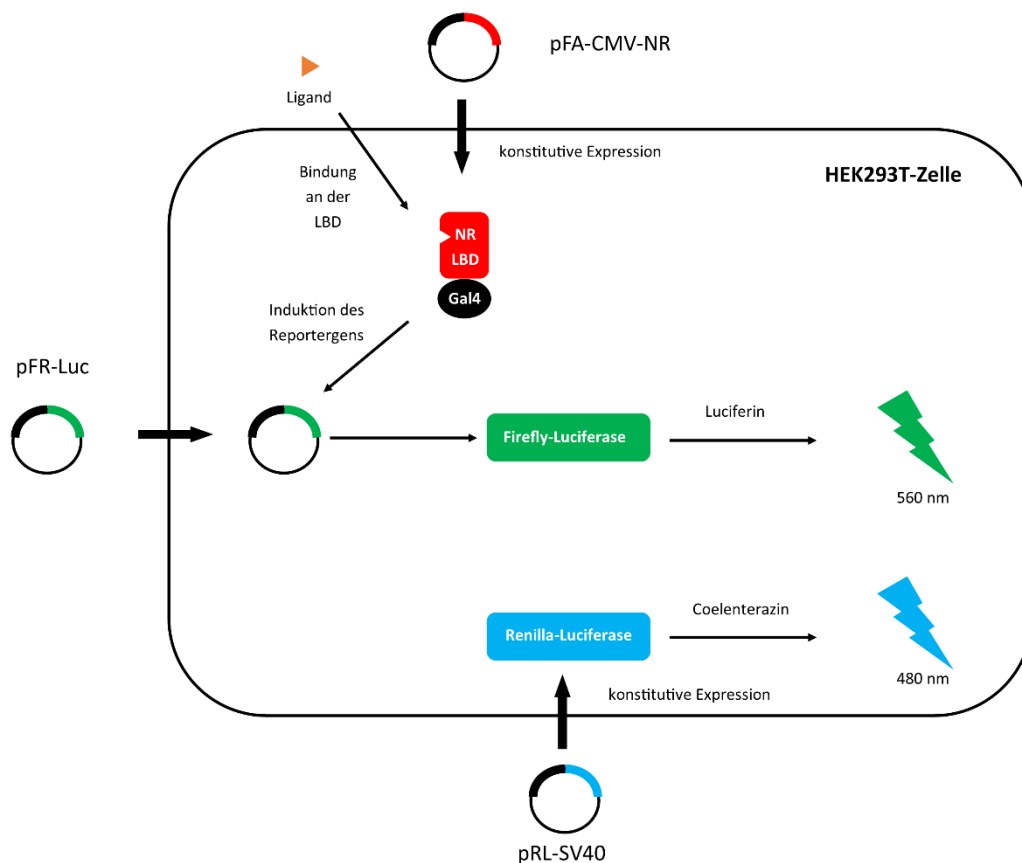
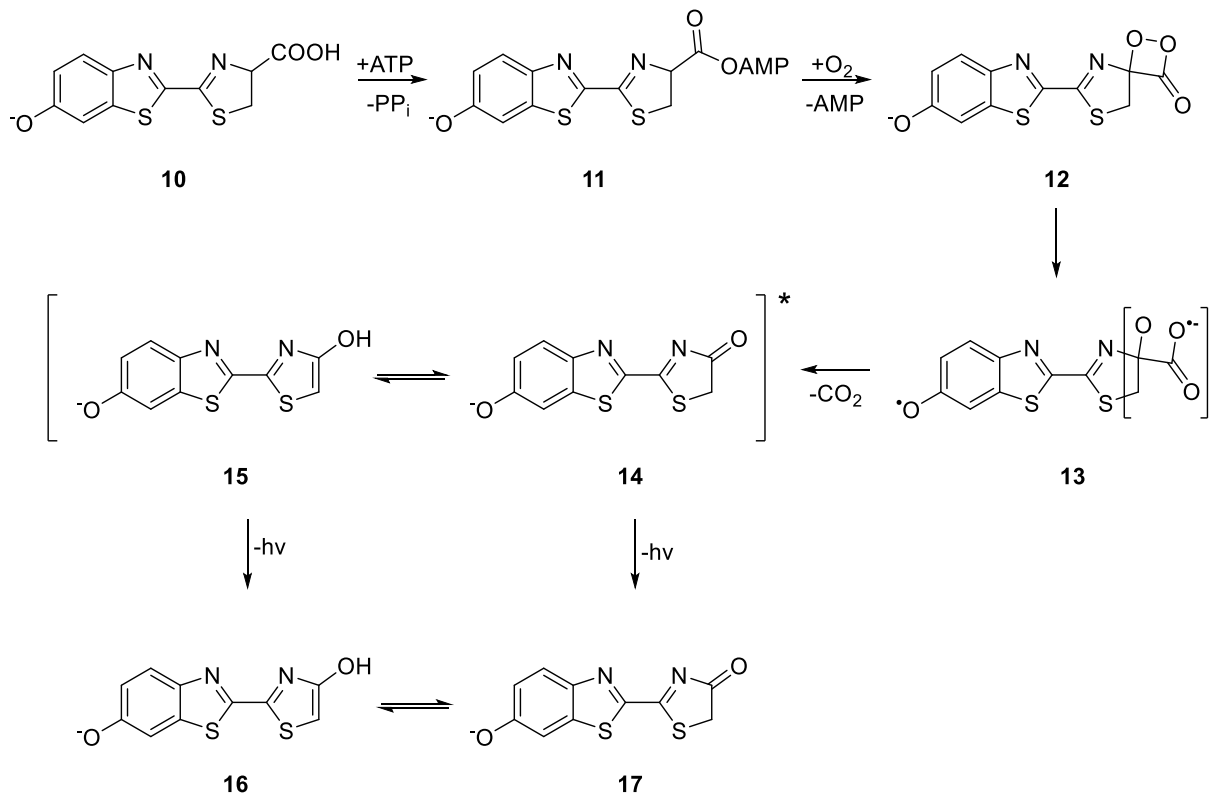


Abbildung 14: Allgemeines Schema des Gal4-Hybridassays. Durch transiente Transfektion mit pFR-Luc, pRL-SV40 und pFA-CMV-NR kann nach Substratumsetzung der Firefly-Luciferase (Luciferin) und Renilla-Luciferase (Coelenterazin) die entsprechende Biolumineszenz nach Emission bei Wellenlängen von $\lambda = 560$ nm und $\lambda = 480$ nm detektiert werden. Durchdringt ein NR-Ligand die Zellmembran und bindet an der NR-LBD, erfolgt eine konzentrationsabhängige Reporterexpression.

Ergebnisse und Diskussion

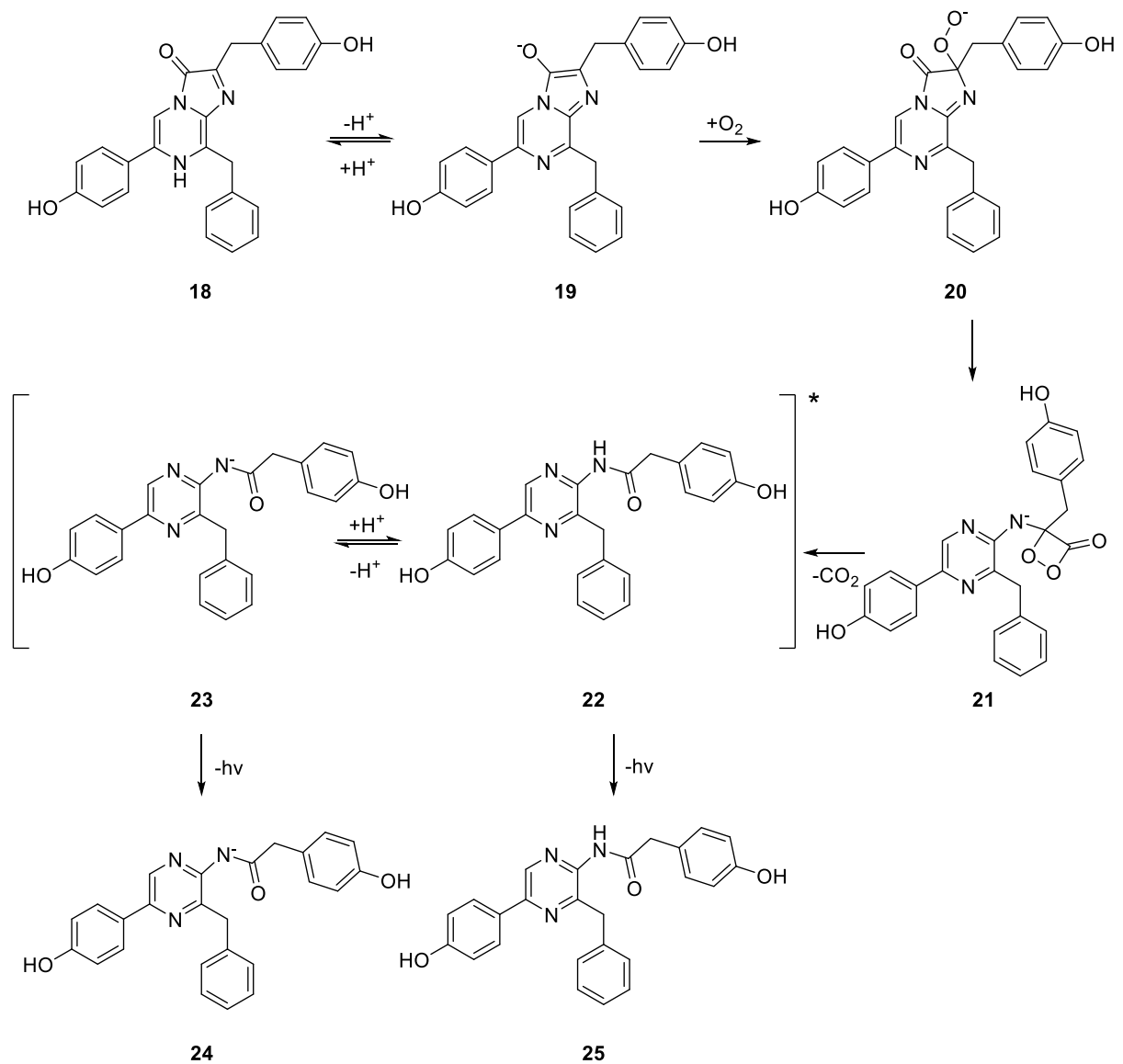
Nach Lyse der Zellen können die Biolumineszenzsignale durch Zugabe der entsprechenden Substrate (Luciferin und Coelenterazin) detektiert werden. Die Firefly-Luciferase katalysiert dabei mit Hilfe von Adenosintriphosphat (ATP) unter CO_2 -Abspaltung und der Generation eines angeregten Zustandes die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin unter Lichtemission (siehe Schema 1).



Schema 1: Substratumsetzung der Firefly-Luciferase. Unter ATP- und O_2 -Verbrauch erfolgt die Umsetzung von **10** über **11** und **12** zu **13**. Die CO_2 -Abspaltung des Radikalanions **13** liefert einen angeregten Zustand (**14** und **15**), der nach Relaxation in den Grundzustand (**16** und **17**) Licht emittiert¹²³.

In ähnlicher Weise dient die Renilla-Luciferase zur Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid (siehe Schema 2).

Ergebnisse und Diskussion



Schema 2: Substratumsetzung der Renilla-Luciferase. Durch Deprotonierung von **18** entsteht unter O_2 -Verbrauch Intermediat **20**. Ein Zyklisierungsschritt liefert **21**, das nach CO_2 -Abspaltung die angeregten Zustände **22** und **23** bildet. Nach Relaxation in den Grundzustand unter Lichtemission entstehen Spezies **24** und **25**¹²⁴.

Die Firefly-Luciferase Biolumineszenz wird nach Emission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 560 \text{ nm}$, während die Renilla-Luciferase Biolumineszenz nach Emission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 480 \text{ nm}$ in Lichteinheiten detektiert. Für die Analyse potentieller Aktivitäten von NR-Modulatoren spielen relative Lichteinheiten (RLE) und die x-fache Reporteraktivierung eine entscheidende Rolle. Dabei ergibt sich der Wert der RLE für einen Messpunkt als Quotient der Firefly-Luciferase und entsprechender Renilla-Luciferase mit dem Faktor 1000 multipliziert (siehe Gleichung 1).

$$\text{RLE} = \frac{\text{Biolumineszenz (Firefly-Luciferase)}}{\text{Biolumineszenz (Renilla-Luciferase)}} \cdot 1000 \quad (1)$$

Die x-fache Reporteraktivierung resultiert durch die Division der RLE eines Messpunktes durch die RLE der unbehandelten Negativkontrolle (Probe mit 0,1 % DMSO) (siehe Gleichung 2).

$$x - \text{fache Reporteraktivierung} = \frac{\text{RLE (Probe)}}{\text{RLE (Negativkontrolle)}} \quad (2)$$

Die Aktivität von NRs, die über validierte Liganden verfügen, wird über die relative Aktivierung (RA) evaluiert. Diese ergibt sich durch die Division der x-fachen Reporteraktivierung eines Messpunktes durch die x-fache Reporteraktivierung durch einen entsprechenden Referenzagonisten (siehe Gleichung 3).

$$\text{RA} = \frac{\text{x-fache Reporteraktivierung (getestete Ligandenkonzentration)}}{\text{x-fache Reporteraktivierung (Konzentration Referenzagonist)}} \quad (3)$$

Aus RLEs, x-fachen Reporteraktivierungen oder RAs lässt sich in Abhängigkeit der getesteten Ligandenkonzentrationen eine Dosis-Wirkungskurve auftragen, die durch nichtlineare Regressionsanalyse mit einer logistischen Kurve mit vier Parametern einen sigmoidalen Verlauf anzeigt. Der Wendepunkt entspricht hierbei der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}). Diese Konzentration der halbmaximalen Reporteraktivierung stellt ein Maß für die Potenz eines NR-Agonisten dar. Weist die Kurve einen abnehmenden Verlauf auf, so spricht man von der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}). Diese ist komplementär zum EC_{50} -Wert und spiegelt die Konzentration wider, bei der ein NR-Antagonist die Wirkung eines Agonisten zu 50 % inhibiert. Im Fall von konstitutiv transkriptionell aktiven NRs findet ebenfalls der IC_{50} -Wert bei der Charakterisierung von inversen Agonisten Anwendung.

4.1.2 Gal4-TLX als Transkriptionsrepressor

Um einen Gal4-TLX-Hybridreportergenassay zu etablieren, wurde das Plasmidkonstrukt pFA-CMV-TLX (Aminosäuren der LBD: 150-385 inklusive *hinge* Region, kloniert durch Dr. Jan Heering) verwendet. Erste Versuche zeigten, dass bei Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pFR-Luc, pRL-SV40 und pFA-CMV-TLX (12 und 25 ng/Well) eine bemerkenswerte Verringerung der basalen Transkription des Reportergens in mit pFR-Luc und pRL-SV40 transfizierten HEK293T-Zellen erfolgte. Als Konsequenz resultierten daraus verminderte RLEs (siehe Abbildung 15).

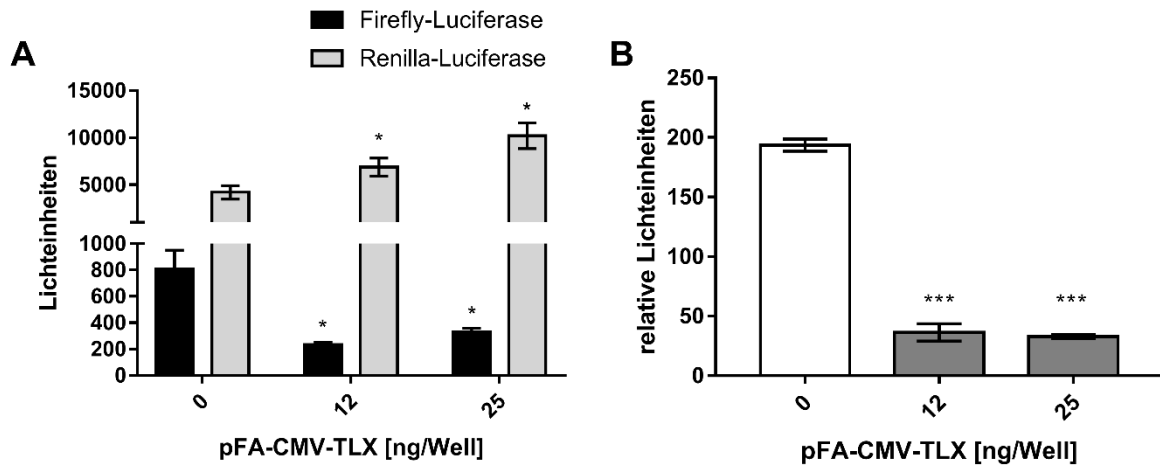
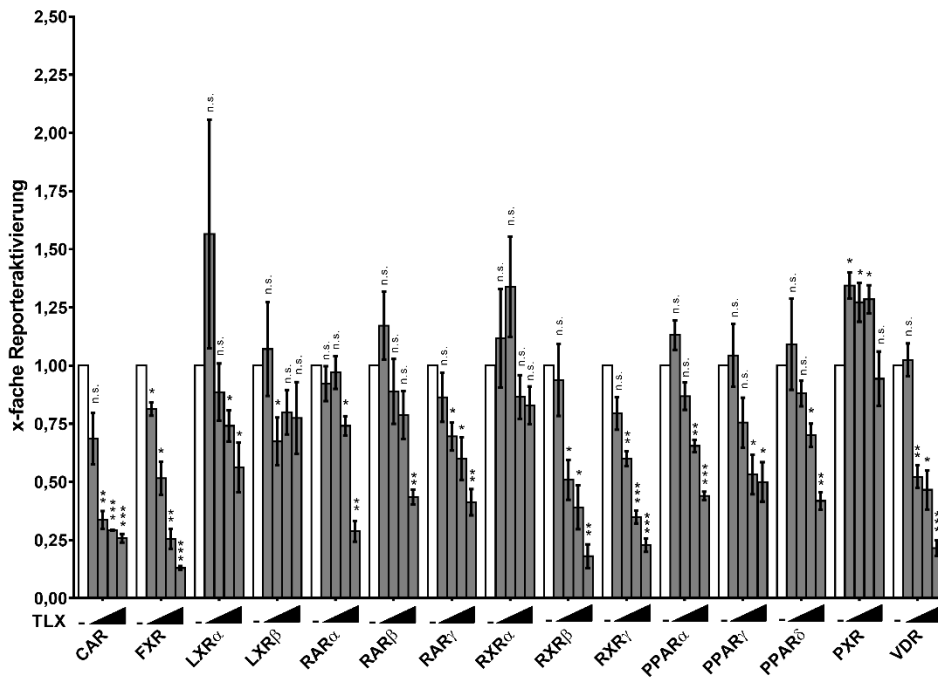


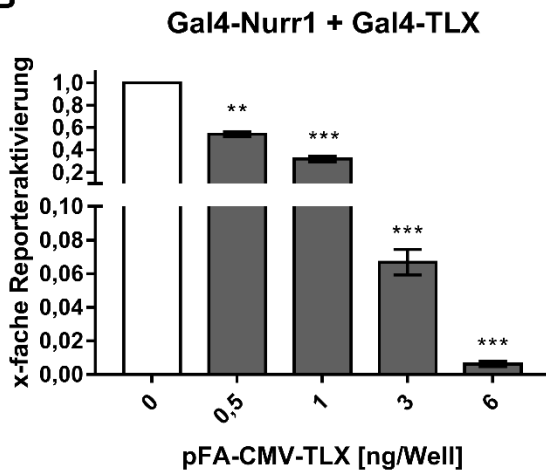
Abbildung 15: Einfluss von Gal4-TLX auf die basale Transkription des Reportergens. HEK293T-Zellen wurden mit 100 ng/Well pFR-Luc, 1 ng/Well pRL-SV40 und mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (12 und 25 ng/Well) transfiziert. **A**) Absolutwerte der Firefly- und Renilla-Luciferase. **B**) Darstellung der relativen Lichteinheiten. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen nicht mit pFA-CMV-TLX transfizierten Zellen analysiert. $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Der maximale Effekt wurde dabei bereits mit einer Menge von 12 ng/Well pFA-CMV-TLX erreicht. Dieser Befund ließ auf eine mögliche intrinsische Transkriptionsrepression durch Gal4-TLX schließen und deutete an, dass Gal4-TLX trotz des artifiziellen Charakters die native, physiologische Aktivität von TLX als Transkriptionsrepressor widerspiegelt. Diese repressive Wirkung ließ sich ebenfalls sowohl auf die Agonisten-induzierte Transkriptionsaktivität anderer NRs als auch auf konstitutiv transkriptionsaktive NRs im Gal4-Format übertragen (siehe Abbildung 16). Dabei wurden Mitglieder der NR-Familie durch entsprechende Referenzagonisten bei einer Konzentration von 1 μ M aktiviert (CAR: CITCO¹²⁵, FXR: GW4064¹²⁶, LXR α/β : T0901317¹²⁷, RAR $\alpha/\beta/\gamma$: Tretinoin¹²⁸, RXR $\alpha/\beta/\gamma$: Bexaroten¹²⁹, PPAR α : GW7647¹³⁰, PPAR γ : Pioglitazon¹³¹, PPAR δ : L165041¹³², PXR: SR121813¹³³, VDR: Calcitriol¹³³). Nurr1 und ROR α besaßen eine intrinsisch konstitutive Aktivität, daher war eine Agonisten-induzierte Aktivierung nicht notwendig.

A



B



C

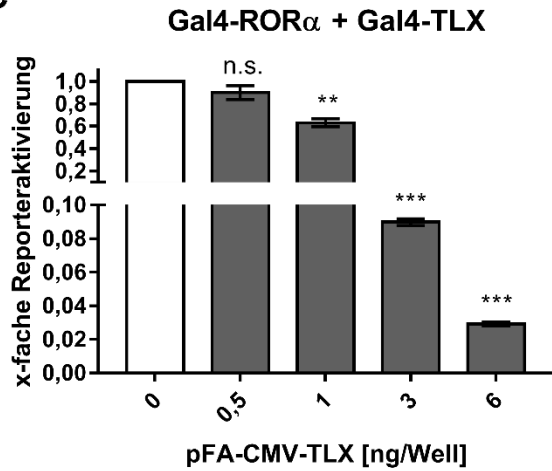


Abbildung 16: Gal4-TLX in Kombination mit diversen Gal4-NRs in HEK293T-Zellen. **A**) NRs im Gal4-Format wurden mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX cotransfiziert (1,5, 3, 6 und 12 ng/Well). **B**) Der konstitutiv aktive Gal4-NR Nurr1 wurde mit zunehmender Menge pFA-CMV-TLX (0,5, 1, 3 und 6 ng/Well) cotransfiziert. **C**) Der konstitutiv aktive Gal4-NR ROR α wurde mit zunehmender Menge pFA-CMV-TLX (0,5, 1, 3 und 6 ng/Well) cotransfiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen nicht mit pFA-CMV-TLX transfizierten Zellen analysiert. $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Für alle genannten NRs - PXR ausgeschlossen - konnte mit zunehmender Menge an Gal4-TLX eine konzentrationsabhängige, verringerte x-fache Reporteraktivierung beobachtet werden. Diese Ergebnisse lieferten somit erste Hinweise auf eine Transrepression von Gal4-TLX auf

andere Gal4-NRs, welche möglicherweise über einen Kompetitionsmechanismus um die Gal4-DBD-Bindungsstelle oder über einen Heterodimerisierungsmechanismus der entsprechenden NR-LBDs zu erklären ist.

Um die Funktionalität des Gal4-TLX-Reporterassays zum Screening und der Charakterisierung von TLX-Liganden zu validieren, wurden *ccrp1* (1), *ccrp2* (2) und *ccrp3* (3), die zum Zeitpunkt der Assayetablierung einzigen bekannten TLX-Modulatoren, bei Konzentration (10 und 30 μM) weit oberhalb der publizierten EC_{50} -Werte in HEK293T-Zellen unter Cotransfektion mit pFR-Luc und pRL-SV40 getestet, um deutliche Aktivitätsmodulationen (unter Ausschluss toxischer Effekte) zu erzielen. Allerdings waren keine eindeutigen, signifikanten Effekte im Sinne einer Reporterinduktion zu beobachten. Für *ccrp3* (3) resultierte aufgrund von Toxizitätseffekten ein erhöhter RLE-Wert, der aber nicht auf erhöhte Firefly-Luciferase Lumineszenz zurückzuführen war (siehe Abbildung 17).

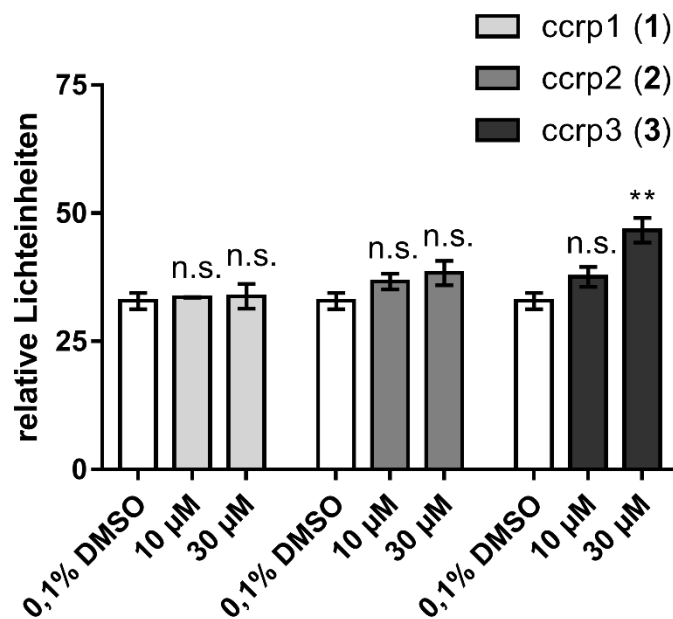


Abbildung 17: Effekte von *ccrp1* (1), *ccrp2* (2) und *ccrp3* (3) im Gal4-TLX-Reporterassay. HEK293T-Zellen wurden mit 100 ng/Well pFR-Luc, 1 ng/Well pRL-SV40 und mit 25 ng/Well pFA-CMV-TLX transfiziert. Anschließend wurde für 14 Stunden mit den Testsubstanzen 1 (10 und 30 μM), 2 (10 und 30 μM) und 3 (10 und 30 μM) inkubiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle analysiert. $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Diese Ergebnisse deuteten an, dass das Gal4-TLX-Fusionsprotein eine andere Aktivität besaß als bisher studierte NRs im Gal4-Format. Außerdem konnte aufgrund fehlender Effekte von

ccrp1 (1), ccrp2 (2) und ccrp3 (3) angenommen werden, dass dieser erste Gal4-TLX-Reporterassay ein Detektionslimit besaß, da die ausgeprägte Repression der Reporterexpression durch Gal4-TLX eine durch Liganden verstärkte, repressive TLX-Wirkung nicht erlaubte. Somit wäre die Identifizierung von TLX-Agonisten (Verstärker der intrinsischen repressiven TLX-Aktivität) unmöglich. Um die Gal4-TLX-Aktivität in einer bidirektionalen Art und Weise zu erfassen, war es daher notwendig durch ein zusätzliches Hilfsmittel die Basislinie der Firefly-Luciferase- bei gleichbleibender Renilla-Luciferase Biolumineszenz und somit die RLE zu erhöhen. Zu diesem Zweck war die Kombination aus Gal4-Nurr1/Gal4-TLX geeignet. Durch Anpassung der pFA-CMV-TLX-Menge konnte das Basissignal der RLE so weit erhöht werden, dass eine bidirektionale Modulationsobservierung möglich war. Hierbei konnte in pFR-Luc und pRL-SV40 transfizierten HEK293T-Zellen durch Cotransfektion mit pFA-CMV-Nurr1 (6, 12, 25 und 50 ng/Well) mit zunehmenden Mengen an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3, 6, 12 und 25 ng/Well) eine Gal4-TLX-konzentrationsabhängige Abnahme des Gal4-Nurr1-vermittelten Reportersignals beobachtet werden (siehe Abbildung 18).

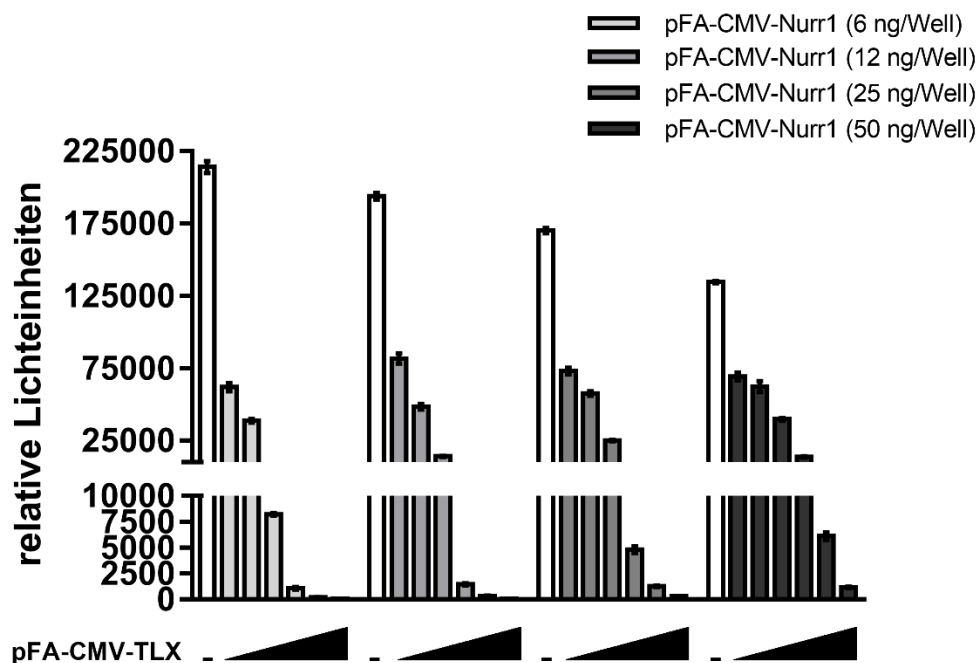


Abbildung 18: Auswirkung von Gal4-TLX auf Gal4-Nurr1. Cotransfektion von pFR-Luc und pRL-SV40 transfizierten HEK293T-Zellen mit pFA-CMV-Nurr1 (6, 12, 25 und 50 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3, 6, 12 und 25 ng/Well jeweils). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt.

Jedoch ist im Sinne der Identifizierung neuartiger TLX-Modulatoren diese Art der Anwendung ungünstig, da aufgrund der zu hohen Ähnlichkeit der verwendeten NRs mit überlappenden und schwer interpretierbaren Interaktionen zu rechnen ist. Aus diesem Grund musste ein ähnliches Hilfsmittel herangezogen werden, welches aber kein Mitglied der NR-Familie und optimalerweise kein humanes Protein ist.

4.1.3 Verwendung von Gal4-VP16 als Transkriptionsaktivator zur Detektionserweiterung

Um das Detektionsfenster zu erweitern, wurde das Plasmid pECE-SV40-Gal4-VP16, welches kommerziell erhältlich ist, verwendet. Dieses Konstrukt kodiert eine Gal4-DBD fusioniert an die Herpes-simplex-Virus 1 VP16 Aktivierungsdomäne (engl. *trans inducing factor*, VP16) und fungiert daher als potenter Transkriptionsaktivator durch Bindung an eine Gal4-Bindungsstelle^{134,135}. Daher erschien dieses Hybridkonstrukt als ein vielversprechender Ersatz für Gal4-Nurr1, um gemeinsam mit Gal4-TLX einen Reporterassay zu etablieren, der eine bidirektionale Beobachtung der TLX-Modulation ermöglicht.

Wie aufgrund der Literatur zu erwarten war, stiegen die RLE-Werte proportional mit zunehmender Menge an pECE-SV40-Gal4-VP16 (6, 12 und 25 ng/Well) in mit pFR-Luc und pRL-SV40 cotransfizierten HEK293T-Zellen. In ähnlicher Weise führte die zusätzliche, zunehmende cotransfizierte pFA-CMV-TLX-Menge (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well) zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der RLE-Werte (siehe Abbildung 19).

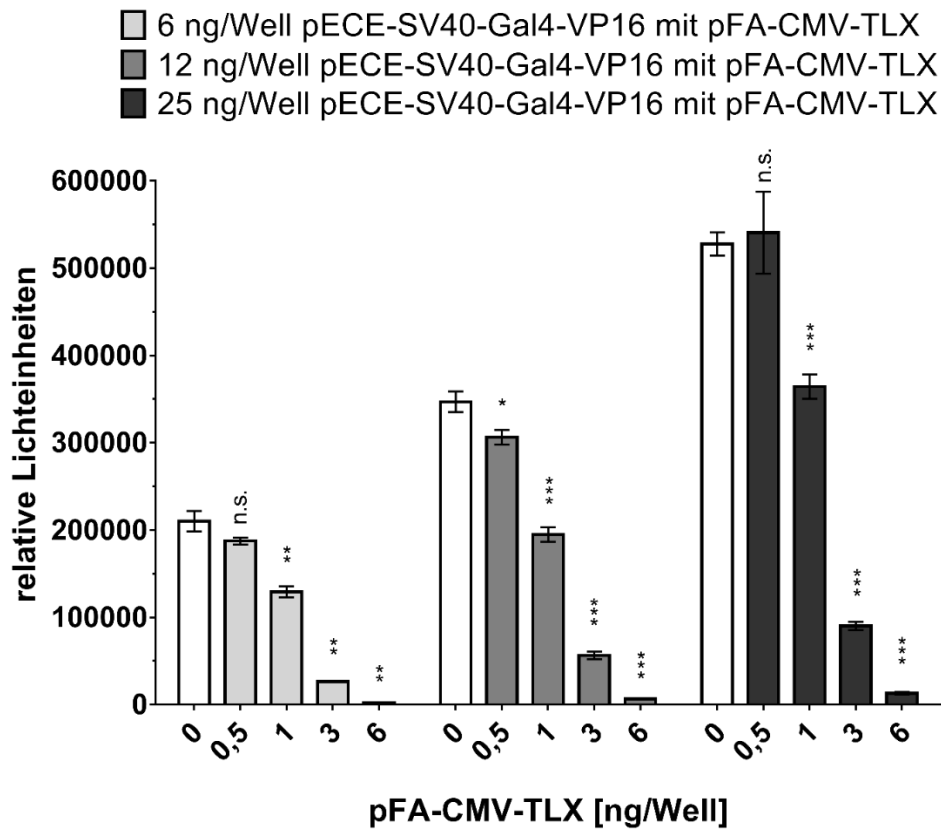


Abbildung 19: Auswirkung von Gal4-TLX auf Gal4-VP16. Cotransfektion von pFR-Luc und pRL-SV40 transfizierten HEK293T-Zellen mit pECE-SV40-Gal4-VP16 (6, 12 und 25 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well jeweils). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen mit nicht pFA-CMV-TLX transfizierten Zellen analysiert. $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Um zu entscheiden, welches pFA-CMV-TLX/pECE-SV40-Gal4-VP16 Verhältnis optimal für die Anwendung als Screeningplattform darstellte, wurden die Firefly-Luciferase-Absolutwerte analysiert, da diese für die Gal4-TLX-Aktivität die aussagekräftige Variable bei der Bestimmung der RLE ist. Analog wie zu den RLEs konnte mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0,5, 1, 3 und 6 ng/Well jeweils) eine konzentrationsabhängige Verminderung der Firefly-Luciferase-Lumineszenz detektiert werden (siehe Abbildung 20).

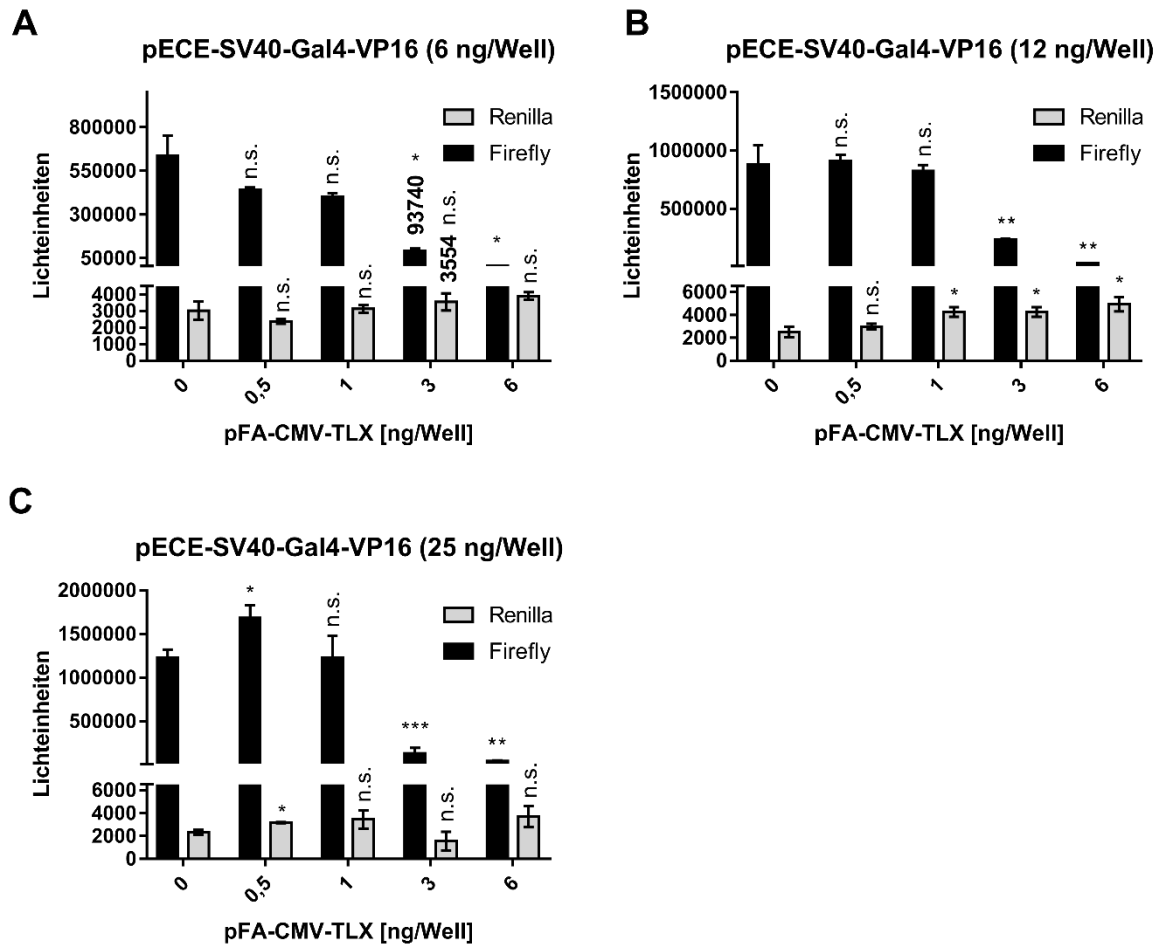


Abbildung 20: Darstellung der Firefly- und Renilla-Luciferase Absolutwerte im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Es erfolgte eine Transfektion mit 100 ng/Well pFR-Luc und 1 ng/Well pRL-SV40. **A)** Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pECE-SV40-Gal4-VP16 (6 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well). **B)** Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pECE-SV40-Gal4-VP16 (12 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well). **C)** Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pECE-SV40-Gal4-VP16 (25 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t-Test* gegen mit pFA-CMV-TLX nicht transfizierten Zellen analysiert. $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Da es sich bei pECE-SV40-Gal4-VP16 um eine konstitutive Expression des Fusionsproteins handelte, musste eine pFA-CMV-TLX/pECE-SV40-Gal4-VP16-Kombination ausgewählt werden deren Basissignal hoch genug für eine bidirektionale Modulationsobservation und zugleich die stressinduzierte Belastung der HEK293T-Zellen durch übermäßige Reportgenexpression möglichst minimal war. Aus diesem Grund erschien die Kombination von 6 ng/Well von pECE-SV40-Gal4-VP16 und 3 ng/Well pFA-CMV-TLX cotransfiziert mit 100 ng/Well pFR-Luc und 1 ng/Well pRL-SV40 den Anforderungen zu entsprechen (siehe Abbildung 20 A).

Durch die Modifikation des konventionellen Gal4-Reporterassays unter Verwendung des potenten Transkriptionsaktivators Gal4-VP16 wurde ein Werkzeug generiert, das die Untersuchung der TLX-LBD-Funktionalität im Gal4-Format erlaubte. Dabei sind folgende Punkte als Vorteile anzusehen:

- a) Es kann eine bidirektionale Modulation (potentielle Zunahme bzw. Abnahme der RLE) observiert werden.
- b) Durch Kontrollexperimente auf mit pECE-SV40-Gal4-VP16 transfizierten HEK293T-Zellen können nicht-TLX-vermittelte Effekte (insbesondere Gal4-VP16-vermittelt) identifiziert werden.
- c) Die transkriptionsaktivierende Wirkung von Gal4-VP16 in Kombination mit Gal4-TLX lässt sich auch auf andere konstitutive, repressive NRs im Gal4-Format übertragen, sodass diese Methode universell anwendbar ist.

4.1.4 Mutagenese von Gal4-TLX zur Identifizierung einer potentiellen Ligandenbindungstasche

Da wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben die strukturelle Information von TLX sehr limitiert ist und die Homologiemodellierung von Benod *et al.* eine klassische, orthosterische und geräumige Ligandenbindungstasche suggerierte, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese verschiedene pFA-CMV-TLX-Mutanten im Gal4-Reporterassay unter Verwendung von pECE-SV40-Gal4-VP16 evaluiert. Dabei wurden Aminosäuren adressiert, die in einer inneren, hydrophoben, potentiellen Ligandenbindungstasche vorzufinden waren (siehe Abbildung 21). Die pFA-CMV-TLX-Mutanten pFA-CMV-TLX_{A189E}, pFA-CMV-TLX_{L268R}, pFA-CMV-TLX_{A189E|L268R}, pFA-CMV-TLX_{F226W|I230E}, pFA-CMV-TLX_{A189E|F226W|I230E} und pFA-CMV-TLX_{A189E|F226W|I230E|L268R} wurden verwendet und von Dr. Jan Heering (Fraunhofer Institut für Translationale Medizin) kloniert.

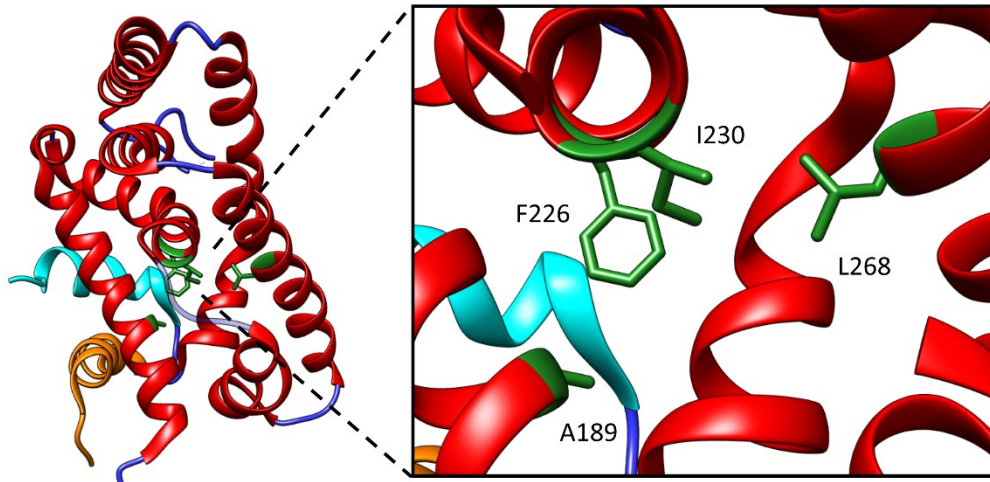


Abbildung 21: Darstellung der adressierten Aminosäuren zur ortsgerichteten Mutagenese. Basierend auf der Kristallstruktur von Zhi *et al.* wurden Alanin189, Phenylalanin226, Isoleucin230 und Leucin268 zur ortsgerichteten Mutagenese adressiert (pdb-Eintrag: 4XAJ)¹⁰⁸.

Durch Cotransfektion der pFA-CMV-TLX-Mutanten mit pECE-SV40-Gal4-VP16 konnte die intrinsische Aktivität der Mutanten evaluiert werden. Ähnlich wie pFA-CMV-TLX wurde durch Cotransfektion mit pFA-CMV-TLX_{A189E} oder pFA-CMV-TLX_{F226W|I230} die Gal4-VP16-induzierte Firefly-Luciferase-Lumineszenz stark vermindert, sodass diese Mutanten eine ähnliche Aktivität wie der Gal4-TLX-Wildtyp besaßen. Die restlichen Mutanten zeigten diese Aktivität nicht bzw. nur sehr schwach und wurden als nicht funktional angesehen (siehe Abbildung 22).

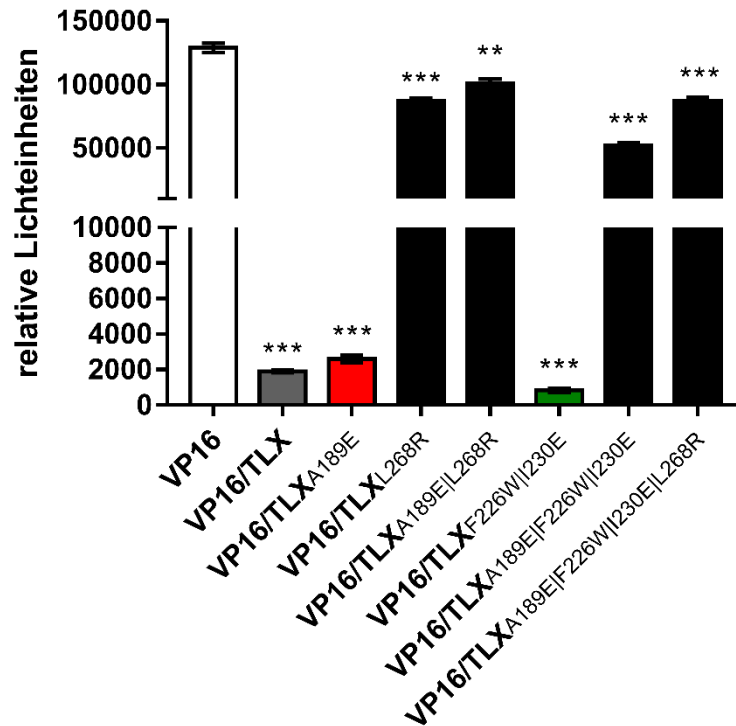


Abbildung 22: Aktivität der Gal4-TLX-Mutanten im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. pECE-SV40-VP16 (6 ng/Well) wurde in HEK293T-Zellen in separaten Experimenten mit den entsprechenden pFA-CMV-TLX Mutanten (3 ng/Well) cotransfiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen mit nicht pFA-CMV-TLX transfizierten Zellen analysiert. $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Somit wurde der pFA-CMV-TLX/pECE-SV40-Gal4-VP16-Reporterassay mit den funktionalen pECE-SV40-Gal4-VP16/pFA-CMV-TLXA189E und pECE-SV40-Gal4-VP16/pFA-CMV-TLXF226WII230 Systemen ergänzt. Diese Setups stellen bei der Charakterisierung kleiner organischer Moleküle ein hilfreiches Werkzeug dar, weil mögliche Verschiebungen der Dosis-Wirkungskurven im Vergleich zum Gal4-TLX-Wildtyp Rückschlüsse auf eine mögliche Lokalisierung einer Bindungsregion erlauben.

4.1.5 Heterodimerisierung von Gal4-TLX und VP16-RXR α

TLX ist aufgrund der relativ hohen Sequenzidentität mit RXR α stark verwandt. Als universeller Heterodimerisierungspartner (siehe Kapitel 1.3.2.1) ist RXR α in der Lage mit zahlreichen NRs zu interagieren. Der Gedanke liegt daher nicht allzu fern, dass RXR α potentiell auch mit TLX durch einen bisher unbekanntem Heterodimerisierungsmechanismus agieren könnte, was in Kooperation mit Dr. Jan Heering und Dr. Whitney Kilu in orthogonalen HTRF-Experimenten (engl. *homogeneous time-resolved fluorescence*, HTRF) gezeigt werden konnte (siehe spätere Kapitel). Um diese Beobachtung in einem zellulären System zu validieren, wurde das Plasmid

pFTI-CMV-VP16-RXR α (kloniert durch Dr. Jan Heering) durch zusätzliche Cotransfektion mit pFA-CMV-TLX, pFR-Luc und pRL-SV40 in HEK293T-Zellen verwendet, welches ein VP16-RXR α Fusionsprotein kodiert, das durch die fehlende Gal4-DBD nicht in der Lage ist, alleine die Expression des Gal4-abhängigen Reportergens zu induzieren. Somit wäre eine pFTI-CMV-VP16-RXR α -abhängige Zunahme der RLE in Kombination mit pFA-CMV-TLX nur durch einen indirekten Mechanismus, nämlich die Dimerisierung mit einem Gal4-NR Hybridrezeptor, möglich.

Tatsächlich konnte diese Hypothese durch Cotransfektion verschiedener pFTI-CMV-VP16-RXR α Gruppen (3, 6 und 12 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0,5, 1, 3 und 6 ng/Well) bestätigt werden. Um falsch positive Ergebnisse durch eine mögliche, unspezifische VP16-TLX-Interaktion auszuschließen, wurde pECE-SV40-Gal4-VP16 (6 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLXonly - ein Plasmidkonstrukt, das nur die TLX-LBD kodiert - cotransfiziert. Hierbei konnte keine konzentrationsabhängige Zunahme bzw. Abnahme der RLEs detektiert werden, sodass die vorherige Beobachtung nur über einen RXR α -TLX-Heterodimerisierungsmechanismus ablaufen musste (siehe Abbildung 23).

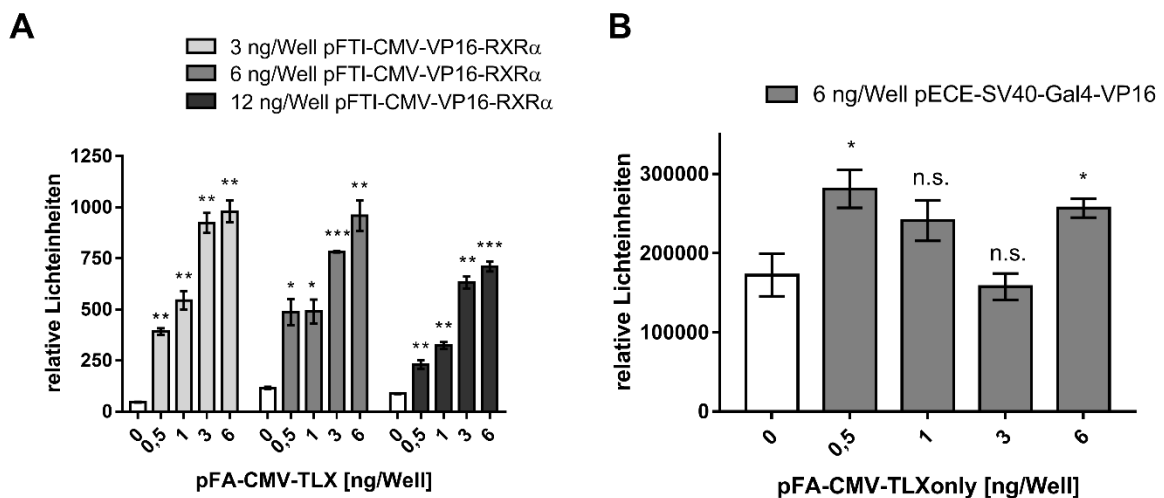


Abbildung 23: Untersuchung eines potentiellen RXR α -TLX-Heterodimerisierungsmechanismus. HEK293T-Zellen wurden mit pFR-Luc (100 ng/Well) und pRL-SV40 (1 ng/Well) transfiziert. **A**) Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pFTI-CMV-VP16-RXR α (3, 6 und 12 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well jeweils). **B**) Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pECE-SV40-Gal4-VP16 (6 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFA-CMV-TLXonly (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well jeweils). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen mit nicht pFA-CMV-TLX bzw. pFA-CMV-TLXonly transfizierten Zellen analysiert. $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Somit stellt auch der pFA-CMV-TLX/pFTI-VP16-RXR α -Reporterassay ein hilfreiches *in vitro* Werkzeug zur Charakterisierung potentieller TLX-Liganden dar. Da die pharmakologische Wirkung von NRs ebenfalls über komplexe Dimerisierungsgleichgewichte bestimmt wird, kann mit Hilfe dieser Reporterassayvariante eine TLX-ligandenabhängige Modulation der RXR α -TLX-Heterodimer-vermittelten Reporterassaymodulation auf zellulärer Ebene studiert werden.

4.1.6 TLX als Transkriptionsaktivator im Volllängenformat

Neben den Gal4-basierten Reporterassays wurde ein weniger artifizieller Reporterassay etabliert, der das TLX-Vollängenprotein, kodiert durch pFA-CMV-TLXfull (kloniert durch Dr. Jan Heering), verwendet. Dementsprechend wurde auch ein anderes Reporterplasmid verwendet, welches ein TLX-spezifisches HRE besitzen musste. Basierend auf den Arbeiten von Iwahara *et al.*¹³⁶ wurde gezeigt, dass das TLX-aktivierende Element (engl. *TLX activating element*, TAE) mit der Sequenz TCACGTGACGG als TLX-RE fungieren kann. Hierbei konnten die Autoren in HEK293T-Zellen zeigen, dass Reporterplasmide mit der TAE-Sequenz durch TLX induziert werden konnten. Daher wurde das Plasmid pFR-TAE-Luc kloniert (Dr. Jan Heering), in dem die Gal4-Bindungsstelle durch eine Wiederholung der TAE-Sequenz ersetzt wurde. Die Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pFA-CMV-TLXfull (5, 10, 25 und 50 ng/Well) und pFR-TAE-Luc (25, 50 und 100 ng/Well) sowie pRL-SV40 lieferte eine TLX-Vollängenprotein-konzentrationsabhängige Zunahme der RLEs (siehe Abbildung 24).

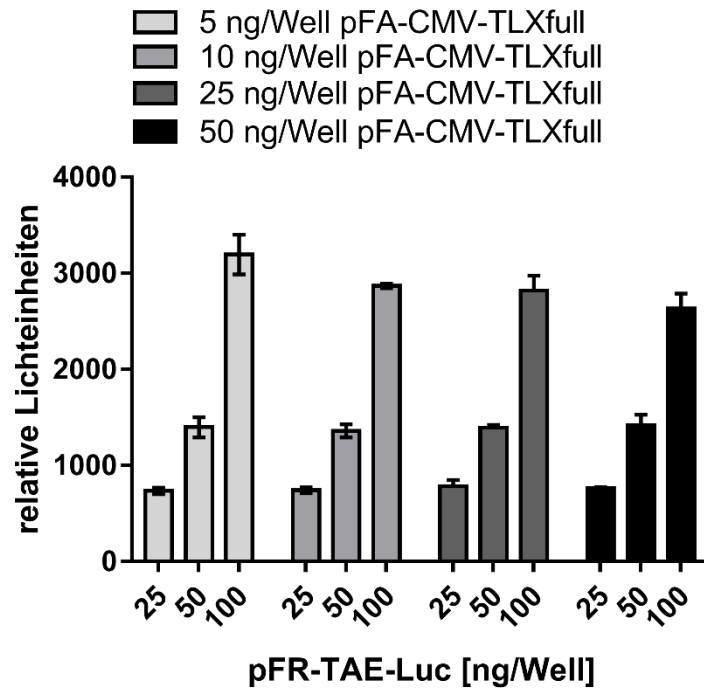


Abbildung 24: TLXfull/TAE-Reporterassay in HEK293T-Zellen. Cotransfektion von HEK293T-Zellen mit pRL-SV40 (1 ng/Well), pFA-CMV-TLXfull (5, 10, 25 und 50 ng/Well) mit zunehmender Menge an pFR-TAE-Luc (25, 50 und 100 ng/Well jeweils). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt.

Während Gal4-TLX eine Repressoraktivität zeigte, fungierte das TLX-Volllängenprotein an pFR-TAE-Luc als schwacher, konstitutiver Transkriptionsaktivator. Der TLX-Volllängenassay erlaubte somit als orthogonales Experiment zum pFA-CMV-TLX/pECE-SV40-Gal4-VP16-Reporterassay eine zusätzliche Validierung der Aktivierung von TLX-Liganden.

4.1.7 Übersicht der etablierten TLX-Reporterassays

Als Grundlage für die Identifikation und Charakterisierung von TLX-Liganden wurden vier verschiedene zelluläre Assaysysteme zur *in vitro* Charakterisierung von kleinen organischen Molekülen etabliert. Der pFA-CMV-TLX/pECE-SV40-Gal4-VP16-Reporterassay erlaubt eine primäre Identifizierung von TLX-Modulatoren. Dieses Setup ermöglicht darüber hinaus die Untersuchung unspezifischer Effekte durch Kontrollexperimente an Gal4-VP16. In gleicher Weise können statt des Gal4-TLX-Konstrukts die entwickelten Mutanten verwendet werden, um eine potentielle Bindungsregion zu lokalisieren (siehe Abbildung 25 A). Wird statt pECE-SV40-Gal4-VP16 das Plasmid pFTI-CMV-VP16-RXR α verwendet, kann eine RXR α -TLX-Heterodimer-vermittelte Reporterinduktion untersucht werden, die theoretisch auch durch TLX-Liganden modulierbar wäre. Dieser Reporterassay gibt damit neue

mechanistische Einblicke in die Funktionsweise von TLX (siehe Abbildung 25 B). Um die Modulation von TLX in der entsprechenden nativen Form zu erfassen, wurde ein TLX-Volllängenkonstrukt pFA-CMV-TLXfull und als dazugehöriges Reporterplasmid pFR-TAE-Luc angewendet. In diesem System ist das TLX-Volllängenprotein in der Lage das natürliche TAE-RE zu erkennen und die Reporterexpression zu induzieren. Allerdings kann hier nur eine Aktivitätsmodulation von TLX in monomerer Form beobachtet werden, da die TAE-Sequenz nur als eine Wiederholung dem Reporter gen vorgeschaltet ist. Somit können potentielle, homodimerabhängige Effekte nicht erfasst werden, welche aber in orthogonalen HTRF-basierten Versuchen beobachtet wurden (siehe spätere Kapitel) (siehe Abbildung 25 C).

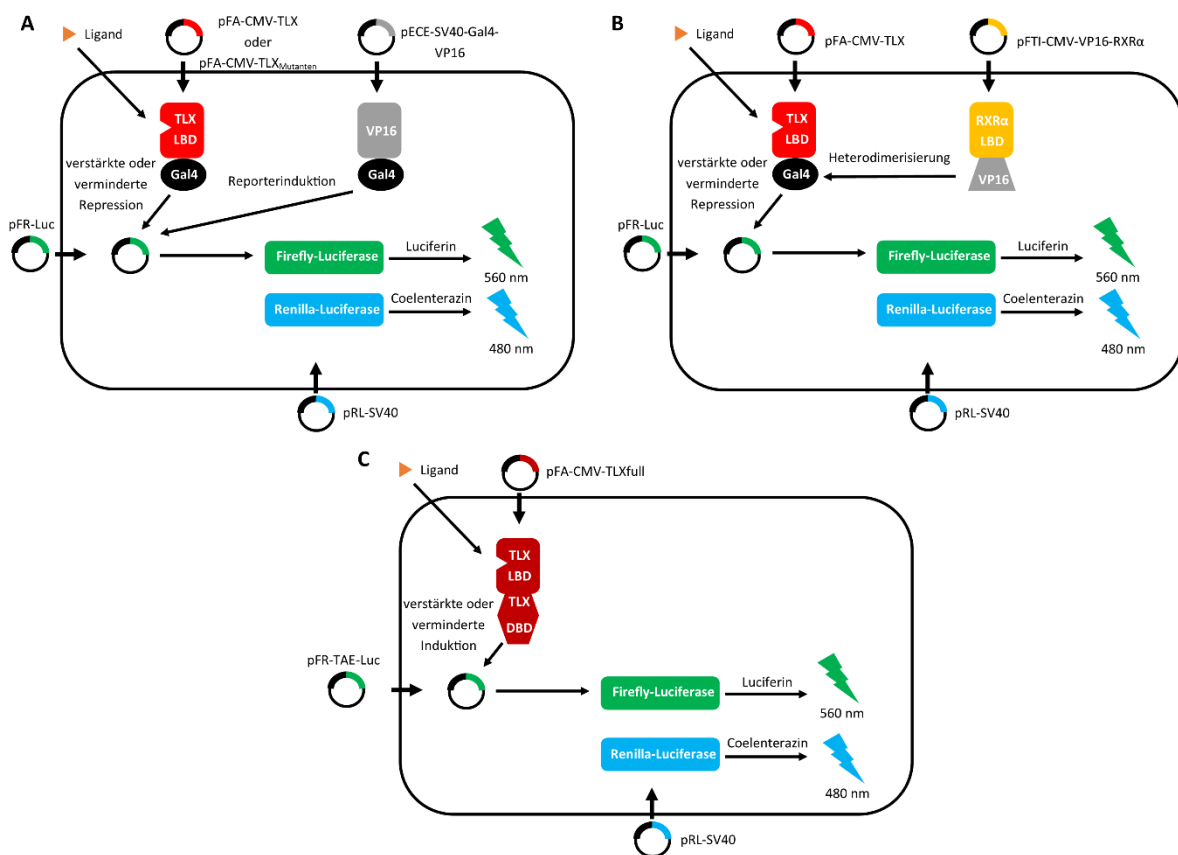


Abbildung 25: Modelle der etablierten TLX-Reporterassays. **A)** Zur primären Identifizierung von TLX-Modulatoren werden HEK293T-Zellen mit pFR-Luc, pRL-SV40, pECE-SV40-Gal4-VP16 und den jeweiligen Gal4-basierten TLX-Konstrukten transfiziert. **B)** Zur Evaluation einer RXRα-TLX-Heterodimer-vermittelten Reporterexpression werden HEK293T-Zellen mit pFR-Luc, pRL-SV40, pFA-CMV-TLX und pFTI-CMV-VP16-RXRα transfiziert. **C)** Zur orthogonalen Validierung primärer Treffer werden HEK293T-Zellen mit pFR-TAE-Luc, pRL-SV40 und pFA-CMV-TLXfull transfiziert.

Folgende Bedingungen wurden im Laufe dieser Arbeit nach Optimierung der Plasmidmengen verwendet.

Tabelle 2: Optimierte Plasmidmengen der jeweiligen Reporterassays.

Assay A (Gal4)		Assay B (Gal4)		Assay C (Volllänge)	
pFR-Luc	100 ng	pFR-Luc	100 ng	pFR-TAE-Luc	100 ng
pRL-SV40	1 ng	pRL-SV40	1 ng	pRL-SV40	2 ng
pECE-SV40- Gal4-VP16	6 ng	pFA-CMV-TLX	3 ng	pFA-CMV- TLXfull	5 ng
pFA-CMV- TLX/Mutanten	3 ng	pFTI-VP16- RXR α	3 ng		

Zur Vereinfachung werden im Laufe dieser Arbeit der Reporterassays unter Assay A als Gal4-TLX/Gal4-VP16- bzw. Gal4-TLX_{Mutant}/Gal4-VP16-Reporterassays, Assay B als VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay und Assay C als TLXfull/TAE-Reporterassay bezeichnet (siehe Tabelle 2).

4.1.8 Definition von TLX-Agonisten/Antagonisten und inversen TLX-Agonisten

Die allgemeine und gängige Definition von Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten und inversen Rezeptoragonisten lässt sich anhand eines Zwei-Zustände-Modells illustrieren. Dieses Modell setzt voraus, dass ein Rezeptor in einem dynamischen Gleichgewicht aus aktiven und inaktiven Konformationen vorliegt. Typischerweise wird angenommen, dass ein Rezeptor ohne Ligandenstimulation überwiegend inaktive Konformationen einnimmt. Allerdings gibt es auch Fälle, in denen Rezeptoren in Abwesenheit von Liganden aktive Zustände besetzen und als konstitutiv aktive Rezeptoren aufzufassen sind (siehe Abbildung 26 A). In diesem klassischen Bild verschieben Rezeptoragonisten durch Bindung an aktive Rezeptorkonformationen das Gleichgewicht weitgehend zur aktiven Rezeptorkonformationsseite (siehe Abbildung 26 B), wohingegen (neutrale) Rezeptorantagonisten durch Bindung der inaktiven Konformationen die Aktivierung durch Agonisten herabsetzen (siehe Abbildung 26 C). Inverse Agonisten hingegen vermindern durch Bindung und Stabilisierung des inaktiven Zustands die aktiven Konformationen (siehe Abbildung 26 D)¹³⁷. Ähnliche Überlegungen sind daher anhand der bisherigen Ergebnisse auf TLX übertragbar, dessen Expression sowohl im Gal4-Hybridformat als auch als Volllängenprotein eine konstitutive Aktivität zeigen.

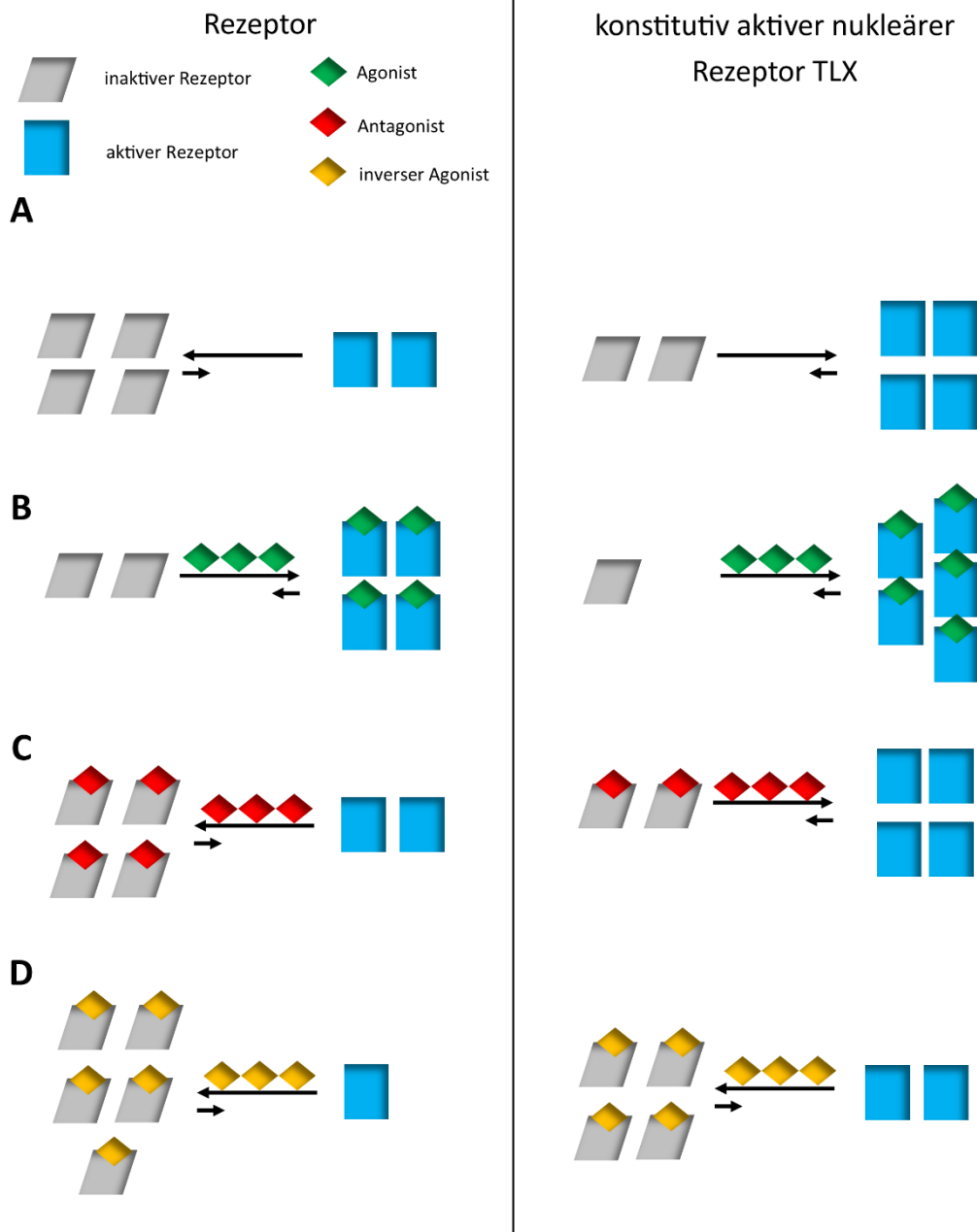


Abbildung 26: Darstellung des Zwei-Zustände-Modells. **A)** Im ungebundenen Zustand liegen Rezeptoren in inaktiven Konformationen vor. Bei konstitutiv aktiven Rezeptoren wird der gegensätzliche Fall angenommen. **B)** Agonisten verschieben das Gleichgewicht auf die Seite der aktiven Rezeptorkonformationen. Gleiches ist für konstitutiv aktive Rezeptoren anzunehmen. **C)** Antagonisten vermindern die Bindung eines Agonisten, welches das Gleichgewicht auf die inaktiven Rezeptorkonformationen verschiebt. Für konstitutiv aktive Rezeptoren liegt das Gleichgewicht wie im ungebundenen Zustand vor. **D)** Inverse Agonisten reduzieren durch Bindung den Anteil der aktiven Rezeptorkonformationen.

Die vorhandenen Ergebnisse haben gezeigt, dass apo-Gal4-TLX im Hybridformat eine starke konstitutive repressive Wirkung auf die Transkriptionsaktivität von Gal4-VP16 ausübt. Für

einen inversen Agonisten ist daher zu erwarten, dass durch Reduktion der aktiven Gal4-TLX-Konformationen die transrepressive Wirkung sinkt, sodass die Gal4-VP16-vermittelte Reporterinduktion steigt. Folglich sollte sich die Modulation durch einen Agonisten durch die Verschiebung auf die Gleichgewichtsseite der aktiven transrepressiven Gal4-TLX-Konformationen anhand eines verringerten Reportersignals widerspiegeln. Da fünf Gal4-Erkennungssequenzen dem Reporter gen vorgeschaltet sind, sind hier ebenfalls potentielle oligomere Gal4-TLX/Gal4-VP16-Effekte observierbar (siehe Abbildung 27 A). Entgegengesetzte Effekte sind hingegen im TLXfull/TAE-Reporter gen assay zu erwarten, da hier die konstitutiv aktive Konformation des TLX-Volllängenproteins zu einer schwachen Transkriptionsaktivität (im Vergleich zur starken transrepressiven Wirkung von Gal4-TLX) des Reporter gens führt. Demnach ist für einen inversen Agonisten ein vermindertes Reportersignal anzunehmen, wohingegen ein Agonist den gegenteiligen Effekt erwarten lässt (siehe Abbildung 27 B).

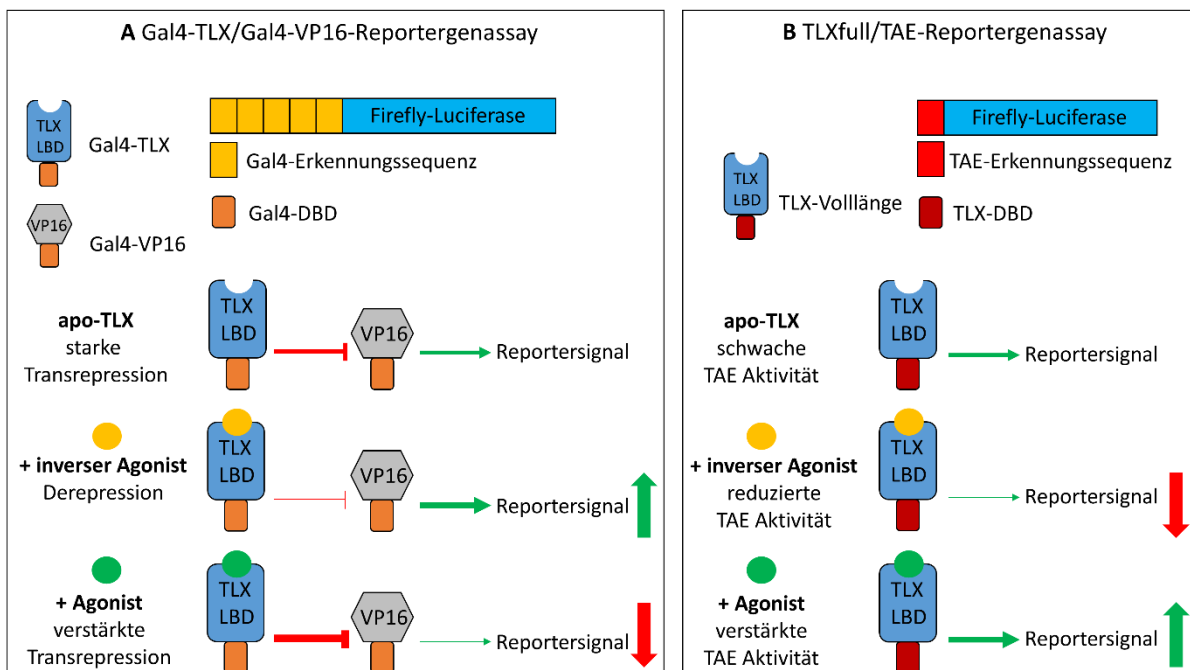


Abbildung 27: Modelle zur Wirkung von Agonisten und inversen Agonisten auf TLX im Gal4-Hybridformat (A) und auf das TLX-Volllängenprotein (B).

4.2 Validierung literaturbekannter Referenzliganden

Die Referenzliganden ccrp1 (**1**), ccrp2 (**2**), ccrp3 (**3**), BMS453 (**7**) und ATRAL (**8**) wurden im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay auf ihre Aktivität an TLX untersucht (siehe Abbildung 28). Hierbei konnte für ccrp1 (**1**) (30 μM) und ccrp3 (**3**) (10 μM) keine signifikante Aktivität bei Konzentrationen oberhalb der publizierten EC_{50} -Werte im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay verzeichnet werden (**1**: $\text{EC}_{50} = (9,2 \pm 1,0) \mu\text{M}$; **3**: $\text{EC}_{50} = (0,25 \pm 0,1) \mu\text{M}$)¹⁰⁹ (siehe Abbildung 28 A). Nur ccrp2 (**2**) (30 μM) zeigte eine signifikante Reportermodulation im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay im Vergleich zu Gal4-VP16 (**2**: $\text{EC}_{50} = (1,0 \pm 0,3) \mu\text{M}$)¹⁰⁹. Ebenfalls konnte bei einer Aktivitätstestung im TLXfull/TAE-Reporterassay für ccrp2 (**2**) und ccrp3 (**3**) keine Dosis-Wirkungskurve erhalten werden. Nur ccrp1 (**1**) führte ab 30 μM zu einer verringerten x-fachen Reporteraktivierung, was aber anhand der Renilla-Luciferase Werte auf toxische Effekte zurückzuführen war (siehe Abbildung 28 B). Die Referenzliganden BMS453 (**7**) (10 μM) und ATRAL (**8**) (30 μM) wurden ebenfalls auf eine Aktivität im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay oberhalb der publizierten Potenzen auf eine Aktivität an TLX getestet (**7**: Gal4-TLX $\text{IC}_{50} = 0,367 \mu\text{M}$ und TLX-Volllängenassay $\text{IC}_{50} = 0,159 \mu\text{M}$; **8**: Gal4-TLX $\text{EC}_{50} = 1,72 \mu\text{M}$)¹²⁰. Zwar führten BMS453 (**7**) und ATRAL (**8**) zu verminderten x-fachen Reporteraktivierungen, allerdings zeigten die Kontrollexperimente an Gal4-VP16 alleine ebenfalls verminderte Reportersignale, was auf eine Involvierung unspezifischer Effekte und nicht eindeutig auf eine spezifische Aktivität an TLX zurückzuführen war (siehe Abbildung 28 C). Theoretisch spiegelten BMS453 (**7**) und ATRAL (**8**) Agonisten wider (siehe Kapitel 4.1.8). Die orthogonale Aktivitätstestung im TLXfull/TAE-Reporterassay zeigte im Rahmen von Dosis-Wirkungskurven aber auch sinkende Aktivitäten an TLX und wies somit zusätzlich auf unspezifische Effekte hin, sodass die Rolle als TLX-Agonist fraglich war (siehe Abbildung 28 D). In der Gesamtbetrachtung konnten die publizierten Aktivitäten nicht in den etablierten Reporterassays reproduziert werden.

Gal4-TLX/Gal4-VP16

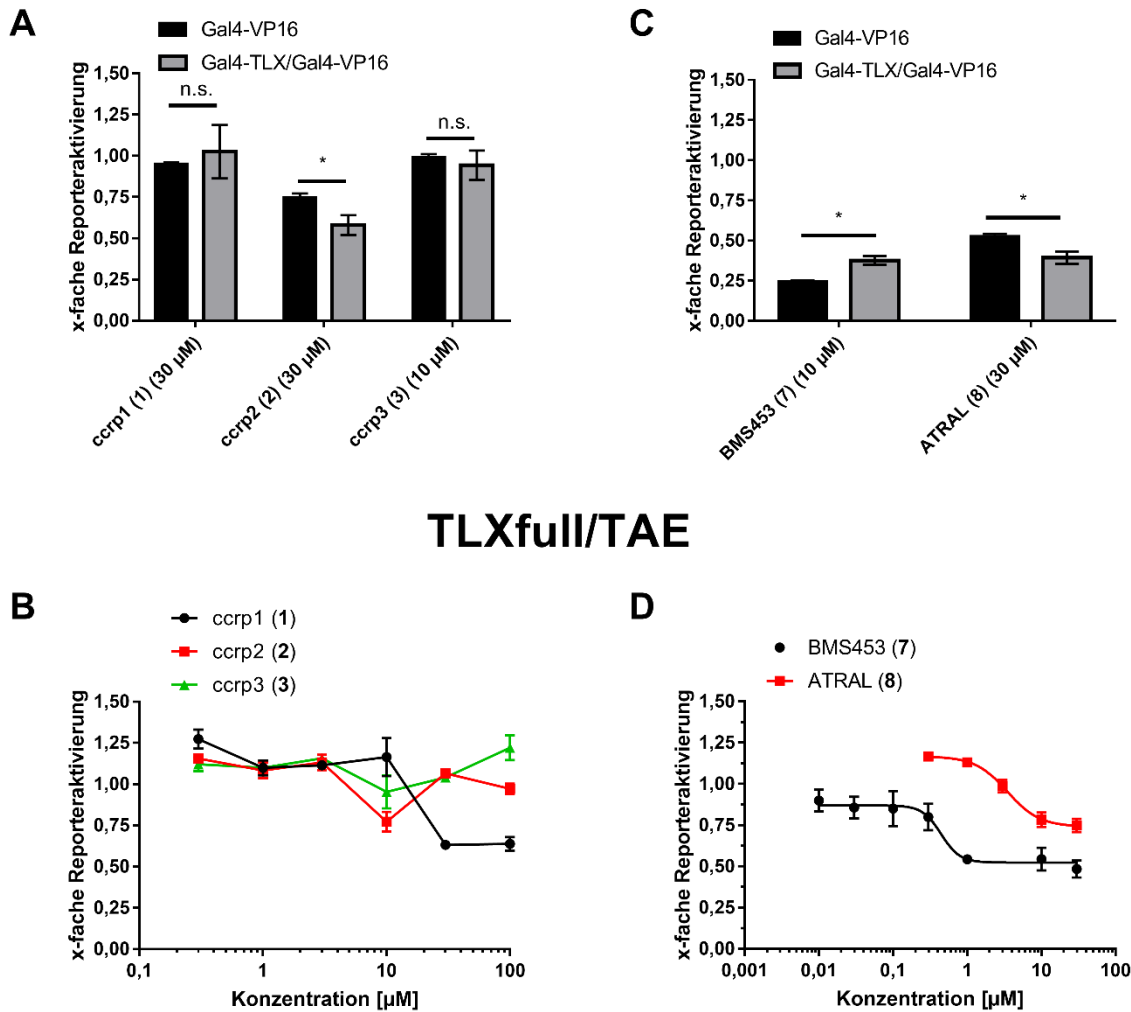


Abbildung 28: Validierung der Referenzliganden. Aktivitätstestung von ccrp1 (1), ccrp2 (2), ccrp3 (3), BMS453 (7) und ATRAL (8) im Gal4-TLX/Gal4-VP16- (A und C) und TLXfull/TAE-Reporterassay (B und D). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

4.3 Screening einer Wirkstofffragmentbibliothek

Da die Verfügbarkeit von validen TLX-Liganden sehr limitiert ist, ist die Identifizierung weiterer kleiner organischer Moleküle als potentielle TLX-Liganden von großem Interesse. Nachdem durch die vorherige Assayetablierung diverse Systeme zur Identifizierung von TLX-Modulatoren verfügbar waren, wurde die kommerziell erhältliche Prestwick-Wirkstofffragmentbibliothek auf eine Aktivität an TLX gescreent. Diese Bibliothek stellt eine Sammlung von 480 kleinen, strukturdiversen Fragmenten dar, die in - von der *Food and Drug Administration* (FDA) - zugelassenen Arzneistoffe häufige Kernstrukturen darstellen und somit

optimal für die Abdeckung einer großen Strukturdiversität geeignet war¹³⁸. Da es sich um kleine Wirkstofffragmente handelt, erfüllen viele die „*Rule of Three*“-Regel. Analog zu Lipinski's „*Rule of Five*“ beschreibt die „*Rule of Three*“-Regel einen Leitsatz zur Entwicklung von fragmentbasierten Bibliotheken mit verbesserten physikochemischen Eigenschaften^{139,140}. Demnach sollten Fragmente folgende Eigenschaften besitzen¹⁴¹:

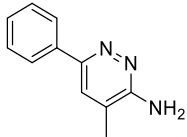
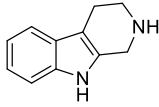
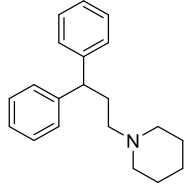
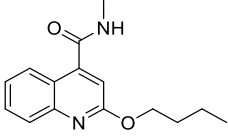
- a) Molekulargewicht < 300 g/mol
- b) Anzahl der Wasserstoffbrückendonatoren ≤ 3
- c) Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren ≤ 3
- d) $\text{clogP} \leq 3$
- e) Anzahl der rotierbaren Bindungen ≤ 3
- f) polare Oberfläche $\leq 60 \text{ \AA}^2$

Um erste Trefferkandidaten zu identifizieren, wurde die Bibliothek im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay in zwei unabhängigen Experimenten bei einer Substanzkonzentration von 100 μM in HEK293T-Zellen auf eine potentielle TLX-Modulation getestet. Um die Trefferrate und die Anzahl falsch positiver Kandidaten zu vermindern, wurden im weiteren Verlauf nur noch Fragmente mit einer x-fachen Reporteraktivierung $\leq 0,5$ (Agonisten) bzw. $\geq 1,5$ (inverse Agonisten) betrachtet. Nach manueller Inspektion und Aussortierung zahlreicher Substanzen anhand von toxischen Effekten (anhand der Renilla-Luciferase Werte) wurde eine Anzahl von 24 Fragmenten (**26-49**), die ebenfalls für eine potentielle SAR-Studie und weitere fragmentbasierte Ansätze einen attraktiven Ausgangspunkt darstellten, in darauffolgenden Experimenten auf ihre Aktivität an TLX validiert (siehe Tabelle 3). Für sieben Fragmente (**26, 33, 40, 41, 42, 43** und **44**) konnte die Aktivität aus dem primären Screening nicht reproduziert werden, sodass diese Substanzen als falsch positive Treffer kategorisiert wurden. Die restlichen Verbindungen haben eine Aktivität im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay gezeigt. Hierbei konnten sowohl Trefferkandidaten identifiziert werden, die die intrinsische TLX-Repressoraktivität verstärkten (**27, 28, 29-32, 35-38, 45, 46, 48** und **49**) und somit als potentielle TLX-Agonisten zu werten waren. Gleichzeitig konnten erstmals Verbindungen charakterisiert werden, die die TLX-Repressoraktivität verminderten (**34, 39** und **47**) und daher als potentielle inverse TLX-Agonisten fungierten. Die Aktivität an TLX wurde durch die Wiederholung eines Kontroll-experiments auf Gal4-VP16 bestätigt. Zwar zeigten **32** (100 μM), **36** (30 μM) und **37** (100 μM) eine Aktivität an Gal4-VP16, allerdings war die Aktivität im

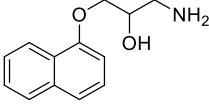
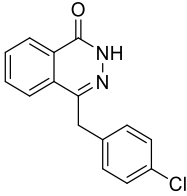
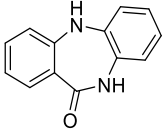
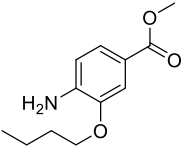
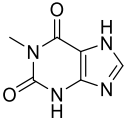
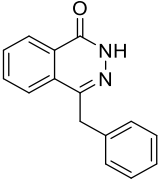
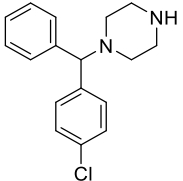
Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay signifikant stärker, sodass von einer TLX-Modulation ausgegangen werden konnte. Verbindung **44** (30 μM) wies im Gal4-VP16 System stärkere Effekte als in der Gal4-TLX/Gal4-VP16-Kombination auf, sodass eine klare TLX-spezifische Modulation nicht zu verzeichnen war. Alle validierten Kandidaten (**27-32**, **34-39** und **45-49**) wurden im zellfreien DSF-Experiment bei einer Konzentration von 500 μM auf eine Proteinschmelzpunktverschiebung (ΔT_s) von rekombinantem TLX-LBD-Protein untersucht. Hierbei konnten positive Proteinschmelzpunktverschiebungen ($\Delta T_s = 0,4-2,4$ °C für **27**, **29-32**, **34**, **38**, **39** und **46-48**) als Hinweis eines stabilisierenden Effekts der globalen Struktur nach Bindung nachgewiesen werden. Negative Proteinschmelzpunktverschiebungen ($\Delta T_s = -3,2-(-0,3)$ °C für **28**, **35-37**, **45** und **49**) wurden ebenfalls ermittelt und deuteten auf einen destabilisierenden Effekt der TLX-LBD nach Ligandenbindung hin (siehe Tabelle 3). Dieser Befund ist kein weit verbreiteter Effekt, allerdings konnten Benod *et al.* ähnliche Tendenzen für *ccrp1* (**1**), *ccrp2* (**2**) und *ccrp3* (**3**) verzeichnen¹⁰⁹.

Ergebnisse und Diskussion

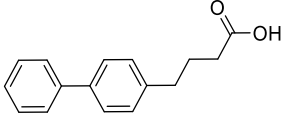
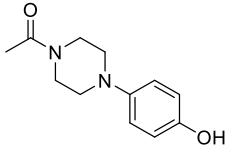
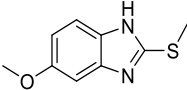
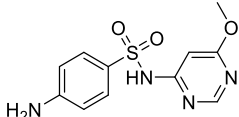
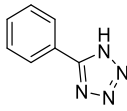
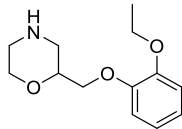
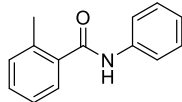
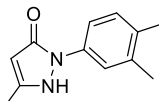
Tabelle 3: Übersicht ausgewählter Wirkstofffragemente aus dem Prestwick-Wirkstofffragmentscreening. Struktur der Wirkstofffragmente **26-49**. Dargestellt ist die x-fache Reporteraktivierung im primären Gal4-TLX/Gal4-VP16-Screening bei einer Konzentration von 100 μM (unbehandelte 0,4 % DMSO-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 2$), die ermittelten $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$ -Werte mit den entsprechenden maximalen bzw. minimalen x-fachen Reporteraktivierungen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$) und die Schmelzpunktverschiebung (ΔT_s) von rekombinanten TLX-LBD-Protein im DSF-Experiment bei einer Substanzkonzentration von 500 μM (unbehandelte 5 % DMSO-Kontrolle, Mittelwert, $n = 3$). Alle aktiven Derivate (**27-32**, **34-39** und **45-49**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's t*-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < \text{x-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration wurden unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) als inaktiv klassifiziert.

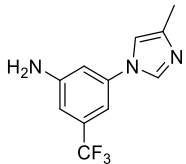
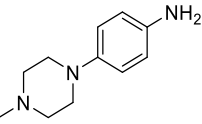
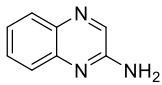
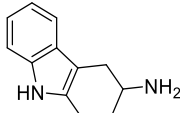
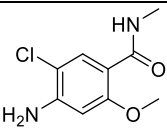
Struktur	x-fache Reporteraktivierung bei 100 μM im primären Gal4-TLX/Gal4-VP16-Screening	$\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$ in Gal4-TLX/Gal4-VP16 [μM] und max./min. x-fache Reporteraktivierung	ΔT_s [$^{\circ}\text{C}$]
 <p>01A04 26</p>	0,49 \pm 0,03	inaktiv (100 μM)	-
 <p>01A08 27</p>	0,47 \pm 0,03	$\text{EC}_{50} = (74 \pm 18) \mu\text{M}$ 0,39 \pm 0,11	1,2
 <p>01C06 28</p>	0,48 \pm 0,18	$\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{M}$	-0,5
 <p>01C08 29</p>	0,32 \pm 0,06	$\text{EC}_{50} = (10 \pm 4) \mu\text{M}$ 0,64 \pm 0,08	1,2

Ergebnisse und Diskussion

 01E04 30	$0,27 \pm 0,08$	$EC_{50} = (19,4 \pm 0,9) \mu M$ $0,07 \pm 0,03$	1,5
 01F08 31	$0,39 \pm 0,11$	$EC_{50} = (8 \pm 4) \mu M$ $0,56 \pm 0,06$	0,4
 01H09 32	$0,47 \pm 0,05$	$EC_{50} = (17,3 \pm 1,8) \mu M$ $0,54 \pm 0,04$	0,6
 02B07 33	$0,45 \pm 0,18$	inaktiv (100 μM)	-
 03A02 34	$3,3 \pm 0,3$	$IC_{50} = (9 \pm 3) \mu M$ $2,3 \pm 0,3$	1,1
 03G04 35	$0,17 \pm 0,07$	$EC_{50} = (8 \pm 3) \mu M$ $0,34 \pm 0,08$	-0,5
 03H10 36	$0,366 \pm 0,008$	$EC_{50} = (22 \pm 4) \mu M$ $0,31 \pm 0,10$	-2,3

Ergebnisse und Diskussion

 03H11 37	$0,34 \pm 0,04$	$EC_{50} = (14 \pm 8) \mu M$ $0,43 \pm 0,13$	-1,4
 04D10 38	$0,45 \pm 0,17$	$EC_{50} = (22 \pm 4) \mu M$ $0,36 \pm 0,06$	0,8
 04E11 39	$2,7 \pm 0,5$	$IC_{50} = (7 \pm 3) \mu M$ $2,03 \pm 0,12$	0,5
 04H04 40	$0,38 \pm 0,05$	inaktiv (100 μM)	-
 05F02 41	$2,2 \pm 0,7$	inaktiv (100 μM)	-
 05G02 42	$1,50 \pm 0,03$	inaktiv (100 μM)	-
 06A02 43	$2,2 \pm 0,4$	inaktiv (100 μM)	-
 06A03 44	$0,28 \pm 0,09$	inaktiv (30 μM)	-

 06A05 45	0,44 ± 0,04	EC ₅₀ = (20 ± 3) μM 0,26 ± 0,08	-3,2
 06C07 46	0,48 ± 0,11	EC ₅₀ > 100 μM	2,2
 06D02 47	2,9 ± 0,5	IC ₅₀ = (16,5 ± 2,0) μM 2,61 ± 0,07	1,2
 06E03 48	0,449 ± 0,006	EC ₅₀ = (67 ± 8) μM 0,50 ± 0,03	2,4
 06H08 49	0,463 ± 0,019	EC ₅₀ = (27 ± 8) μM 0,69 ± 0,10	-0,3

Sowohl die TLX-Agonisten (**27**, **29-32**, **35-38**, **45**, **48** und **49**) mit EC₅₀-Werten von 8-74 μM als auch inverse TLX-Agonisten (**34**, **39** und **47**) mit IC₅₀-Werten von 7-16,5 μM könnten als attraktive Startstrukturen zur Optimierung als *tool compounds* dienen.

Des Weiteren hoben die *in vitro* Daten fünf Fragmente ganz besonders durch ihre modulatorische Aktivität an TLX hervor. Der TLX-Agonist **30** (EC₅₀ = (19,4 ± 0,9) μM, minimale Reporteraktivierung = 0,07 ± 0,03) zeigte neben der moderaten Potenz durch eine sehr geringe minimale Reporteraktivierung eine nahezu vollständige TLX-vermittelte Unterdrückung des Reportersignals im Vergleich zu den restlichen TLX-Agonisten auf, was den Einsatz zur Studie an TLX besonders unterstrich. Mit den inversen TLX-Agonisten **34** (IC₅₀ = (9 ± 3) μM, maximale Reporteraktivierung = 2,3 ± 0,3), **39** (IC₅₀ = (7 ± 3) μM, maximale Reporteraktivierung = 2,03 ± 0,12) und **47** (IC₅₀ = (16,5 ± 2,0) μM, maximale Reporteraktivierung = 2,61 ± 0,07) wurden erstmalig Moleküle ausfindig gemacht, die durch

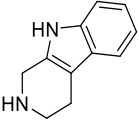
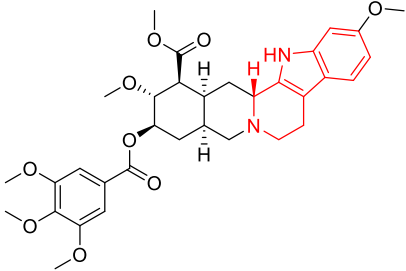
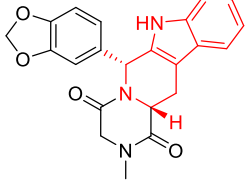
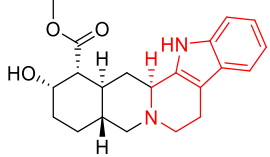
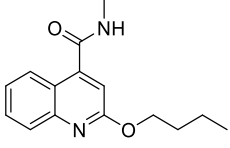
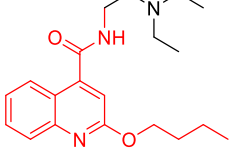
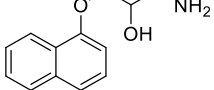
Verminderung der intrinsischen TLX-Transrepressorwirkung zu einer Erhöhung des Reportersignals führten und daher ebenfalls ein hohes Potential als *tool compounds* besaßen. Weiterhin fiel das Augenmerk ebenfalls auf Fragment **45** ($EC_{50} = (20 \pm 3) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,26 \pm 0,08$), dessen negative Proteinschmelzpunktverschiebung von $\Delta T_s = -3,2 \text{ }^\circ\text{C}$ eine eindeutige On-Target Adressierung durch Destabilisierung der TLX-LBD zeigte und daher ebenfalls zur weiteren Strukturoptimierung in Betracht gezogen wurde.

4.4 Screening diverser Wirkstoffe

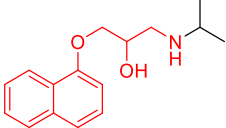
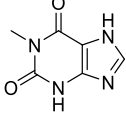
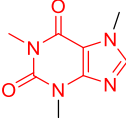
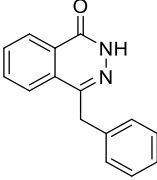
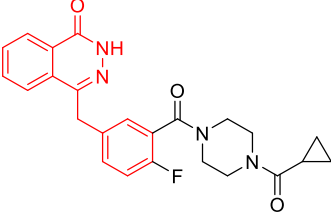
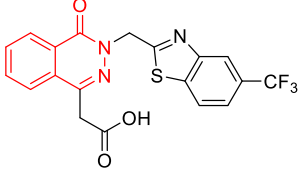
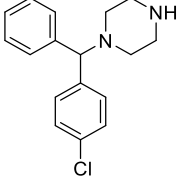
Die vorläufigen Ergebnisse demonstrierten die erfolgreiche TLX-Modulation durch kleine Arzneistofffragmente. Im nächsten naheliegenden Schritt wurden zugelassene Arzneistoffe (auch solche, die sich in späten Stadien der klinischen Zulassung befinden), die die aktiven Fragmentstrukturen enthielten, ebenfalls auf eine potentielle Aktivität an TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay geprüft, um erste Erkenntnisse zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten und möglicherweise weitere Leitstrukturen zu identifizieren. Anhand einer Substruktursuche wurden für **27**, **29**, **30**, **34-38**, **48** und **49** ausgewählte Arzneistoffe auf eine potentielle Aktivität an TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay untersucht (siehe Tabelle 4). Für die Fragmente **29** (mit Dibucain **53**), **36** (mit Buclizin **58**, Cetirizin **59**), **37** (mit Fenbufen **60**), **38** (mit Ketoconazol **61**) und **48** (mit Frovatriptan **62**) konnten keine TLX-modulierenden Arzneistoffe verzeichnet werden. Für aus den Fragmenten **27** (mit Reserpin **50**, Tadalafil **51**), **30** (mit Propranolol **54**), **34** (mit Koffein **55**), **35** (mit Zopolrestat **57**) und **49** (mit Cisaprid **63**) abgeleiteten Wirkstoffen konnten hingegen modulatorische Aktivitäten an TLX festgestellt werden. Ebenfalls wurden bei diesen Verbindungen unspezifische TLX-Effekte durch Kontrollexperimente auf Gal4-VP16 ausgeschlossen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über ausgewählte Arzneistoffe anhand einer Substruktursuche. Struktur der Arzneistoffe und entsprechender Startfragmente. Die enthaltene Fragmentstruktur im Arzneistoff ist rot hervorgehoben. Ermittelte EC_{50}/IC_{50} -Werte mit den entsprechenden maximalen bzw. minimalen x-fachen Reporteraktivierungen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$). Alle aktiven Wirkstoffe (**50**, **51**, **54**, **55**, **57** und **63**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's t*-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < \text{x-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert.

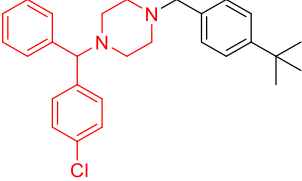
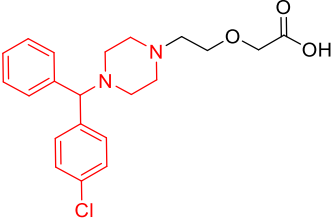
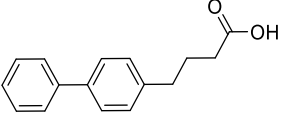
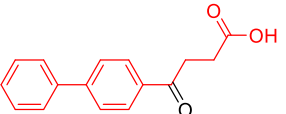
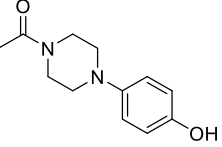
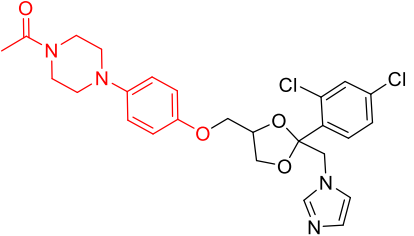
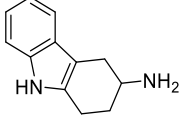
Ergebnisse und Diskussion

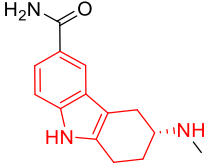
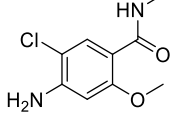
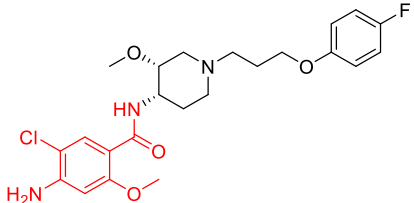
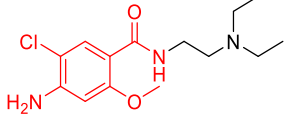
Struktur	EC ₅₀ /IC ₅₀ in Gal4-TLX/Gal4-VP16 [μM] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
 <p>01A08 27</p>	<p>EC₅₀ = (74 ± 18) μM 0,39 ± 0,11</p>
 <p>Reserpin 50</p>	<p>EC₅₀ = (0,5 ± 0,3) μM 0,55 ± 0,07</p>
 <p>Tadalafil 51</p>	<p>EC₅₀ = (4,6 ± 1,1) μM 0,62 ± 0,04</p>
 <p>Yohimbin 52</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>
 <p>01C08 29</p>	<p>EC₅₀ = (10 ± 4) μM 0,64 ± 0,08</p>
 <p>Dibucain 53</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>
 <p>01E04 30</p>	<p>EC₅₀ = (19,4 ± 0,9) μM 0,07 ± 0,03</p>

Ergebnisse und Diskussion

 <p>Propranolol 54</p>	<p>$EC_{50} = (32 \pm 4) \mu\text{M}$ $0,08 \pm 0,08$</p>
 <p>03A02 34</p>	<p>$IC_{50} = (9 \pm 3) \mu\text{M}$ $2,3 \pm 0,3$</p>
 <p>Koffein 55</p>	<p>$IC_{50} = (9,4 \pm 1,4) \mu\text{M}$ $2,32 \pm 0,08$</p>
 <p>03G04 35</p>	<p>$EC_{50} = (8 \pm 3) \mu\text{M}$ $0,34 \pm 0,08$</p>
 <p>Olaparib 56</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>
 <p>Zopolrestat 57</p>	<p>$EC_{50} = (2,1 \pm 0,6) \mu\text{M}$ $0,66 \pm 0,05$</p>
 <p>03H10 36</p>	<p>$EC_{50} = (22 \pm 4) \mu\text{M}$ $0,31 \pm 0,10$</p>

Ergebnisse und Diskussion

 <p>Buclizin 58</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>
 <p>Cetirizin 59</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>
 <p>03H11 37</p>	<p>$EC_{50} = (14 \pm 8) \mu\text{M}$ $0,43 \pm 0,13$</p>
 <p>Fenbufen 60</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>
 <p>04D10 38</p>	<p>$EC_{50} = (22 \pm 4) \mu\text{M}$ $0,36 \pm 0,06$</p>
 <p>Ketoconazol 61</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>
 <p>06E03 48</p>	<p>$EC_{50} = (67 \pm 8) \mu\text{M}$ $0,50 \pm 0,03$</p>

 <p>Frovatriptan 62</p>	inaktiv (30 μ M)
 <p>06H08 49</p>	$EC_{50} = (27 \pm 8) \mu\text{M}$ $0,69 \pm 0,10$
 <p>Cisaprid 63</p>	$EC_{50} = (4,1 \pm 1,2) \mu\text{M}$ $0,68 \pm 0,04$
 <p>Metoclopramid 64</p>	inaktiv (30 μ M)

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Gal4-TLX sowohl durch kleine Moleküle wie Propranolol (**54**, $EC_{50} = (32 \pm 4) \mu\text{M}$) und Koffein (**55**, $IC_{50} = (9,4 \pm 1,4) \mu\text{M}$) als auch durch große und starre Moleküle wie Reserpin (**50**, $EC_{50} = (0,5 \pm 0,3) \mu\text{M}$) modulierbar ist. Ähnlich wie im Wirkstofffragmentscreening hob sich Propranolol (**54**, $EC_{50} = (32 \pm 4) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,08 \pm 0,08$) durch eine verstärkte TLX-vermittelte Reportersignalrepression hervor.

4.5 Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Xanthinderivaten

4.5.1 Methylierte Xanthinderivate als inverse TLX-Agonisten

Ausgehend von Fragment 03A02 (**34**) stellte Koffein (**55**) mit einem $IC_{50} = (9,4 \pm 1,4) \mu\text{M}$ und einer maximalen x-fachen Reporteraktivierung von $2,32 \pm 0,08$ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay die erste wegweisende Leitstruktur dieser Arbeit dar. Dieser Effekt konnte eindeutig einer TLX-vermittelten Reportermodulation zugeordnet werden, da orthogonale

Kontrollexperimente in HEK293T-Zellen, die entweder keinen Hybridrezeptor oder nur Gal4-VP16 exprimierten, unspezifische Effekte ausschlossen (siehe Abbildung 29).

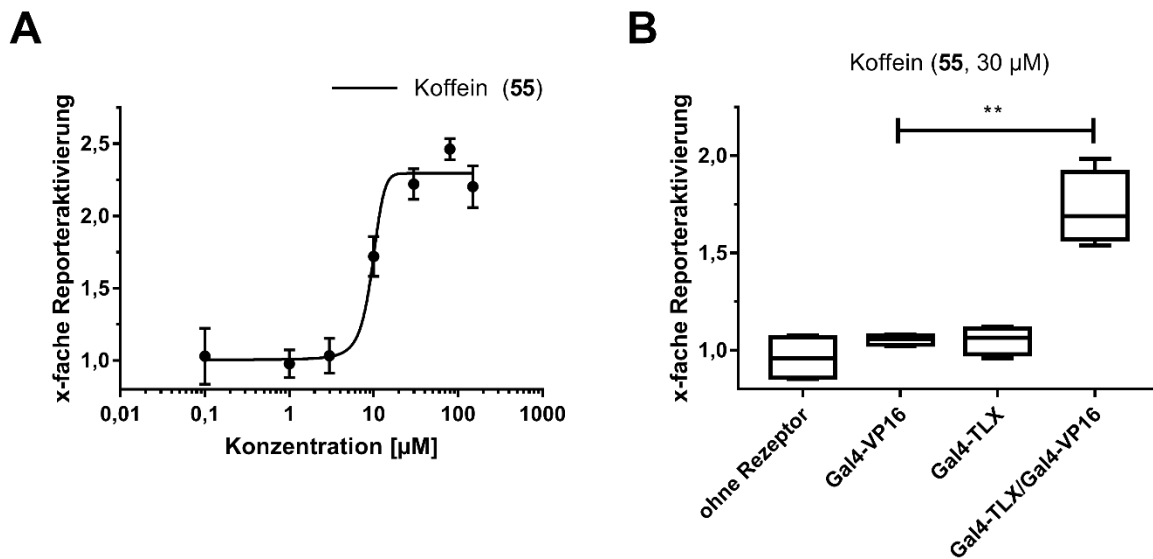


Abbildung 29: Koffein (55) als inverser TLX-Agonist. **A**) Dosis-Wirkungskurve von Koffein (55) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$). **B**) Kontrollexperimente (ohne Rezeptor, nur Gal4-VP16 oder nur Gal4-TLX) zur Bestätigung der TLX-vermittelten Modulation von Koffein (55) (30 μM). Boxplots stellen die minimale bzw. maximale x-fache Reporteraktivierung im entsprechenden Setting gegen eine 0,1 % DMSO-Kontrolle dar. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $n = 4$, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Die Kontrollexperimente bestätigten, dass die Wirkung von Koffein (55) nur im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay observierbar war (siehe Abbildung 29 B). Der fehlende Effekt in pFR-Luc und pRL-SV40 transfizierten HEK293T-Zellen, die keinen Gal4-Hybridrezeptor oder nur Gal4-VP16 exprimierten, schloss zelluläre, unspezifische Effekte aus. Da auch in nur Gal4-TLX-exprimierenden Zellen kein Effekt zu beobachten war, ist zu vermuten, dass die Reportersignalerhöhung durch Bindung von Koffein (55) nicht auf einen konventionellen Corepressor/Coaktivator Austausch basiert. Stattdessen könnte eine ligandenabhängige verringerte Corepressorrekrutierung durch Konformationsänderung der TLX-LBD denkbar sein.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Koffein (55) untersucht, ob die transrepressorische Wirkung von Gal4-TLX auch in Kombination mit anderen Agonisten-aktivierten Gal4-NRs modulierbar ist. Zu diesem Zweck wurde nur Koffein (55) bei einer Konzentration von 30 μM

auf eine potentielle Aktivität der jeweiligen untersuchten Rezeptoren analysiert. In keinem Fall zeigte Koffein (**55**) eine bedeutende Aktivität. Nach diesem Befund erfolgte die kombinierte Behandlung (entsprechender NR-Agonist + Koffein (**55**)) im Gal4-NR/Gal4-TLX-Format. Hierbei wurden HEK293T-Zellen entweder mit pFR-Luc, pRL-SV40 und des zu untersuchenden pFA-CMV-NR transfiziert oder zusätzlich mit pFA-CMV-TLX cotransfiziert, um die Wirkung von Gal4-TLX auf die Transkriptionsaktivierung anderer NRs im Gal4-Format zu studieren. Es erfolgte sowohl die separate Ligandenstimulation (entsprechende NR-Agonisten (1 μM) oder nur Koffein (**55**, 30 μM)) als auch die Kombination. Leichte signifikante Effekte wurden hierbei im Gal4-FXR/Gal4-TLX-, Gal4-RAR α /Gal4-TLX- und Gal4-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay im Vergleich zum Gal4-NR-Reporterassay ohne Gal4-TLX verzeichnet (siehe Abbildung 30). Auffallend war die synergistische Modulation von Gal4-LXR α durch T0901317 (1 μM) und Koffein (**55**, 30 μM). Hier wurde im Gal4-LXR α -Reporterassay die durch T0901317 (1 μM) vermittelte Gal4-LXR α Transkriptionsaktivität unter zusätzlicher Verwendung von Koffein (**55**, 30 μM) signifikant verstärkt, sodass dieser Effekt im Gal4-LXR α /Gal4-TLX-Reporterassay nicht eindeutig auf einen Gal4-TLX-abhängigen Effekt zurückzuführen war. Dieses Resultat wies auf eine mögliche stille allosterische Modulation von LXR α durch Koffein (**55**) hin (siehe Abbildung 30 B).

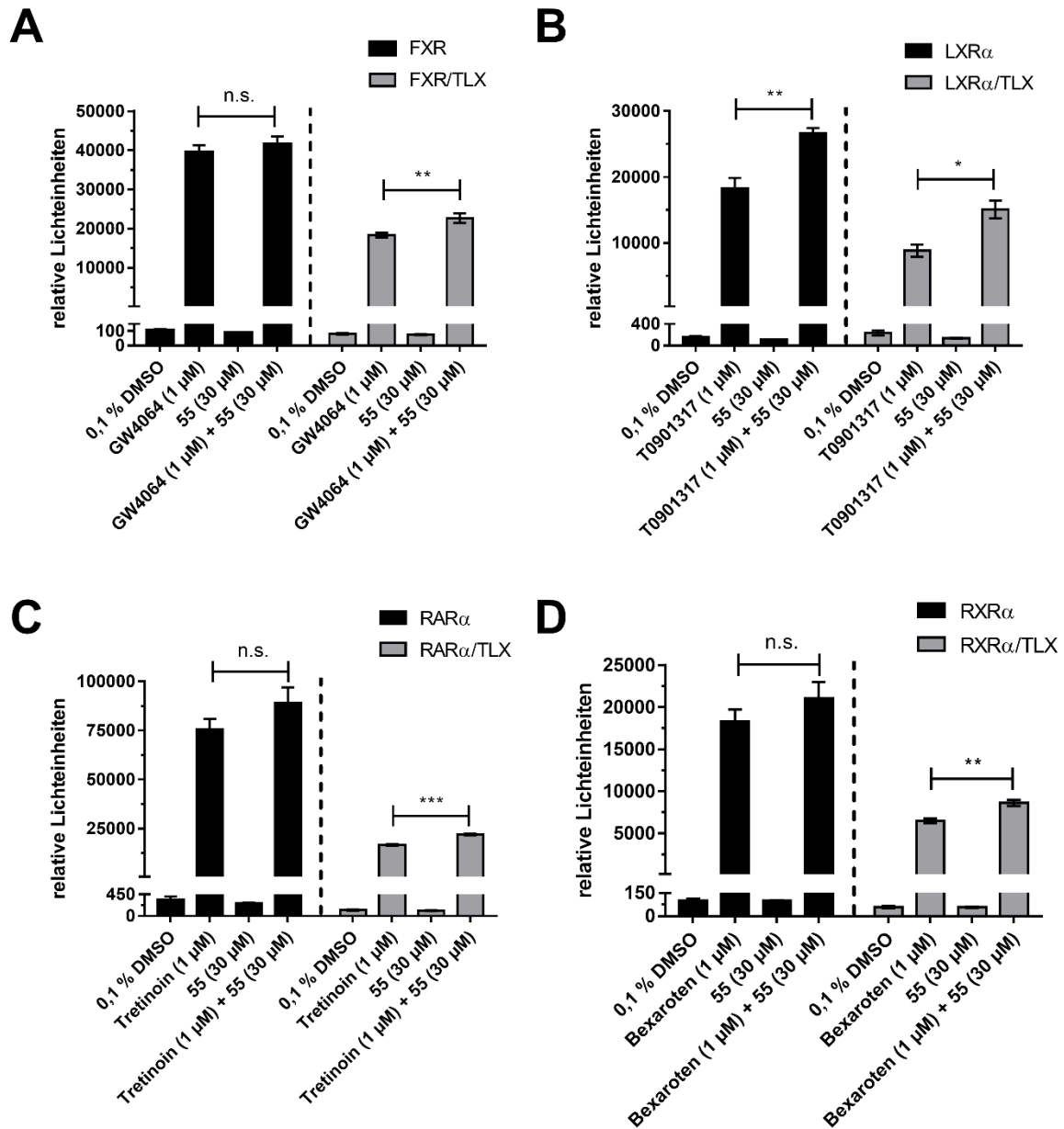


Abbildung 30: Modulation der Agonisten-induzierten Gal4-NR Reporteraktivierung durch Gal4-TLX in Kombinationen mit dem inversen TLX-Agonisten Koffein (55). **A)** Für Gal4-FXR alleine und in Kombination mit Gal4-TLX sind die relativen Lichteinheiten der unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle, GW4064 (1 µM), 55 (30 µM) und die Kombination von GW4064 (1 µM) + 55 (30 µM) gezeigt. **B)** Für Gal4-LXRα alleine und in Kombination mit Gal4-TLX sind die relativen Lichteinheiten der unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle, T0901317 (1 µM), 55 (30 µM) und die Kombination von T0901317 (1 µM) + 55 (30 µM) gezeigt. **C)** Für Gal4-RARα alleine und in Kombination mit Gal4-TLX sind die relativen Lichteinheiten der unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle, Tretinoin (1 µM), 55 (30 µM) und die Kombination von Tretinoin (1 µM) + 55 (30 µM) gezeigt. **D)** Für Gal4-RXRα alleine und in Kombination mit Gal4-TLX sind die relativen Lichteinheiten der unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle, Bexaroten (1 µM), 55 (30 µM) und die Kombination von Bexaroten (1 µM) + 55 (30 µM) gezeigt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler mit n ≥ 3 dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen

Ergebnisse und Diskussion

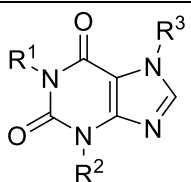
Student's t-Test gegen die relativen Lichteinheiten des entsprechenden Referenzagonisten in Gal4-NR oder Gal4-NR/Gal4-TLX-Format analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Ob die TLX invers agonistische Wirkung von Koffein (**55**) zur Aktivitätsmodulation anderer NRs eine physiologische Relevanz hat, ist anhand dieser Daten nicht eindeutig geklärt. Es ist zu bedenken, dass in diesem Hybridformat die vielfältigen Erkennungssequenzen der NR-Familie auf eine uniforme Gal4-Erkennungssequenz reduziert sind. Wenn die TLX-vermittelte Transrepression anderer Gal4-NR durch einen kompetitiven Bindungsmechanismus der Gal4-Erkennungssequenz erfolgt, handelt es sich um ein Artefakt des Gal4-Reporterassays.

Da Koffein (**55**) bereits vielversprechende Effekte mit Hinblick zur Eignung als *tool compound* aufwies und Fragment **34** eine ähnliche Potenz zu Koffein (**55**) besaß, war der nächste Schritt die gezielte Untersuchung des Methylierungsmusters im Xanthingrundgerüst um potentielle Wasserstoffbrückenwechselwirkungen der Amingruppen (-NH-) zu lokalisieren. Daher wurden neben den Monomethylderivaten (**34**, **66** und **67**), den Dimethylderivaten (**68**, **69** und **70**) und dem Trimethylderivat (**55**) auch das unsubstituierte Xanthin (**65**) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay auf ihre modulatorische Kapazität an Gal4-TLX untersucht (siehe Tabelle 5). Während Xanthin (**65**), 3-Methylxanthin (**66**), 7-Methylxanthin (**67**) und Theobromin (**70**) keine Aktivität an Gal4-TLX bis zu einer Konzentration von 100 μM zeigten, konnten für 1-Methylxanthin (**34**), Theophyllin (**68**), Paraxanthin (**69**) und Koffein (**55**) IC_{50} -Werte um $\sim 10 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX von methylierten Xanthinderivaten **34**, **55** und **65-70**. Alle aktiven Derivate (**34**, **55**, **68** und **69**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's* t-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit einer x-fachen Reporteraktivierung $\leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

				
Substanz	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
Xanthin 65	H	H	H	inaktiv (100 μ M)
1-Methylxanthin 34	Me	H	H	(9 \pm 3) μ M 2,3 \pm 0,3
3-Methylxanthin 66	H	Me	H	inaktiv (100 μ M)
7-Methylxanthin 67	H	H	Me	inaktiv (100 μ M)
Theophyllin 68	Me	Me	H	(10,2 \pm 1,9) μ M 2,55 \pm 0,09
Paraxanthin 69	Me	H	Me	(10,8 \pm 1,3) μ M 2,44 \pm 0,07
Theobromin 70	H	Me	Me	inaktiv (100 μ M)
Koffein 55	Me	Me	Me	(9,4 \pm 1,4) μ M 2,32 \pm 0,08

Ähnlich wie Koffein (**55**) zeigten die restlichen aktiven Xanthine **34**, **68** und **69** keine Effekte an Gal4-VP16 exprimierenden Zellen (siehe Abbildung 31).

Ergebnisse und Diskussion

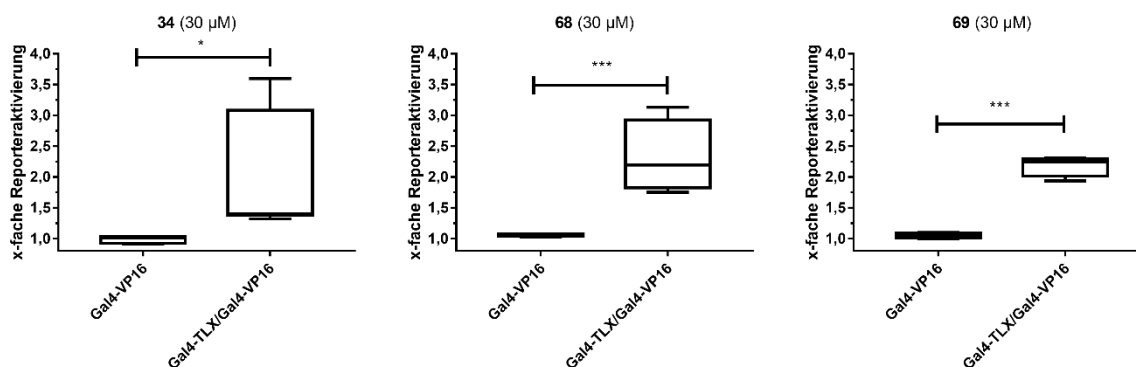


Abbildung 31: Aktivitäten der Verbindungen **34**, **68** und **69** (jeweils 30 µM) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Boxplots stellen die minimale bzw. maximale x-fache Reporteraktivierung im entsprechenden Setting gegen eine 0,1 % DMSO-Kontrolle dar. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

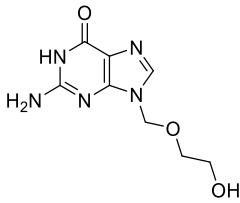
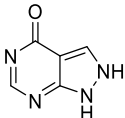
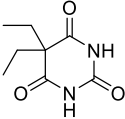
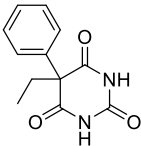
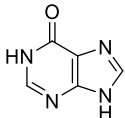
Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass nur Derivate, die mindestens eine 1-Methylgruppe enthielten (**34**, **55**, **68** und **69**) eine Aktivität an Gal4-TLX zeigten. Die restlichen Derivate (**65**, **66**, **67** und **70**) waren bis zu 100 µM inaktiv.

4.5.2 Untersuchung von Purin- und Pyrimidinderivaten

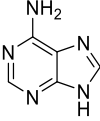
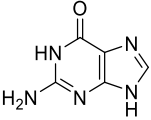
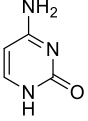
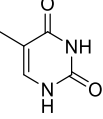
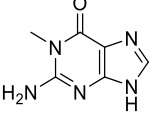
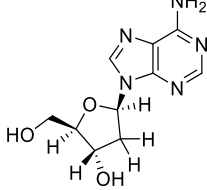
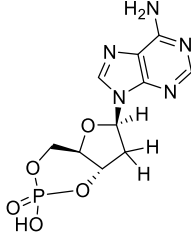
Da Xanthin (**65**) ein Purinderivat darstellt, wurden im weiteren Verlauf ausgewählte Purin- und Pyrimidinderivate mit dem Ziel weitere potentielle endogene TLX-Modulatoren ausfindig zu machen, getestet (siehe Tabelle 6).

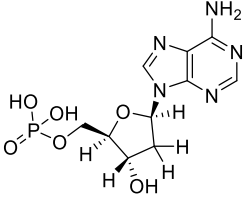
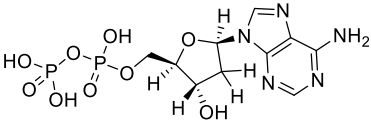
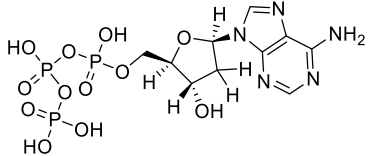
Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Untersuchung weiterer Purin- und Pyrimidinderivate. Alle aktiven Verbindungen (**76** und **83-85**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's* t-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < x\text{-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Struktur und Name	EC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
 <p>Aciclovir 71</p>	inaktiv (30 μ M)
 <p>Allopurinol 72</p>	inaktiv (30 μ M)
 <p>Barbitol 73</p>	inaktiv (100 μ M)
 <p>Phenobarbital 74</p>	inaktiv (100 μ M)
 <p>Hypoxanthin 75</p>	inaktiv (100 μ M)

Ergebnisse und Diskussion

 <p>Adenin 76</p>	<p>EC₅₀ > 100 μM</p>
 <p>Guanin 77</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>
 <p>Cytosin 78</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>
 <p>Thymin 79</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>
 <p>1-Methylguanin 80</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>
 <p>Adenosin 81</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>
 <p>zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) 82</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>

 <p>Adenosinmonophosphat (AMP) 83</p>	<p>(5,6 ± 1,5) μM 0,42 ± 0,07</p>
 <p>Adenosindiphosphat (ADP) 84</p>	<p>(1,8 ± 0,9) μM 0,69 ± 0,05</p>
 <p>Adenosintriphosphat (ATP) 85</p>	<p>(0,42 ± 0,05) μM 0,47 ± 0,02</p>

71-75 waren inaktiv. Unter den Nukleinbasen (**76-79**) zeigte nur Adenin (**76**) eine leichte agonistische Wirkung an Gal4-TLX. Im Gegensatz zur Methylxanthin-SAR konnte im Falle von Guanin (**77**) durch Einführung einer 1-Methylgruppe mit 1-Methylguanin (**80**) keine Aktivität wiederhergestellt werden. Folglich wurden nur noch Adeninderivate analysiert. Hierbei konnte weder für Adenosin (**81**) noch für zyklisches Adenosinmonophosphat (**82**) eine Aktivität an Gal4-TLX verzeichnet werden. Die linear phosphorylierten Adenosinanaloga (**83-85**) hingegen fungierten als TLX-Agonisten, wobei die Potenz mit dem entsprechenden Phosphorylierungsgrad korrelierte. Adenosintriphosphat (**85**, $EC_{50} = (0,42 \pm 0,05) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,47 \pm 0,02$) ging als potentester Kandidat aus dieser SAR-Untersuchung hervor und wies keine Gal4-VP16-vermittelten Effekte auf (siehe Abbildung 32).

Ergebnisse und Diskussion

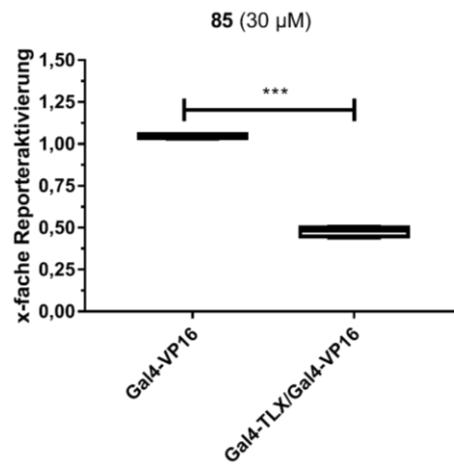
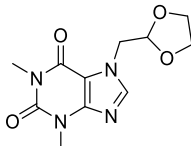
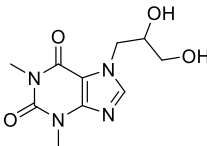
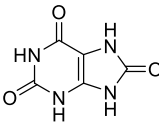
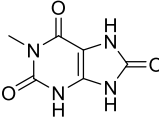


Abbildung 32: Aktivität von ATP (**85**) (30 µM) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Boxplots stellen die minimale bzw. maximale x-fache Reporteraktivierung im entsprechenden Setting gegen eine 0,1 % DMSO-Kontrolle dar. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

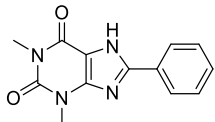
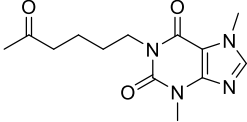
4.5.3 8-Phenyltheophyllin als neue Leitstruktur

Da die bisherige Methylxanthin-SAR-Studie Potential für weitere Potenzoptimierungen aufwies, wurden ausgewählte Xanthinderivate auf eine Aktivität an Gal4-TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay gescreent, um die SAR der Xanthine als TLX-Liganden weiter aufzuklären. Hierbei wurden Substanzen gewählt, die zudem strukturell den aktiven Methylxanthinderivaten aus dem vorherigem Kapitel (4.5.1) ähnlich waren (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX weiterer Xanthinderivate **86-98**. Alle aktiven Verbindungen (**86**, **89-92** und **94-97**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's* t-Test die *x*-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < x$ -fache Reporteraktivierung $\leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Struktur und Name	EC ₅₀ /IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max./min. <i>x</i> -fache Reporteraktivierung
 Doxofyllin 86	IC ₅₀ > 100 μ M
 Dyphyllin 87	inaktiv (100 μ M)
 Harnsäure 88	inaktiv (100 μ M)
 1-Methylharnsäure 89	(25 \pm 3) μ M 1,71 \pm 0,05

<p>1,7-Dimethylharnsäure 90</p>	<p>(44 ± 4) μM 2,98 ± 0,16</p>
<p>1,3,7-Trimethylharnsäure 91</p>	<p>(24 ± 3) μM 2,65 ± 0,13</p>
<p>3-<i>iso</i>-Butyl-1-methylxanthin (IBMX) 92</p>	<p>(29 ± 6) μM 0,25 ± 0,12</p>
<p>Theophyllin-7-essigsäure 93</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>
<p>7-(2-Chlorethyl)theophyllin 94</p>	<p>(3,8 ± 0,3) μM 2,05 ± 0,02</p>
<p>8-Chlorotheophyllin 95</p>	<p>(17 ± 3) μM 2,1 ± 0,2</p>
<p>8-Bromotheophyllin 96</p>	<p>(6 ± 3) μM 1,56 ± 0,09</p>

 <p>8-Phenyltheophyllin 97</p>	<p>(0,5 ± 0,3) μM 2,42 ± 0,12</p>
 <p>Pentoxifyllin 98</p>	<p>inaktiv (100 μM)</p>

Tendenziell deutete diese SAR-Untersuchung auf einen Aktivitätsverlust durch Substitution von N-1 mit einer langen aliphatischen Seitenkette (**98**) oder durch Substitution an N-7 mit polaren Gruppen (**86**, **87** und **93**) hin. Im Gegensatz dazu zeigte **94** durch eine flexible 2-Chlorethyl-Kette mit einem $IC_{50} = (3,8 \pm 0,3) \mu M$ eine Potenzverbesserung. Auffallend war die Umwandlung der invers agonistischen Aktivität in eine agonistische Aktivität an Gal4-TLX durch den Ersatz der 3-Methylgruppe in Theophyllin (**68**) mit einer *iso*-Butylgruppe in 3-*iso*-Butyl-1-methylxanthin (IBMX, **92**). Ebenfalls zeigten die methylierten Harnsäurederivate **89-91** eine invers agonistische Aktivität an Gal4-TLX auf, deren Potenz allerdings schwächer als die der Methylxanthine war. Analog zur Methylxanthin-SAR wies die unmethylierte Harnsäure (**88**) keine Aktivität an Gal4-TLX auf. Auch hier zeigte der strukturelle Vergleich zwischen **88** und **89**, dass eine 1-Methylgruppe essentiell für eine Aktivitätsmodulation an Gal4-TLX war. Die Einführung von zunehmend größeren Halogenatomen (**95** und **96**) in Theophyllin (**68**) verdeutlichte, dass in 8-Position Substitutionspotential durch größere Atomgruppen herrschte. Folglich gelang eine signifikante Potenzverbesserung mit 8-Phenyltheophyllin (**97**, $IC_{50} = (0,5 \pm 0,3) \mu M$), welches ca. 20-fach potenter als Koffein (**55**) war und keine Gal4-VP16-abhängigen Effekte aufwies (siehe Abbildung 33).

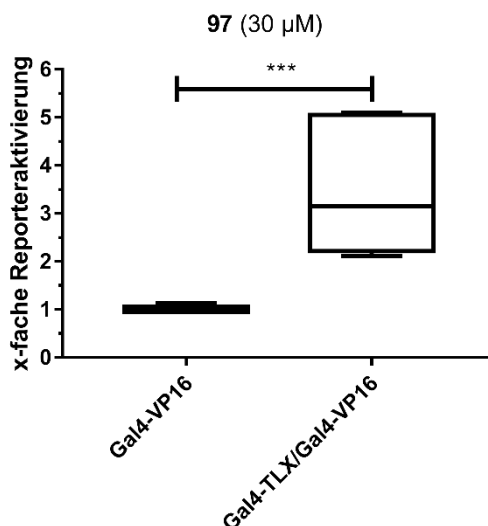


Abbildung 33: Aktivität an Gal4-TLX von 8-Phenyltheophyllin (**97**) (30 μ M) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Boxplots stellen die minimale bzw. maximale x-fache Reporteraktivierung im entsprechenden Setting gegen eine 0,1 % DMSO-Kontrolle dar. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 6$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

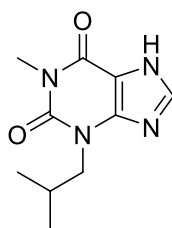
8-Phenyltheophyllin (**97**) stellte somit als neue Leitstruktur einen attraktiven Ausgangspunkt für weitere Strukturoptimierungen dar.

4.5.4 Xanthine als Adenosinrezeptorantagonisten und Phosphodiesteraseinhibitoren

Xanthine und ihre Derivate sind prominente Liganden an Adenosinrezeptoren (ADOR) und Phosphodiesterasen (PDE)^{142–145}. Während sie an ADORs als Rezeptorantagonisten fungieren, wirken sie an PDEs als Inhibitoren. Als G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl. *G-protein coupled receptors*, GPCR) bestehen ADORs typischerweise aus sieben transmembranen Helices. Durch Bindung kleiner Signalmoleküle auf der extrazellulären Seite rufen sie eine G-Protein gekoppelte intrazelluläre Signaltransduktion hervor, welche z.B. die Modulation intrazellulärer cAMP Spiegel durch die Adenylatcyclase einschließen kann^{146,147}. Die Unterteilung der ADORs mit A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ resultiert in vier Subtypen¹⁴⁸. Die Subtypen A₁ und A₃ sind an G_{i/o}-Proteine gekoppelt und bewirken eine Inhibierung der Adenylatcyclaseaktivität mit der Konsequenz verringerter cAMP Level, Proteinkinase A (engl. *protein kinase A*, PKA) Aktivität und verminderter Phosphorylierung des

Transkriptionsaktivators CREBP (engl. *cAMP response element binding protein*, CREBP). A_{2A} und A_{2B} hingegen erhöhen entweder durch G_s-Proteine die Aktivität der Adenylatcyclase oder durch G_q-Proteine die Aktivierung der Phospholipase C (engl. *phospholipase C*, PLC) mit verstärkter Aktivität der Proteinkinase C (engl. *protein kinase C*, PKC) und erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Spiegeln^{149–151}. Die Modulation von ADORs über Xanthine mit den nicht-selektiven ADOR-Antagonisten Koffein (**55**) und Theophyllin (**68**) mit Potenzen im mikromolaren Bereich (15-200 µM) führt zu einer Reihe pharmakologischer Wirkungen¹⁵². Hierzu gehören die potentielle Behandlung kardiovaskulärer, neurodegenerativer und renaler Erkrankungen sowie Lungen- und Krebserkrankungen¹⁵³.

Die Proteinfamilie der PDEs hingegen stellt eine Enzymgruppe dar, die die Phosphoesterbindung von cAMP und cGMP spalten kann und somit deren Wirkung als sekundäre Botenstoffe steuert¹⁵⁴. Somit sind PDEs indirekt in der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse wie Zellproliferation-, Differenzierungs-, Apoptose- und Entzündungsvorgängen aber auch in metabolischen Prozessen wie Glykogensynthese, Glykogenolyse, Lipogenese und Lipolyse involviert¹⁵⁵. 21 Gene codieren durch alternatives Spleißen mehr als 100 PDE-Isoformen, welche in elf PDE-Subfamilien eingruppiert werden¹⁵⁶. Es existieren cAMP-substratspezifische PDEs (PDE Gruppen 4, 7 und 8), cGMP-substratspezifische PDEs (PDE Gruppen 5, 6 und 9) und duale cAMP/cGMP PDEs (PDE Gruppen 1-3, 10 und 11)¹⁵⁷. Die PDEs stellen bedeutende therapeutische Angriffspunkte z.B. in der Behandlung der Herzinsuffizienz, der COPD (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) und der erektilen Dysfunktion sowie in der Verbesserung kognitiver Fähigkeiten dar^{158,159}. Als nicht-selektive PDE-Inhibitoren sind Koffein (**55**), Theophyllin (**68**) (pan-PDE-Inhibitoren außer PDE8 und PDE9) und IBMX (**92**) die bekanntesten Beispiele unter den Xanthinderivaten. So wurde der erste PDE-inhibitorische Effekt mit Koffein (**55**) entdeckt¹⁶⁰. Nach einer Strukturoptimierung wurde IBMX (**92**) als potenter nicht-selektiver PDE-Inhibitor in vielen Experimenten verwendet (siehe Tabelle 8)¹⁶¹. Zudem finden noch heute sowohl Koffein (**55**) und Theophyllin (**68**) als Bronchodilatoren in der Behandlung von Asthma und COPD als auch Pentoxifyllin (**98**) bei der Behandlung peripherer arterieller Verschlusskrankheiten Anwendung, deren Effekte auf eine PDE-Inhibition zurückzuführen ist^{143,155,162}.

Tabelle 8: Exemplarische Übersicht der IC₅₀-Werte des Methylxanthins IBMX (**92**) an ADORs und PDEs.

IBMX

92

Zielprotein	IC ₅₀ [μM]
A ₁	7 ¹⁶³
A ₂	16 ¹⁶³
A ₃	n.d.
PDE1	3–10 ¹⁴³
PDE2	6–50 ¹⁴³
PDE3	2–10 ¹⁴³
PDE4	5–20 ¹⁴³
PDE5	2–10 ¹⁴³
PDE6	1–5 ¹⁴³
PDE7	2 ¹⁴³
PDE8	>100 ¹⁴³
PDE9	>100 ¹⁴³
PDE10	3 ¹⁴³
PDE11	25–80 ¹⁴³

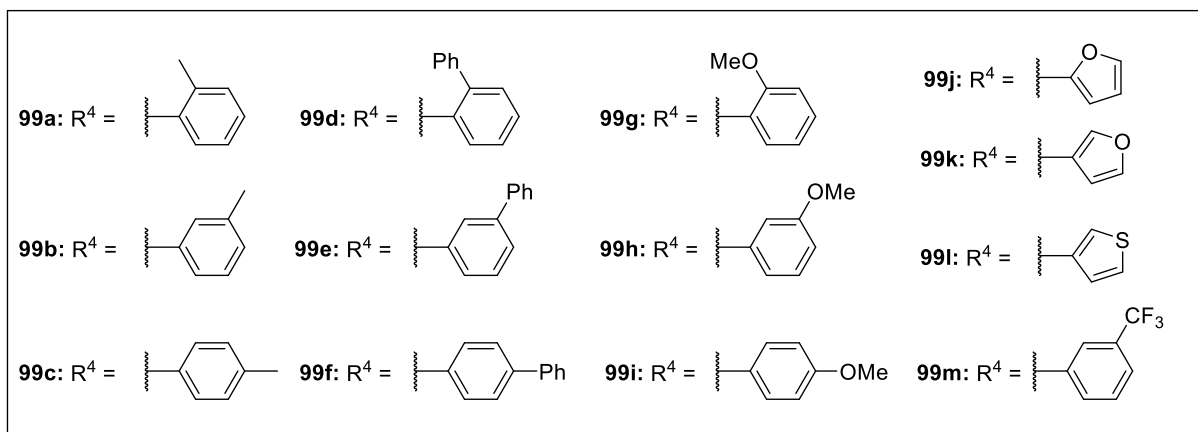
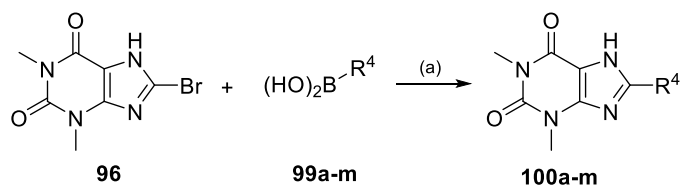
Daher müssen die erhaltenen *in vitro* Daten hinsichtlich der Aktivität an TLX mit Vorsicht interpretiert werden, da hier trotz fehlender Daten mit sekundären Effekten über ADORs und PDEs zu rechnen ist.

4.5.5 Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von 8-Phenyltheophyllin

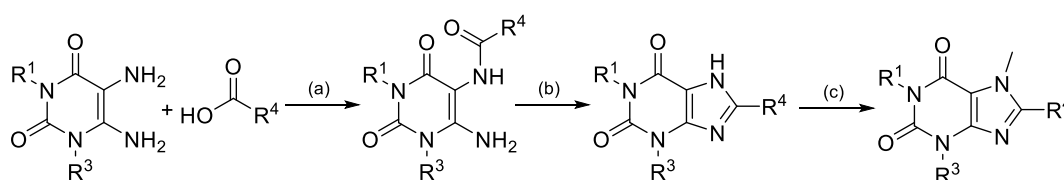
Um in einer effizienten, simplen und schnellen Weise die gewünschten Strukturmodifikationen in 8-Phenyltheophyllin (**97**) einzuführen, wurde die Mehrheit der synthetisierten Derivate über eine Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion hergestellt (siehe Schema 3 A). Dabei wurden ausgehend von 8-Bromtheophyllin (**96**) und den entsprechenden

Boronsäuren (**99a-m**) unter Verwendung des Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)-Katalysators die Zielverbindungen **100a-m** hergestellt. Da im Laufe der SAR-Studie als zusätzliches Xanthinanalogen Istradefyllin (**116**) als zugelassener A_{2A}-Rezeptorantagonist¹⁶⁴ zur Behandlung des Morbus Parkinson (engl. *Parkinson's Disease*, PD) als hochpotenter inverser TLX-Agonist identifiziert wurde, wurden weitere Theophyllinderivate (**104d**, **104e** und **106**) synthetisiert. Dabei wurden ausgehend von 5,6-Diamino-1,3-dimethylpyrimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion (**101a**) oder 5,6-Diamino-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion (**101b**) mittels EDC·HCl (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) vermittelter Amidkupplung unter Verwendung entsprechender Carbonsäuren (**102a-f**) die Intermediate **103a-f** synthetisiert (siehe Schema 3 B). Unter basischen Bedingungen erfolgte die Zyklisierung von **103a-f** zu **104a-f**. Die Methylierung von **104d** zu **106** erfolgte mit Hilfe einer nukleophilen Substitution an Methyljodid (**105**).

A



B



101a: R₁ = R₃ = Me

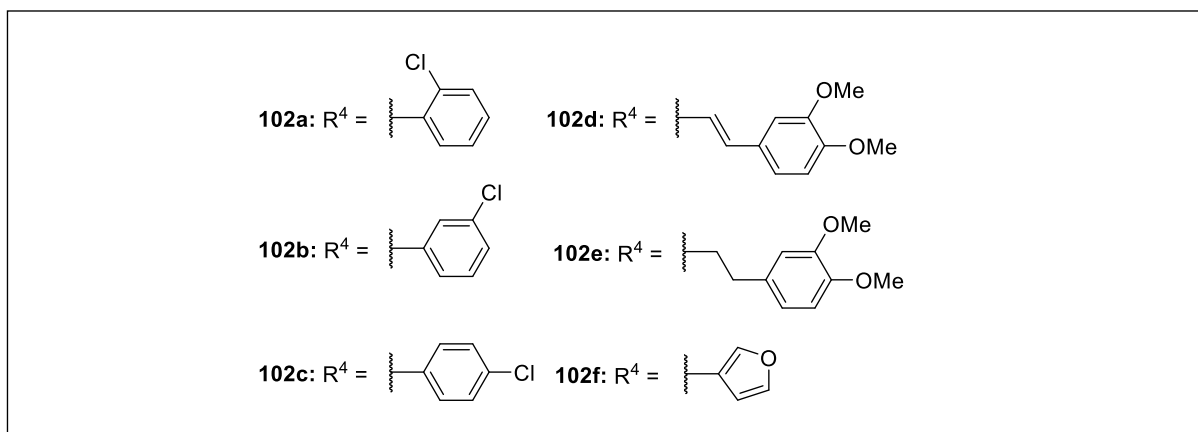
102a-f

103a-f

104a-f

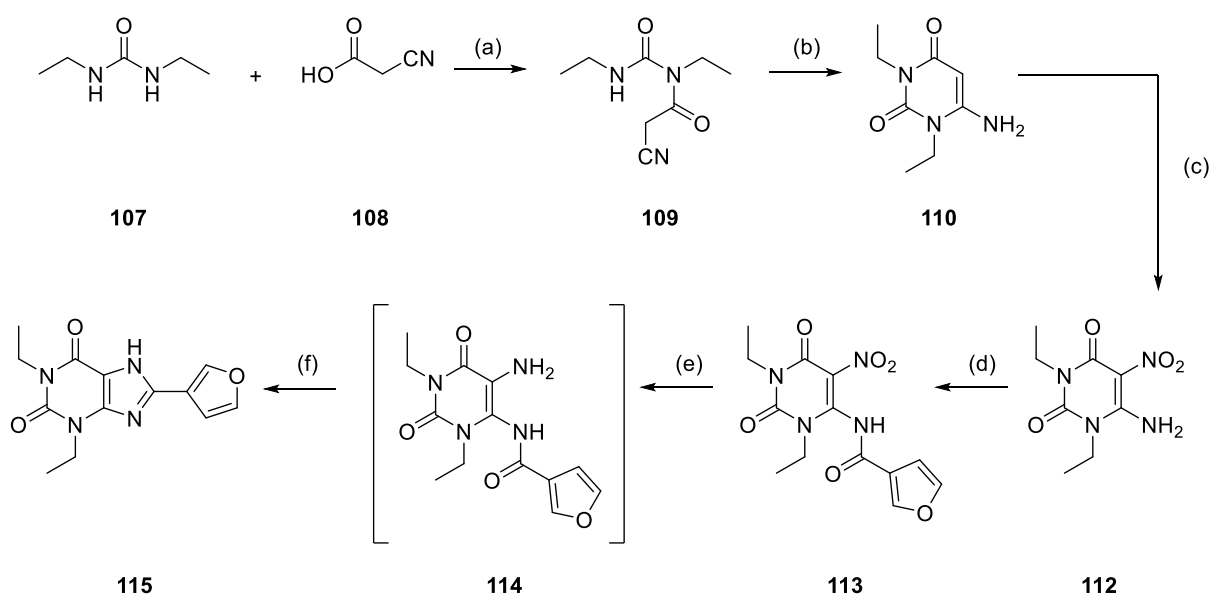
106

101b: R₁ = R₃ = *n*-propyl



Schema 3: Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen **100a-m** (A) und zur Darstellung der Zielverbindungen **104a-f** und **106** (B). (A) Reagenzien und Bedingungen: (a) Dioxan/H₂O (4:1 V/V), Na₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, 110 °C, 4-7 Stunden, Ausbeuten: 10-58 %. (B) Reagenzien und Bedingungen: (a) CHCl₃, EDC-HCl, RT-50 °C, 2-72 Stunden, Ausbeuten: 52-83 %. (b) H₂O oder DMSO, NaOH, 100 °C, 2-3 Stunden, Ausbeuten: 24-81 %. (c) DMF, Na₂CO₃, Methyljodid (**105**), RT-80 °C, 71 Stunden, Ausbeuten: 20 %.

Da die kommerzielle Verfügbarkeit von 5,6-Diamino-1,3-diethylpyrimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion sehr limitiert war, wurde die fehlende Zielverbindung **115** über eine sechsstufige Syntheseroute basierend auf literaturbekannten Protokollen dargestellt (siehe Schema 4)^{165,166}. Dabei wurde ausgehend von Diethylharnstoff (**107**) und Cyanoessigsäure (**108**) in Essigsäureanhydrid 2-Cyan-*N*-ethyl-*N*-(ethylcarbamoyl)acetamid (**109**) hergestellt. Anschließend erfolgte unter basischen Bedingungen der intramolekulare Ringschluss zu 6-Amino-1,3-diethylpyrimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion (**110**). Die Nitrierung von **110** erfolgte unter Verwendung von NaNO₂ (**111**) zu 6-Amino-1,3-diethyl-5-nitropyrimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion (**112**). Durch Amidkupplung von **112** mit 3-Furancarbonsäure (**102f**) unter Verwendung von EDC·HCl wurde das Amidderivat **113** synthetisiert, welches in einer Eintopfreaktion durch eine *in situ* Reduktion der Nitrogruppe mit Na₂S₂O₄ in eine Amingruppe überführt wurde. Anschließend lieferte eine intramolekulare Kondensationsreaktion die finale Verbindung **115**.

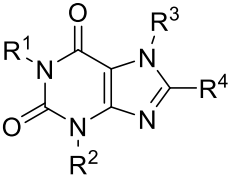


Schema 4: Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindung **115**. Reagenzien und Bedingungen: (a) Essigsäureanhydrid, 80 °C, 2 Stunden, Ausbeute: 53 %. (b) H₂O, NaOH, 80 °C, 2 Stunden, Ausbeute 50 %. (c) H₂O/AcOH (1:1 V/V), NaNO₂ (**111**), 60 °C, 2 Stunden, Ausbeute: 52 %. (d) CHCl₃, 3-Furancarbonsäure (**102f**), Raumtemperatur (RT), 23 Stunden, Ausbeute: 49 %. (e) H₂O/NH₃ (12,5 % V/V), Na₂S₂O₄, 80 °C, 4 Stunden; (f) NaOH, 100 °C, 3 Stunden, Ausbeute: 7 % über zwei Stufen.

Um die SAR von 8-Phenyltheophyllin (**97**) systematisch zu untersuchen, wurden zunächst aliphatische (**100a-c**), sterisch anspruchsvolle (**100d-f**), elektronenschiebende (**100g-i**) und elektronenziehende Gruppen (**104a-c**) am Benzolring von 8-Phenyltheophyllin (**97**) eingeführt und im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay charakterisiert (siehe Tabelle 9).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX kommerziell erhältlicher und synthetisierter Xanthinderivate **68**, **97**, **100a-m**, **104a-f**, **106** und **115-117**. Alle aktiven Derivate (**68**, **97**, **100a-m**, **104a-f**, **106** und **115-117**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's* t-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05$ = * gegeben war. Verbindungen mit einer x-fachen Reporteraktivierung $\leq 1,5$ in Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

					
Substanz	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
Theophyllin 68	Me	Me	H	H	(10,2 \pm 1,9) μ M 2,55 \pm 0,09
8-Phenyltheophyllin 97	Me	Me	H	Ph	(0,5 \pm 0,3) μ M 2,42 \pm 0,12
100a	Me	Me	H	2-Me-Ph	(0,65 \pm 0,11) μ M 2,89 \pm 0,06
100b	Me	Me	H	3-Me-Ph	(0,51 \pm 0,18) μ M 2,52 \pm 0,08
100c	Me	Me	H	4-Me-Ph	(7 \pm 4) μ M 5,0 \pm 0,7
100d	Me	Me	H	2-Biphenyl	(1,8 \pm 0,6) μ M 2,44 \pm 0,11
100e	Me	Me	H	3-Biphenyl	inaktiv (30 μ M)
100f	Me	Me	H	4-Biphenyl	(7 \pm 4) μ M 1,65 \pm 0,09
100g	Me	Me	H	2-OMe-Ph	inaktiv (30 μ M)
100h	Me	Me	H	3-OMe-Ph	(0,29 \pm 0,09) μ M 2,71 \pm 0,07
100i	Me	Me	H	4-OMe-Ph	(4,1 \pm 1,4) μ M 3,61 \pm 0,20
100j	Me	Me	H	2-Furyl	(0,22 \pm 0,01) μ M 3,000 \pm 0,015

100k	Me	Me	H	3-Furyl	(0,158 ± 0,018) µM 2,88 ± 0,06
100l	Me	Me	H	3-Thienyl	(0,10 ± 0,04) µM 2,78 ± 0,19
100m	Me	Me	H	3-CF ₃ -Ph	inaktiv (30 µM)
104a	Me	Me	H	2-Cl-Ph	(0,5 ± 0,3) µM 2,7 ± 0,2
104b	Me	Me	H	3-Cl-Ph	(0,23 ± 0,08) µM 2,42 ± 0,06
104c	Me	Me	H	4-Cl-Ph	(0,34 ± 0,07) µM 2,10 ± 0,06
Istradefyllin 116	Et	Et	Me	3,4-Dimethoxystyryl	(0,04 ± 0,01) µM 2,63 ± 0,15
104d	Me	Me	H	3,4-Dimethoxystyryl	(0,19 ± 0,06) µM 3,27 ± 0,10
104e	Me	Me	H	3,4-Dimethoxyethylbenzol	(1,2 ± 0,3) µM 2,50 ± 0,14
106	Me	Me	Me	3,4-Dimethoxystyryl	(3,6 ± 0,9) µM 2,03 ± 0,08
1,3-Dipropylxanthin 117	<i>n</i> -Propyl	<i>n</i> -Propyl	H	H	(0,12 ± 0,04) µM 1,89 ± 0,09
115	Et	Et	H	3-Furyl	(0,039 ± 0,017) µM 4,0 ± 0,3
104f	<i>n</i> -Propyl	<i>n</i> -Propyl	H	3-Furyl	(0,0090 ± 0,0018) µM 3,04 ± 0,15

Die Einführung einer *para*-Methylgruppe (**100c**) führte im Vergleich zu den *ortho*-Methyl- (**100a**) und *meta*-Methylanaloga (**100b**) zu einem deutlichen Potenzverlust. *Ortho*-Methylderivat (**100a**) und *meta*-Methylderivat (**100b**) zeigten ähnliche Potenzen wie die Leitstruktur **97**. Sterisch anspruchsvollere Benzolgruppen (**100d-f**) führten allgemein zu einer Verschlechterung des IC₅₀-Wertes. Erst die Einführung von Methoxygruppen (**100g-i**) konnte eine bedeutende Potenzverbesserung mit *meta*-Derivat **100h** (IC₅₀ = (0,29 ± 0,09) µM, maximale Reporteraktivierung = 2,71 ± 0,07) erzielen. Das *ortho*-Methoxyderivat (**100g**) zeigte nur schwache Effekte, wohingegen das *para*-Methoxyderivat (**100i**) eine deutliche Potenzverschlechterung aufzeigte. Die Einführung von Chlorsubstituenten (**104a-c**) zeigte dagegen in der 3- und 4-Position eine Potenzverbesserung. Anhand der bisherigen Daten konnte mit Hilfe der *meta*-substituierten Derivate (**100b**, **100h** und **104b**) auf ein bevorzugtes *meta*-Substitutionsmuster geschlossen werden. Möglicherweise lässt sich außerdem die

deutliche Potenzverbesserung von **100h** durch Beteiligung des Sauerstoffatoms an einer gerichteten polaren Interaktion mit dem Rezeptor erklären. Im Einklang damit steht die potente Verbindung **104b**, die ebenfalls über das Sigma-Loch am Chlorsubstituenten polare Kontakte ausbilden kann, während diese Fähigkeit beim 3-Trifluormethylderivat (**100m**) fehlt und entsprechend weniger aktiv war¹⁶⁷. Eine weitere Derivatisierung von **97** und **100h** erfolgte durch Ersetzen des Phenylsubstituenten durch ein Furan in **100j** und **100k**. Beide Regioisomere wiesen sowohl eine verbesserte Potenz als auch eine stärkere maximale Reporteraktivierung im Vergleich zur Leitstruktur **97** und zum optimierten 3-Methoxyderivat (**100h**) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay auf. Dabei ging das 3-Furylderivat (**100k**) mit einem $IC_{50} = (0,158 \pm 0,018) \mu M$ und einer maximalen Reporteraktivierung von $2,88 \pm 0,06$ als potentester TLX-Modulator aus der bisherigen synthetisierten Serie hervor. Zur weiteren Optimierung wurde der C-O-C Bindungswinkel durch Substitution mit einem 3-Thienylrest (**100l**) verkleinert, wobei das Schwefelatom als weichere Lewis-Base eine veränderte Wasserstoffbrückenakzeptorfähigkeit aufweist. Diese Strukturveränderung führte mit dem Derivat **100l** ($IC_{50} = (0,10 \pm 0,04) \mu M$, maximale Reporteraktivierung = $2,78 \pm 0,19$) zu einer leichten Potenzverbesserung.

Basierend auf den bisherigen Beobachtungen wurde Istradefyllin (**116**) als weiteres Xanthinanalogen auf eine Aktivität an Gal4-TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay getestet und erwies sich als ein neues, hochpotentes Xanthinderivat ($IC_{50} = (0,04 \pm 0,01) \mu M$, maximale Reporteraktivierung = $2,63 \pm 0,15$) aus. Um die Struktur motive für die herausragende Potenz zu identifizieren, wurden die Atomgruppen R_3 und R_4 von Istradefyllin (**116**) auf Theophyllin (**68**) übertragen. Derivat **106**, welches sich nur durch Methyl- statt durch Ethylsubstitution an R_1 und R_2 von Istradefyllin (**116**) unterschied, zeigte eine 90-fache Potenzverschlechterung ($IC_{50} = (3,6 \pm 0,9) \mu M$, maximale Reporteraktivierung = $2,03 \pm 0,08$). Dieses Resultat deutete darauf hin, dass das Alkylierungsmuster an R_1 und R_2 ausschlaggebend für die potente Modulation der Aktivität an Gal4-TLX ist. Zusätzlich wurde diese Schlussfolgerung durch die Charakterisierung des Theophyllinanalogs **104d** ($IC_{50} = (0,19 \pm 0,06) \mu M$, maximale Reporteraktivierung = $3,27 \pm 0,10$) bestätigt, welches auch eine schlechtere Potenz im Vergleich zu Istradefyllin (**116**) aufwies. Die Reduktion der Styryldoppelbindung in einen flexiblen Ethanlinker (**104e**, $IC_{50} = (1,2 \pm 0,3) \mu M$, maximale Reporteraktivierung = $2,50 \pm 0,14$) zeigte ebenfalls keinen Verbesserungseffekt im Vergleich

zu **104d**, sodass auf eine mögliche Präferenz für starre Atomgruppen zur Expansion an der 8-Position von Theophyllin geschlossen werden konnte.

Weil längere Alkylketten (Methyl, Ethyl) ein determinierendes Strukturmerkmal für die Aktivitätsmodulation an Gal4-TLX darstellten (Vergleich von **106** zu **116**), wurde diese vorläufige Schlussfolgerung durch Charakterisierung von 1,3-Dipropylxanthin (**117**) analysiert. 1,3-Dipropylxanthin (**117**) unterscheidet sich nur in R₁ und R₂ durch eine *n*-Propyl- statt einer Methylsubstitution von Theophyllin (**68**). Erwartungsgemäß erfolgte mit **117** (IC₅₀ = (0,12 ± 0,04) μM, maximale Reporteraktivierung = 1,89 ± 0,09) eine Potenzverbesserung um Faktor 85 im Vergleich zu Theophyllin (**68**).

Schlussendlich wurde **100k** und nicht **100l** aufgrund der höheren Ähnlichkeit zu Istradefyllin (**116**) (polare Interaktionen der Sauerstoffatome) als potentester Kandidat der Theophyllinserie durch längere, lineare Alkylketten substituiert. Bereits die Ethylsubstitution an R₁ und R₂ mit **115** (IC₅₀ = (0,039 ± 0,017) μM, maximale Reporteraktivierung = 4,0 ± 0,3) schaffte eine äquipotente Verbindung zu Istradefyllin (**116**, IC₅₀ = (0,04 ± 0,01) μM, maximale Reporteraktivierung = 2,63 ± 0,15), die sich durch eine deutlich höhere maximale Reporteraktivierung hervorhob. Durch *n*-Propylsubstitution gelang eine weitere Verbesserung mit dem Derivat **104f** (IC₅₀ = (0,0090 ± 0,0018) μM, maximale Reporteraktivierung = 3,04 ± 0,15). Auch hier konnte anhand der zunehmenden aliphatischen Kettenlänge an R₁ und R₂ (**100k**: IC₅₀ = (0,158 ± 0,018) μM; **115**: IC₅₀ = (0,039 ± 0,017) und **104f**: IC₅₀ = (0,0090 ± 0,0018) μM) der wichtige Einfluss des Alkylierungsmusters auf die Aktivität an Gal4-TLX bestätigt werden.

Drei ausgewählte Xanthinderivate (**55**, **100k** und **116**) wurden exemplarisch auf ihr Selektivitätsprofil bezüglich weiterer Aktivitäten an Gal4-NRs untersucht. Keine dieser Verbindungen zeigte signifikante Effekte auf die Aktivität 14 weiterer Gal4-NRs (CAR, FXR, LXRα/β, PPARα/γ/δ, RARα, RXRα, VDR, NOR-1, Nurr1, Nurr77, RORα) (siehe Abbildung 34).

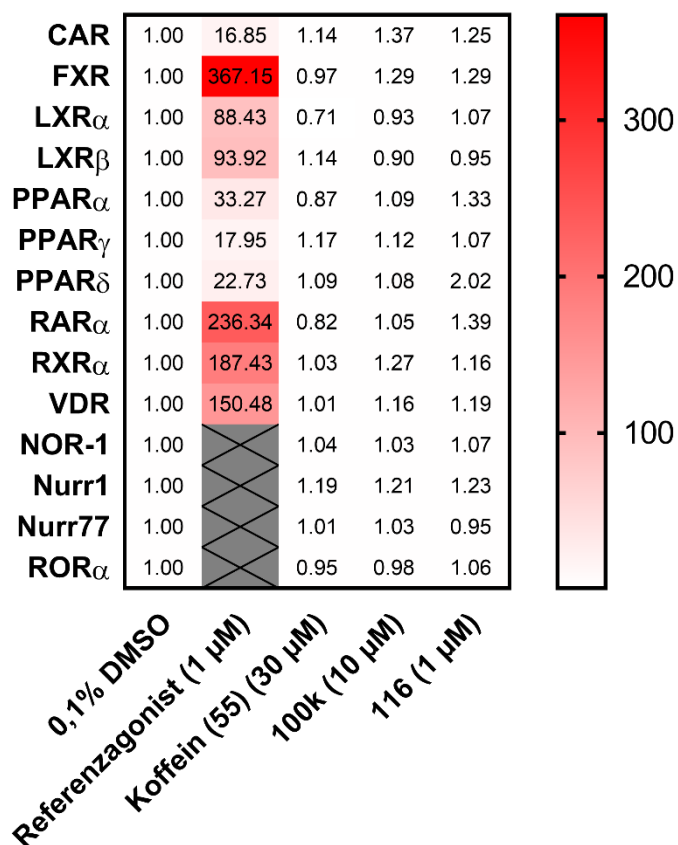


Abbildung 34: Selektivitätsprofil von Koffein (**55**) (30 μ M), **100k** (10 μ M) und Istradefyllin (**116**) (1 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle. Als Positivkontrolle wurden Gal4-NRs mit entsprechenden Referenzagonisten (1 μ M) aktiviert (CAR: CITCO, FXR: GW4064, LXR α / β : T0901317, PPAR α : GW7647, PPAR γ : Pioglitazon, PPAR δ : L165041, RAR α : Tretinoin, RXR α : Bexaroten, VDR: Calcitriol). Konstitutiv transkriptionsaktive Gal4-NRs (NOR-1, Nurr1, Nurr7 und ROR α) wurden ohne einen Referenzagonisten (mit X gekennzeichnet) auf eine Aktivität geprüft. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit n = 3 dargestellt.

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln für einige Xanthine gezeigt, konnten für die potenteren Derivate **100k** (10 μ M), Istradefyllin (**116**) (1 μ M) und **115** (1 μ M) ebenfalls über Kontrolleexperimente Gal4-VP16-spezifische Effekte ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 35).

Ergebnisse und Diskussion

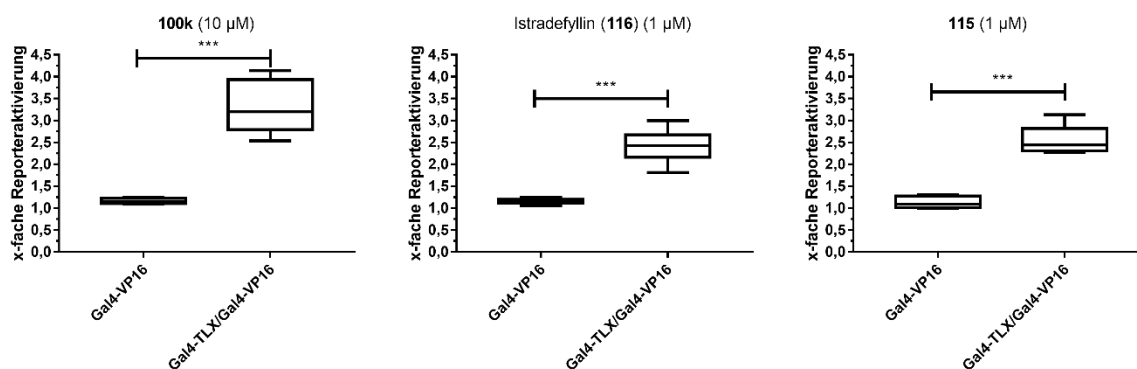


Abbildung 35: Aktivität an Gal4-TLX von **100k** (10 μM), Istradefyllin (**116**) (1 μM) und **115** (1 μM) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Boxplots stellen die minimale bzw. maximale x-fache Reporteraktivierung im entsprechenden Setting gegen eine 0,1 % unbehandelte DMSO-Kontrolle dar. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler mit $n \geq 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Somit wurden durch die bisherige SAR-Untersuchung erstmalig hochpotente inverse TLX-Agonisten identifiziert.

Um die bisherigen inversen TLX-agonistischen Effekte übergreifend zu validieren, wurden ausgewählte Derivate in orthogonalen und zellfreien Systemen (Kernresonanzspektroskopie (NMR), ITC) und fluoreszenzbasierten Experimenten (HTRF; Planung, Durchführung und Datenanalyse aller HTRF-Experimente wurden von Dr. Jan Heering und Dr. Whitney Kilo übernommen) analysiert. Verbindungen **55**, **100k**, **116** und **115** wurden im TLXfull/TAE-Reporterassay bis zu einer Konzentration von 100 μM auf eine Aktivität an TLX-Volllängenprotein untersucht (siehe Abbildung 36). **55**, **116** und **115** wiesen hier jedoch keine nennenswerte Aktivität auf (siehe Abbildung 36 A, C und D). Nur **100k** zeigte bei 100 μM einen leichten Anstieg der x-fachen Reporteraktivierung, welcher aber nicht auf eine erhöhte Lumineszenzdetektion der Firefly-Luciferase sondern auf toxische Effekte (Renilla-Luciferase) zurückzuführen war (siehe Abbildung 36 B). Negative Ergebnisse wurden außerdem im VP16-RXRα/Gal4-TLX-Reporterassay für **55**, **100k** und **115** erhalten. Nur **116** zeigte bereits bei einer sehr geringen Konzentration eine erhöhte x-fache Reporteraktivierung (siehe Abbildung 36 C).

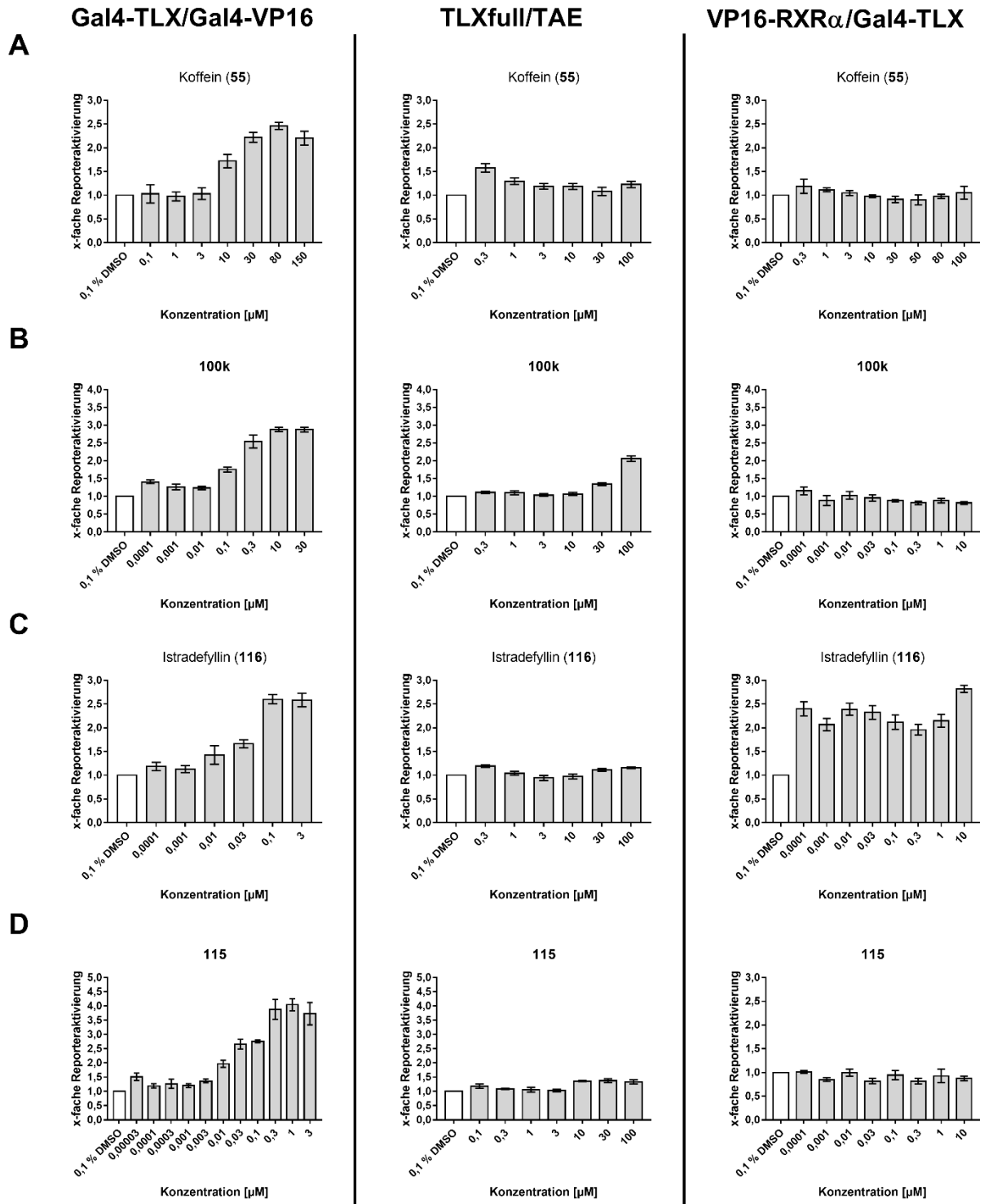


Abbildung 36: Verdünnungsreihen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-, TLXfull/TAE- und VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay von **55** (A), **100k** (B), **116** (C) und **115** (D). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Der Vergleich der x-fachen Reporteraktivierungen zwischen dem Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay von **55**, **100k**, **116** und **115** klassifizierten diese unerwarteterweise als inaktive Substanzen in Bezug auf das TLXfull/TAE-System, da weder

eine konzentrationsabhängige Zunahme noch Abnahme des Reportersignals zu verzeichnen war. Demzufolge wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass die xanthinvermittelte TLX-Modulation nicht über simple TLX-Monomer-Xanthin-Wechselwirkungen zu erklären war. Im Gegensatz dazu deuteten die Gal4-TLX/Gal4-VP16-Daten an, dass komplexe TLX-Oligomere in die xanthinvermittelte TLX-Modulation involviert sein könnten.

Um potentielle TLX-vermittelte, zelluläre Effekte in Abhängigkeit der identifizierten inversen Agonisten zu untersuchen, wurde das TLX-Zielgenexpressionsprofil nach einer achtstündigen Behandlung mit ccrp2 (**2**, 10 μ M) als Positivkontrolle, Koffein (**55**, 30 μ M), **100k** (10 μ M), Istradefyllin (**116**, 1 μ M) und **115** (1 μ M) mit Hilfe von quantitativer Echtzeit-PCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) untersucht. Hierbei wurde das Expressionslevel von literaturbekannten TLX-Zielgenen wie p21, PTEN, TET3, SIRT1 (engl. *sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1*, SIRT1), TLX, BTG2 (engl. *BTG anti-proliferation factor 2*, BTG2), SLC1a1 (engl. *solute carrier family 1 member 1*, SLC1a1) und TUSC1 (engl. *tumor suppressor candidate 1*, TUSC1) in T98G-Glioblastomzellen im Vergleich zu einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle analysiert^{89,102,120,136}. T98G-Zellen zeigten eine glioblastom-typische Überexpression von TLX, sodass diese Zelllinie geeignet für die quantitative Untersuchung der TLX-Zielgenexpression erschien^{101,168}. Wichtig zu erwähnen ist, dass keine der getesteten Substanzen signifikant das Expressionslevel von TLX veränderte, sodass potentielle Effekte höchstwahrscheinlich auf eine direkte TLX-Modulation zurückzuführen waren (siehe Abbildung 37 E). Der Referenzligand ccrp2 (**2**) zeigte nur signifikant veränderte PTEN Expressionslevel im Vergleich zur unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle (siehe Abbildung 37 B). Hier konnte nur für Koffein (**55**) ein signifikanter, verminderter Effekt festgestellt werden, welches aber im Rahmen der physiologischen Rolle von TLX fragwürdig ist, da hier eigentlich erhöhte PTEN mRNA Level erwartet wurden. Da auch die restlichen Xanthinderivate (**100k**, **116** und **115**) keine eindeutigen Effekte demonstrierten, konnte bisher eine TLX-vermittelte PTEN Genexpressionsänderung durch die Xanthinderivate nicht bewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die Xanthinderivate (**55**, **100k**, **116** und **115**) allesamt keine signifikanten, veränderten Expressionslevel von TET3, BTG2 und TUSC1 (siehe Abbildung 37 C, F und H). Signifikante Effekte auf die TLX-regulierte Genexpression konnten für **115** (p21), **55** und **115** (SIRT1) und **115** (SLC1a1) verzeichnet werden (siehe Abbildung 37 A, D und G). Allgemein waren alle beobachteten Genexpressionsveränderungen bis auf SIRT1 nur sehr schwach ausgeprägt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass möglicherweise die

Ergebnisse und Diskussion

Inkubationszeit von acht Stunden zu gering war, um relevante veränderte Genexpressionslevel zu erfassen.

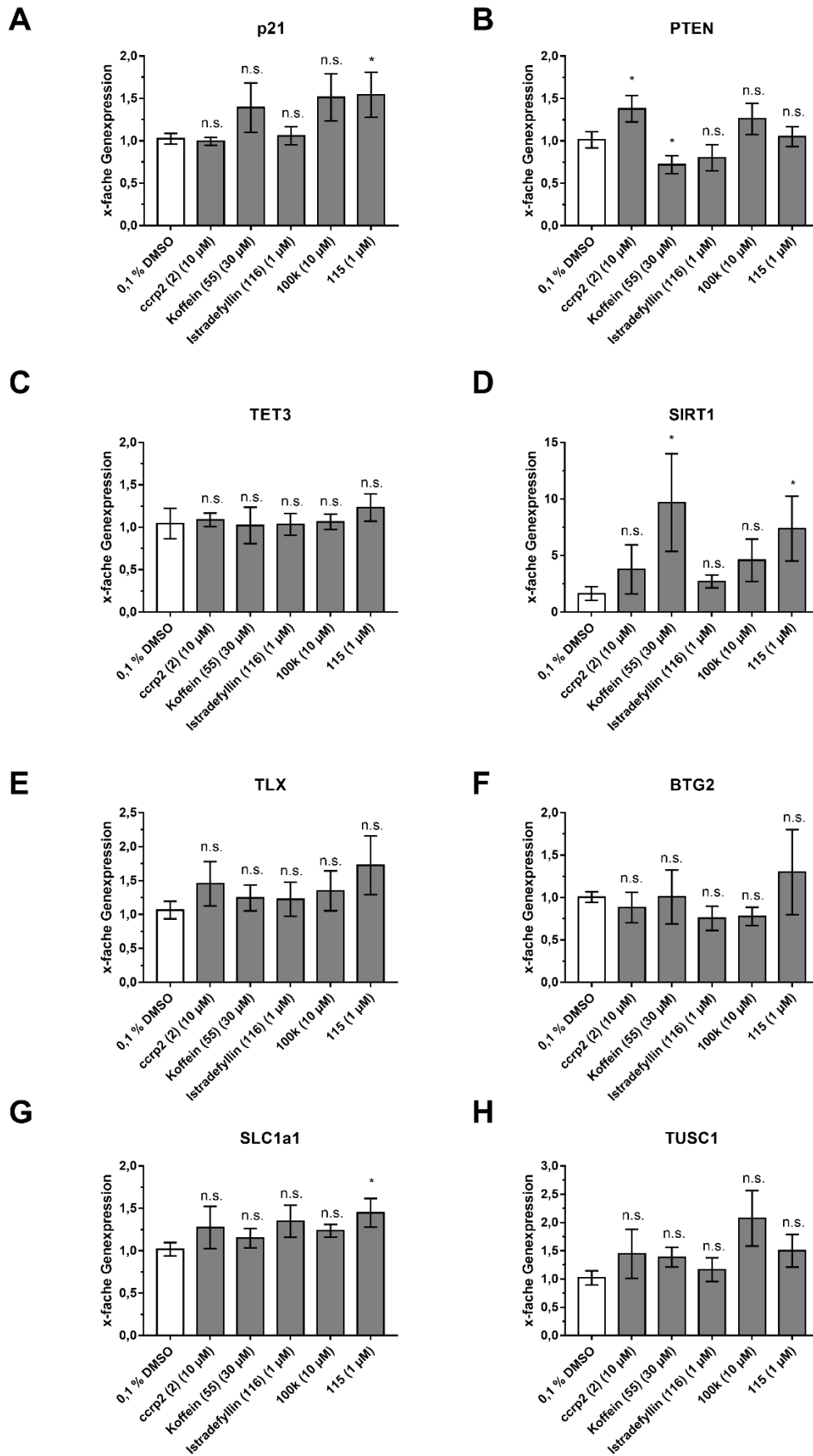


Abbildung 37: Relative Quantifizierung der x-fachen Genexpression der TLX-Zielgene p21 (A), PTEN (B), TET3 (C), SIRT1 (D), BTG2 (F), SLC1a1 (G) und TUSC1 (H) nach achtstündiger Inkubation von T98G-Glioblastomzellen mit

Ergebnisse und Diskussion

ccrp2 (**2**, 10 μM), Koffein (**55**, 30 μM), Istradefyllin (**116**, 1 μM), **100k** (10 μM) und **115** (1 μM). Die relative Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{C}_t$ -Methode unter Verwendung von GAPDH (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) als Referenzgen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Genexpression einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Probe analysiert, $p \leq 0,001 = \text{***}$, $p \leq 0,01 = \text{**}$, $p \leq 0,05 = \text{*}$, $p > 0,05 = \text{nicht signifikant (n.s.)}$.

Da es sich bei allen bisher behandelten Xanthinderivaten um literaturbekannte Antagonisten der ADORs handelte, stellte sich die Frage, ob die bisher ermittelten, zellulären Effekte zusätzlich durch ADOR-vermittelte Signaltransduktionswege getriggert waren^{144,169}. Aus diesem Grund war ein Bindungsnachweis an rekombinant exprimiertem TLX-LBD-Protein notwendig. Hierbei wurde in Kooperation mit Dr. Sridhar Sreeramulu (AK Prof. Dr. Harald Schwalbe, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie) anhand von Signalverschiebungen der Ligandensignale im ^1H -NMR-Spektrum eine direkte Bindung an die rekombinant hergestellte TLX-LBD untersucht. Es erfolgte die Inkubation von TLX-LBD-Protein (50 μM) mit den jeweiligen Testsubstanzen (ccrp2 (**2**), Koffein (**55**), **100k**, Istradefyllin (**116**) und **115**) bei einer Konzentration von 50 μM im entsprechenden Puffer (20 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin)) gelöst mit 1 % DMSO-Gehalt. Als Referenzsubstanz wurde ccrp2 (**2**) verwendet, welches in diesem Fall eindeutige Signalverschiebungen aufwies (siehe Abbildung 38 A). Koffein (**55**) und **100k** zeigten keine nennenswerten Signalverschiebungen, sodass im NMR-Experiment bei den verwendeten Konzentrationen keine Interaktion mit der TLX-LBD nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 38 B und C).

Ergebnisse und Diskussion

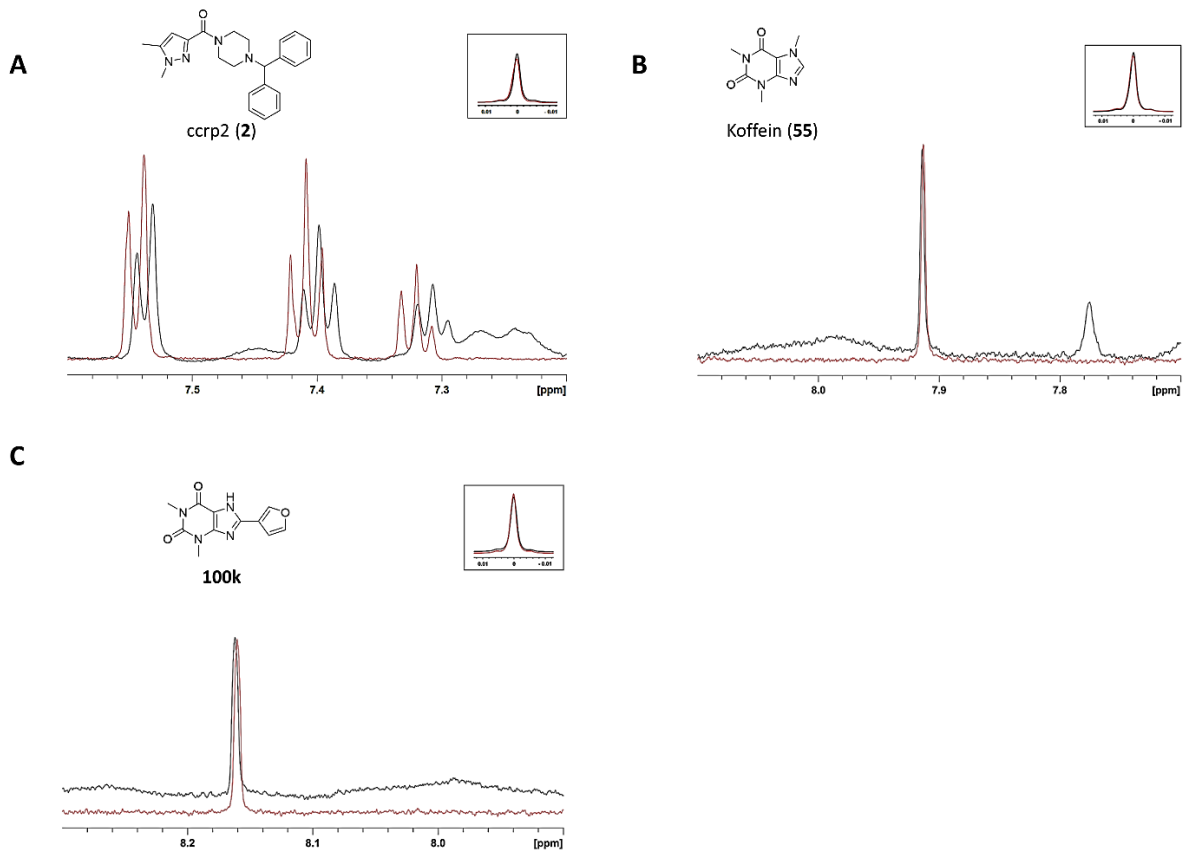


Abbildung 38: ^1H -NMR Spektrum der aromatischen Ligandensignale von ccrp2 (**2**) (**A**), Koffein (**55**) (**B**) und **100k** (**C**) in Anwesenheit (schwarz) oder Abwesenheit (rot) von rekombinantem TLX-LBD-Protein. Alle Spektren wurden mit Hilfe von Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP-Na) referenziert (schwarze Box). Für **100k** (**C**) sind nicht alle aromatischen Signale gezeigt.

Für die an TLX potenteren Verbindungen **116** und **115** konnte dagegen eine Hochfeldverschiebung der aromatischen Ligandensignale wie bei ccrp2 (**2**) beobachtet werden, was auf eine direkte Interaktion mit der TLX-LBD schließen ließ (siehe Abbildung 39).

Ergebnisse und Diskussion

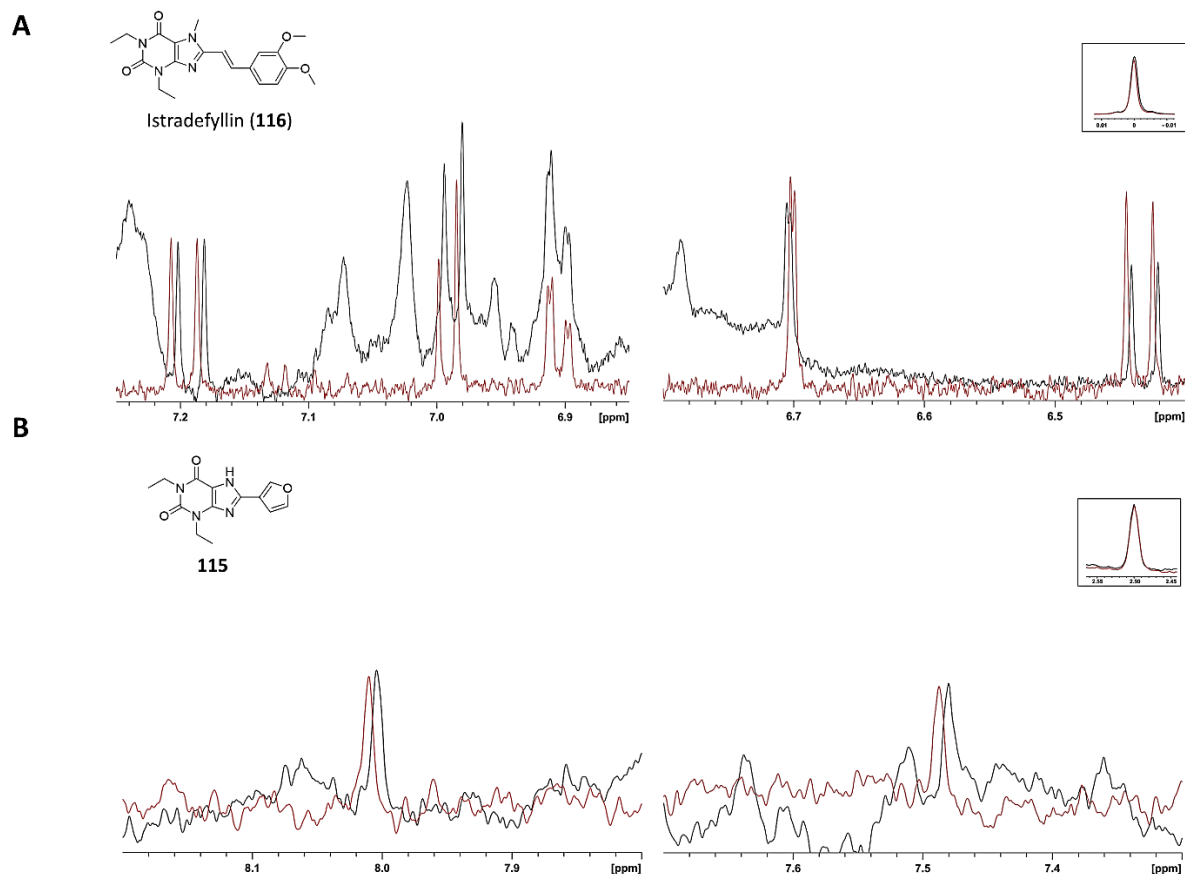


Abbildung 39: ^1H -NMR Spektrum der aromatischen Ligandensignale von **116** (A) und **115** (B) in Anwesenheit (schwarz) oder Abwesenheit (rot) von rekombinantem TLX-LBD-Protein. Spektren in (A) wurden mit Hilfe von Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP-Na) referenziert (schwarze Box), während Spektren in (B) mit Hilfe von Dimethylsulfoxid- d_6 ($\text{DMSO-}d_6$) referenziert wurden (schwarze Box). Für **115** (B) sind nicht alle aromatischen Signale gezeigt.

Als orthogonaler Bindungsnachweis wurden Koffein (**55**), das *ortho*-Chlorderivat (**104a**) und **115** mittels ITC-Experimenten bei einer Temperatur von 37 °C studiert. Besonders hervorzuheben ist die Rolle von **104a** in dieser Versuchsreihe. Für diese Verbindung konnte nach intensiver Literaturrecherche keine signifikante ADOR-Affinität identifiziert werden¹⁷⁰. Gelingt ein eindeutiger Bindungsnachweis an rekombinanter TLX-LBD mit **104a**, so könnte davon ausgegangen werden, dass die beobachteten zellulären Effekte über TLX-ligandenmodulierte Signalwege zu erklären sind. Zu diesem Zweck wurde 10-40 μM rekombinantes TLX-LBD-Protein in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) mit 1 % DMSO-Gehalt in separaten Experimenten mit Koffein (**55**, 100 μM), **104a** (100 μM) oder **115** (100 μM) im selben Puffer und DMSO-Gehalt titriert. Um sonstige, unspezifische Wärmeeffekte (Verdünnungswärme etc.) auszuschließen, wurden auch die entsprechenden Kontrolltitrationen (Kontrollexperiment A: Puffer (1 % DMSO) gegen

entsprechende Testsubstanz, Kontrollexperiment B: TLX-LBD-Protein (1 % DMSO) gegen Puffer (1 % DMSO)) mit den zum vorherigen Experiment identischen Bedingungen durchgeführt. Während in allen Kontrolltitrationen schwache exotherme Prozesse zu beobachten waren, zeigten alle Protein-Ligand Experimente endotherme Wärmeraten auf, sodass die direkten TLX-Xanthinderivat-Interaktionen nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 40).

Ergebnisse und Diskussion

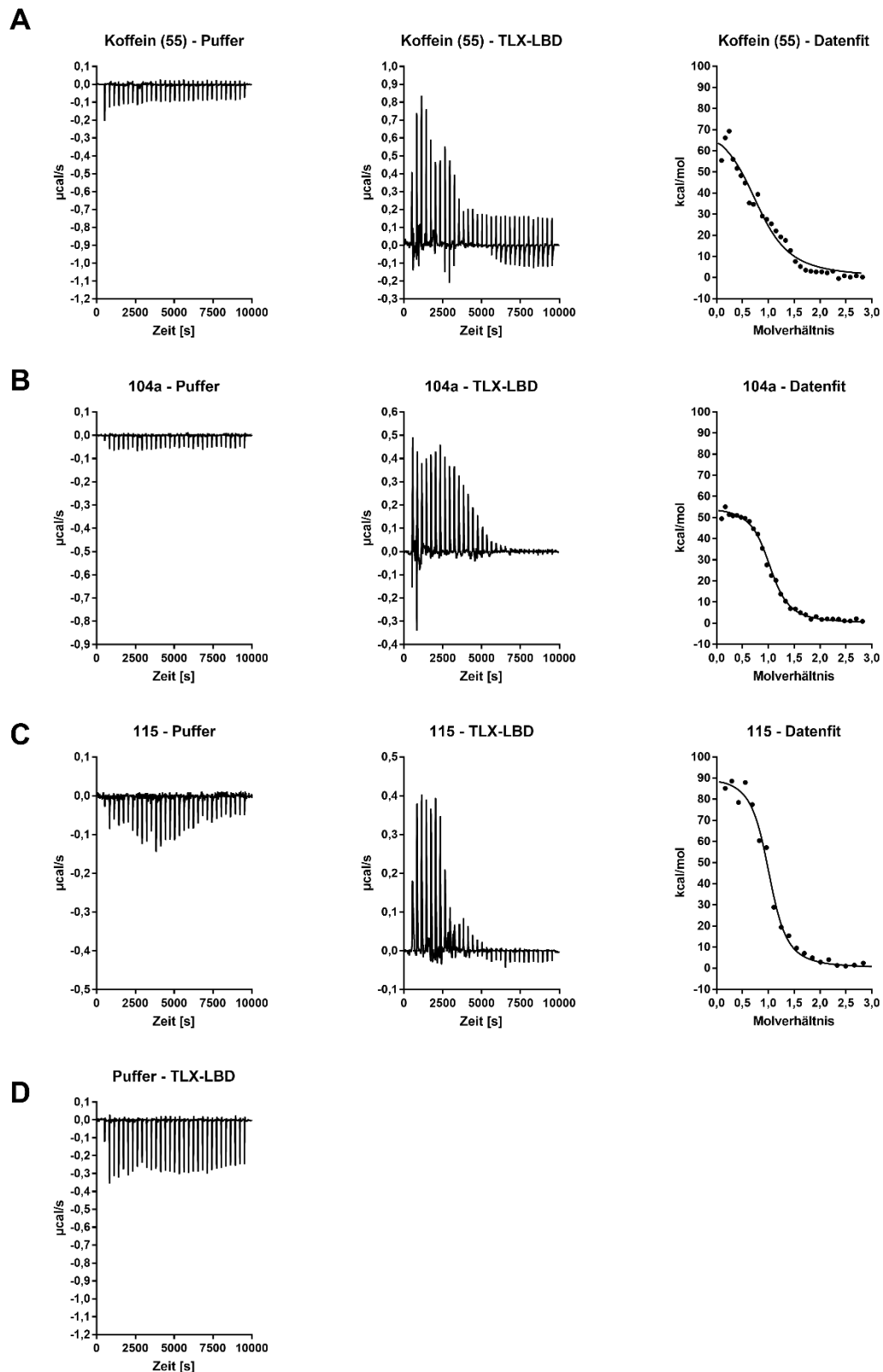


Abbildung 40: ITC-Experimente der TLX-LBD (10-40 μM) mit den Xanthinen Koffein (**55**) (100 μM), **104a** (100 μM) und **115** (100 μM). (A) Titrationsexperiment von Koffein (**55**) in Puffer, Koffein (**55**) in TLX-LBD-Protein und entsprechender Datenfit der korrigierten Wärmeraten. (B) Titrationsexperiment von **104a** in Puffer, **104a** in TLX-LBD-Protein und entsprechender Datenfit der korrigierten Wärmeraten. (C) Titrationsexperiment von **115** in

Ergebnisse und Diskussion

Puffer, **115** in TLX-LBD-Protein und entsprechender Datenfit der korrigierten Wärmeraten. (D) Titrationsexperiment von Puffer in TLX-LBD-Protein als zusätzliches Kontrollexperiment.

Die Analyse der erhaltenen korrigierten Wärmeraten erlaubte die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d , dem stöchiometrischen Koeffizienten n und den thermodynamischen Parametern ΔH (Enthalpieänderung [kcal/mol]) und $T\Delta S$ (Temperatur [K] mal Entropieänderung [kcal/mol·K]). Ähnlich wie die zellulären Daten aus dem Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay zeigten die ITC-Experimente eine Affinitätszunahme (Koffein (**55**): $K_d = 3,2 \mu\text{M}$; **104a**: $K_d = 0,8 \mu\text{M}$ und **115**: $K_d = 0,3 \mu\text{M}$) (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Erhaltene thermodynamische Parameter der Xanthine **55**, **104a** und **115** nach dem Datenfit. K_d = Dissoziationskonstante [μM], n = stöchiometrischer Koeffizient, ΔH = Enthalpieänderung [kcal/mol], $T\Delta S$ = Temperatur [K] mal Entropieänderung [kcal/mol·K].

Parameter	Koffein (55)	104a	115
K_d [μM]	3,2	0,8	0,3
n	0,89	1,02	0,98
ΔH [kcal/mol]	73	55	91
$T\Delta S$ [kcal/mol]	81	64	100

Um ADOR-vermittelte Effekte auf die Aktivität an Gal4-TLX zu untersuchen, wurde Adenosin (**81**) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay untersucht. Hierbei konnte für Adenosin (**81**) bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ keine vergleichbaren Effekte zu den Xanthinen **55**, **100k**, **104a**, **116** und **115** verzeichnet werden (siehe Abbildung 41 A). Außerdem zeigte cAMP (**82**) als wichtiges Botenmolekül der ADOR-Kaskade im Vergleich zum nicht-selektiven ADOR-Antagonisten Koffein (**55**) keine Aktivität an Gal4-TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (siehe Abbildung 41 B). Zusätzlich konnten keine kompetitiven Effekte der untersuchten Xanthine **55**, **100k** und **104a** durch Coinkubation mit Adenosin (**81**, $3 \mu\text{M}$) festgestellt werden, was im Fall einer ADOR-Involvierung zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven führen würde (siehe Abbildung 41 C-E). Diese Befunde deuteten an, dass die ADOR-vermittelte Signaltransduktion keinen bedeutenden Einfluss auf die beobachteten Effekte im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay hat.

Ergebnisse und Diskussion

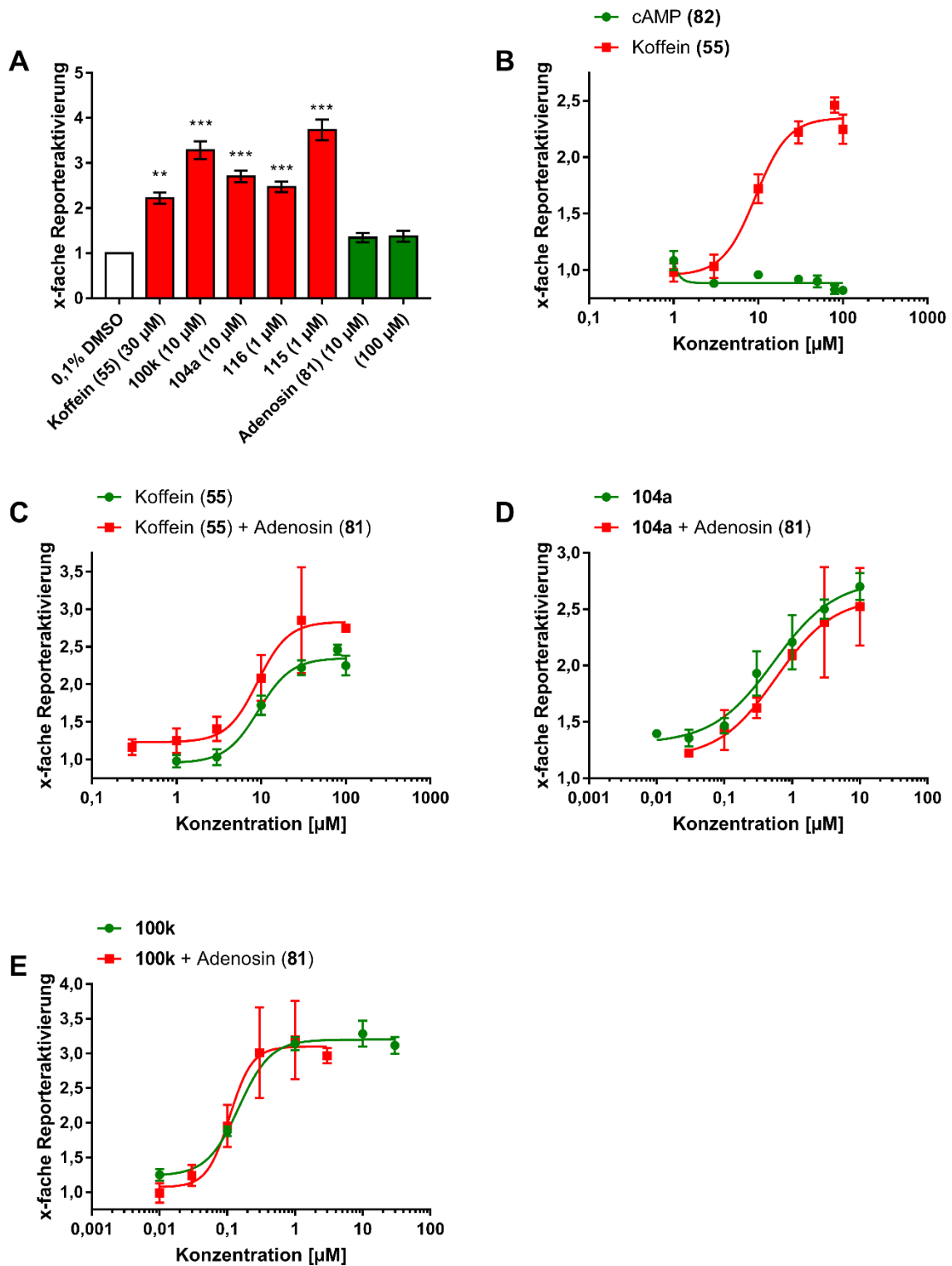


Abbildung 41: Kontrolllexperimente mit Adenosin (81) zum Ausschluss ADOR-vermittelter Signalwege im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. (A) x-fache Reporteraktivierungen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay von Koffein (55) (30 μ M), 100k (10 μ M), 104a (10 μ M), Istradefyllin (116) (1 μ M), 115 (1 μ M) und Adenosin (81) (10, 100 μ M). (B) Dosis-Wirkungskurven von Koffein (55) und cAMP (82) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. (C) Dosis-Wirkungskurven von 55 und 55 + 81 (3 μ M) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. (D) Dosis-Wirkungskurven von 104a und 104a + 81 (3 μ M) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-

Ergebnisse und Diskussion

Reportergenassay. (E) Dosis-Wirkungskurven von **100k** und **100k + 81** (3 μM) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reportergenassay. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t-Test* gegen die x-fache Reporteraktivierung einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Probe analysiert mit $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$.

Im nächsten Schritt wurden **55**, **100k**, **104a**, **116** und **115** auf eine potentielle Modulation der konstitutiv aktiven TLX-Mutanten im Gal4-Format untersucht. Dabei wurden in einem separaten unabhängigen Experiment die IC_{50} -Werte im Gal4-TLX_{A189E}/Gal4-VP16- (rote Kurve) und im Gal4-TLX_{F226W|I230E}/Gal4-VP16-Reportergenassay (grüne Kurve) ermittelt und mit dem IC_{50} -Wert aus dem Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reportergenassay (graue Kurve) verglichen (siehe Abbildung 42).

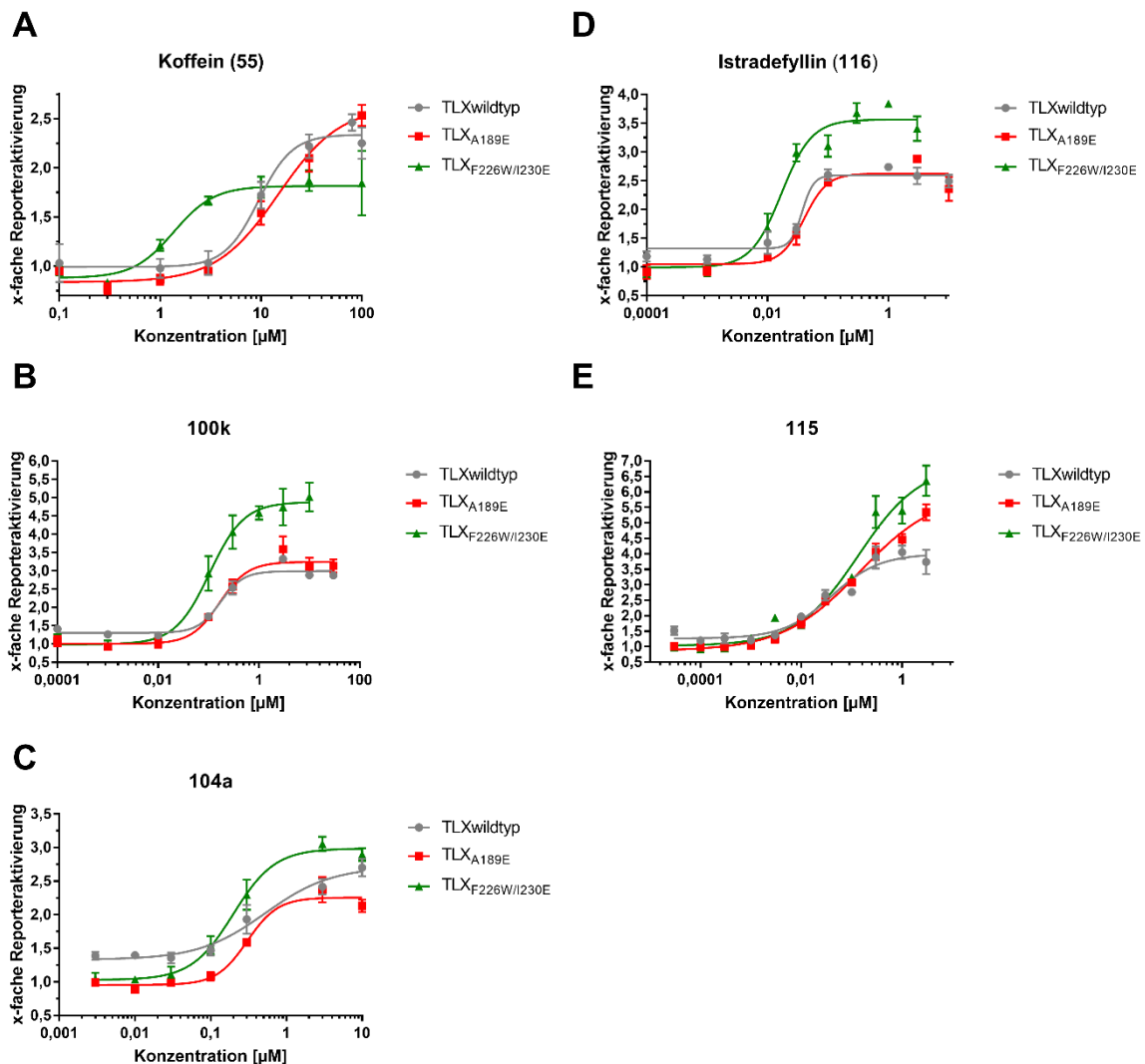


Abbildung 42: Dosis-Wirkungskurven im Gal4-TLX/Gal4-VP16- (grau), Gal4-TLX_{A189E}/Gal4-VP16- (rot) und Gal4-TLX_{F226W|I230E}-Reportergenassay (grün) der Verbindungen Koffein (**55**) (A), **100k** (B), **104a** (C) Istradefyllin (**116**) (D) und **115** (E). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Für **55**, **100k**, **104a** und **116** konnte im Gal4-TLX_{F226W|I230E}/Gal4-VP16-Reporterassay ein verringerter IC₅₀-Wert ermittelt werden. Dieser Affinitätsgewinn erlaubte die Annahme einer Bindungsregionlokalisierung und die Beteiligung von F226 und I230 an der Xanthinerkennung, sodass die Xanthine vermutlich in einer klassischen, orthosterischen Bindungstasche binden. Für **115** hingegen konnte kein signifikanter Potenzunterschied ermittelt werden (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht der IC₅₀-Werte und maximale Reporteraktivierungen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-, Gal4-TLX_{A189E}/Gal4-VP16- und Gal4-TLX_{F226W|I230E}/Gal4-VP16-Reporterassay von **55**, **100k**, **104a**, **116** und **115**. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler mit n ≥ 3 dargestellt.

	IC ₅₀ [μM] und maximale Reporteraktivierung im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay	IC ₅₀ [μM] und maximale Reporteraktivierung im Gal4-TLX _{A189E} /Gal4-VP16-Reporterassay	IC ₅₀ [μM] und maximale Reporteraktivierung im Gal4-TLX _{F226W I230E} /Gal4-VP16-Reporterassay
Koffein 55	(9,4 ± 1,4) μM 2,32 ± 0,08	(15 ± 1) μM 2,6 ± 0,2	(1,3 ± 0,3) μM 1,8 ± 0,1
100k	(0,158 ± 0,018) μM 2,88 ± 0,06	(0,17 ± 0,03) μM 3,2 ± 0,1	(0,10 ± 0,03) μM 4,9 ± 0,2
104a	(0,5 ± 0,3) μM 2,7 ± 0,2	(0,30 ± 0,04) μM 2,3 ± 0,1	(0,20 ± 0,03) μM 3,0 ± 0,1
Istradefyllin 116	(0,04 ± 0,01) μM 2,63 ± 0,15	(0,04 ± 0,01) μM 2,6 ± 0,1	(0,017 ± 0,003) μM 3,6 ± 0,1
115	(0,039 ± 0,017) μM 4,0 ± 0,3	(0,15 ± 0,07) μM 6,0 ± 0,6	(0,14 ± 0,08) μM 6,9 ± 0,9

Da nicht alle getesteten Verbindungen eine Potenzverbesserung zeigten (**115**), konnte angenommen werden, dass weitere Aminosäuren zur Ligandenerkennung eine determinierende Rolle spielen und das lokalisierte Bindungsepitop sehr sensitiv auf Strukturveränderungen des Xanthingerüsts reagierte.

Des Weiteren wurden die Xanthine in orthogonalen HTRF-Experimenten studiert. Alle Experimente wurden hierbei von Dr. Jan Heering und Dr. Whitney Kilu geplant, durchgeführt und analysiert. In einem ersten Schritt wurde die TLX-Atrophin Interaktion untersucht, da diese Wechselwirkung literaturbekannt ist und die Atrophinfamilie eine TLX-spezifische

Corepressorklasse darstellt^{93,108,171,172}. Hierbei wurde sGFP (engl. *superfolder green fluorescent protein*, sGFP)-gelabeltes rekombinantes TLX-LBD-Protein als FRET-Akzeptor (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) mit biotinyliertem Wildtyp Atroboxpeptid als FRET-Donor, welches mit Tb³⁺-Kryptat über einen Streptavidinlinker gelabelt war (Tb-SA), in Titrationsexperimenten untersucht. In ähnlicher Weise wurde eine Atroboxpeptid Mutante als FRET-Donor eingesetzt, die nicht mit der TLX-LBD wechselwirken kann¹¹⁸. Wie zu erwarten, konnte eine Interaktion von sGFP-TLX-LBD mit dem Tb-SA-Wildtyp-Atroboxpeptid beobachtet werden, während die entsprechende Mutante nicht rekrutiert wurde (siehe Abbildung 43 A). Eine ligandenabhängige Modulation der TLX-Atroboxpeptid Wechselwirkung unter Verwendung der Liganden ccrp2 (**2**), Koffein (**55**), **100k** und Istradefyllin (**116**) (bei verwendeten Konzentrationen von 10 µM) konnte nicht detektiert werden (siehe Abbildung 43 B).

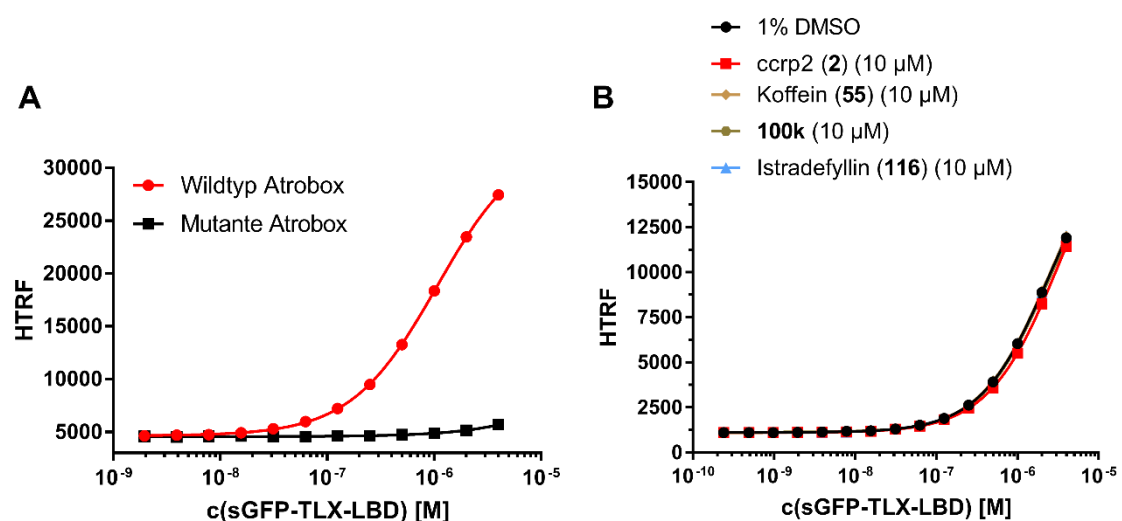


Abbildung 43: Untersuchung von sGFP-TLX-LBD mit Tb³⁺-Kryptat-Streptavidin (Tb-SA) gelabelten Atroboxpeptiden. (A) Wildtyp-Tb-SA-Atroboxpeptid wurde erfolgreich von sGFP-TLX-LBD rekrutiert, während das mutierte Tb-SA-Atroboxpeptid nicht mit sGFP-TLX-LBD interagiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 3 dargestellt. (B) Interaktion von sGFP-TLX-LBD mit Wildtyp-Tb-SA-Atroboxpeptid wurde nicht durch die Liganden ccrp2 (**2**), Koffein (**55**), **100k** und Istradefyllin (**116**) moduliert (alle Substanzen wurden bei einer Konzentration von 10 µM verwendet). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 3 dargestellt.

Als nächstes wurde eine kommerziell erhältliche Bibliothek mit 29 Fluorescein-gelabelten Coregulatorpeptiden (FRET-Akzeptor) mit Tb-SA-TLX-LBD (FRET-Donor) auf potentielle Rekrutierungseffekte untersucht. Gleichzeitig wurde Koffein (**55**) bei einer Konzentration von 100 µM verwendet, um modulatorische Effekte zu erfassen. Koffein (**55**) zeigte keine

signifikanten, modulatorischen Effekte. Relativ hohe HTRF-Signale konnten allerdings für die NCoR ID1-, SMRT ID2-, D11-FXXLF-, ARA70-, PRIPPRAP250- und RIP140L8-TLX-LBD-Interaktion detektiert werden (siehe Abbildung 44, blaue Linie).

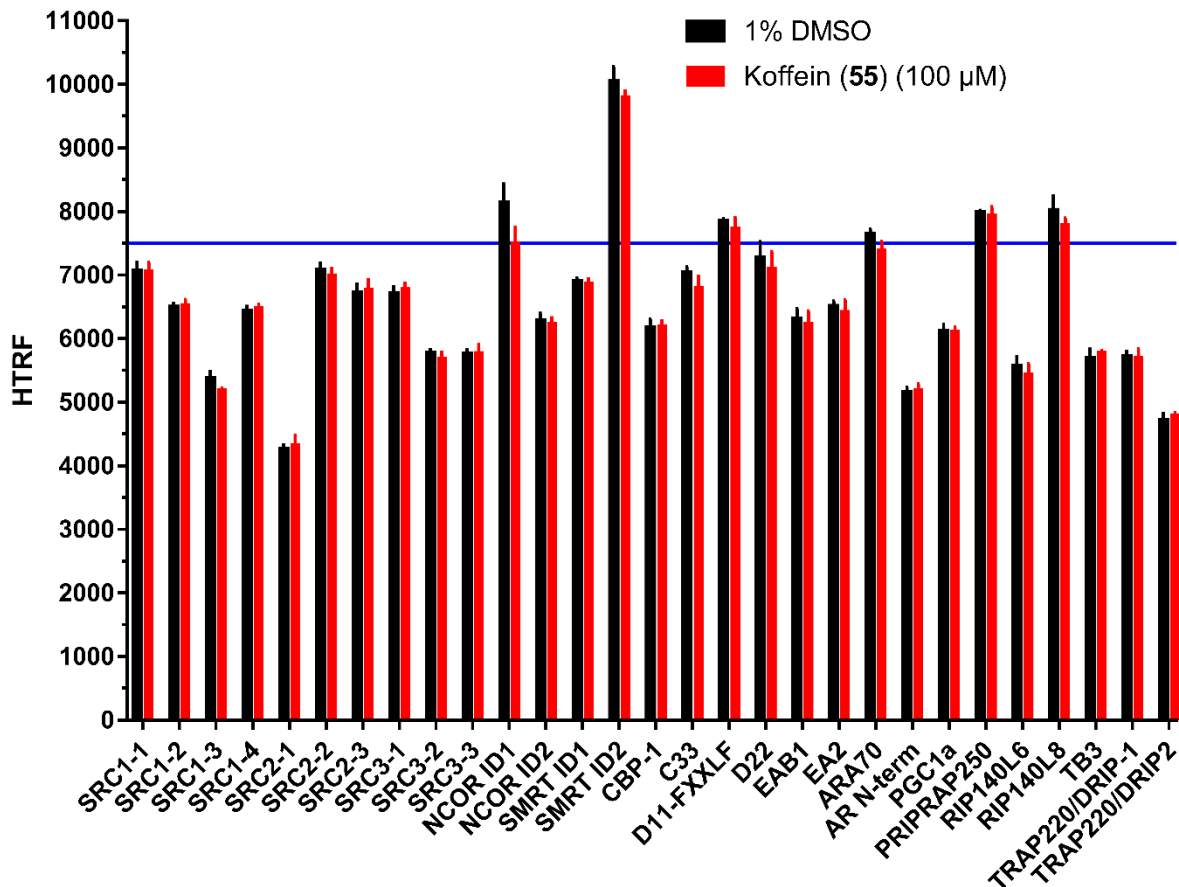


Abbildung 44: TLX-Coregulator-Rekrutierungsscreening. Potentielle Coregulator-Rekrutierungseffekte wurden unter Verwendung von Tb³⁺-Kryptat-Streptavidin (Tb-SA) gelabeltes Biotin-TLX-LBD-Protein mit Fluorescein-gelabelten Copeptiden studiert. NCoR ID1, SMRT ID2, D11-FXXLF, ARA70, PRIPPRAP250 und RIP140L8 zeigten ein relativ hohes HTRF-Signal im Vergleich zu den restlichen Coregulatorpeptiden (blaue Linie). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 4 dargestellt.

Aus diesen Gründen wurde die NCoR (ID1)- und SMRT (ID2)-TLX-LBD-Rekrutierung tiefergehend untersucht. In Titrationsexperimenten unter Verwendung von sGFP-TLX-LBD (FRET-Akzeptor) mit Tb-SA gelabeltem NCoR bzw. SMRT konnte eine konzentrationsabhängige sGFP-TLX-LBD Zunahme des HTRF-Signals detektiert werden (siehe Abbildung 45 A und B). Die Liganden (getestete Konzentration 10 µM) ccrp2 (**2**), Koffein (**55**), **100k** und Istradefyllin (**116**) zeigten keine beträchtlichen modulatorischen Effekte auf die NCoR-TLX-LBD Rekrutierung (siehe Abbildung 45 A). Die SMRT-TLX-LBD-Wechselwirkung konnte jedoch im Vergleich zum

Referenzliganden **ccrp2 (2)** durch Istradefyllin (**116**) in konzentrationsabhängiger Weise moduliert werden (siehe Abbildung 45 C).

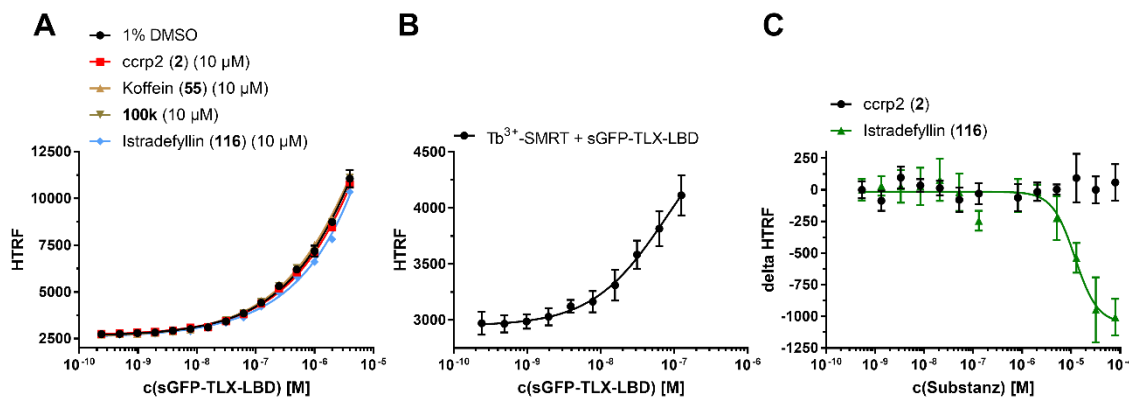


Abbildung 45: Interaktion von TLX mit NCoR und SMRT. (A) Tb³⁺-Kryptat-Streptavidin (Tb-SA) gelabeltes NCoR-Copeptid wurde mit sGFP-TLX-LBD-Protein in Anwesenheit der Liganden **ccrp2 (2)**, Koffein (**55**), **100k**, Istradefyllin (**116**) oder einer unbehandelten 1 % DMSO-Kontrolle untersucht (alle Substanzen wurden bei einer Konzentration von 10 µM verwendet). (B) Interaktion von Tb-SA-SMRT mit sGFP-TLX-LBD-Protein ohne Liganden. (C) Untersuchung der TLX-SMRT-Rekrutierung in Anwesenheit von **ccrp2 (2)** und Istradefyllin (**116**). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 3 dargestellt.

Da im VP16-RXRα/Gal4-TLX-Reporterassay RXRα-TLX-Heterodimer-vermittelte Reporteraktivierungen detektiert werden konnten (siehe Kapitel 4.1.5) stellte sich die Frage, ob ähnliche Effekte in HTRF-Experimenten beobachtet werden konnten. Daher wurde Tb-SA gelabelte TLX-LBD mit zunehmender Konzentration an sGFP-RXRα-LBD titriert. Hierbei konnte eine Zunahme des HTRF-Signals beobachtet werden, was auf eine Heterodimerisierung der beiden rekombinanten NR-LBDs zurückzuführen war. Die Behandlung mit den Testsubstanzen **ccrp2 (2)**, Koffein (**55**), **104a**, **100k** und Istradefyllin (**116**) (verwendete Konzentration jeweils 10 µM) führte zu einer Verstärkung der Heterodimerisierung, da eine negative Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven im Vergleich zur unbehandelten 1 % DMSO-Kontrolle verzeichnet werden konnte (siehe Abbildung 46 A). In ähnlicher Weise wurde die TLX-Homodimerisierung studiert. Tb-SA gelabelte TLX-LBD wurde mit zunehmender Konzentration an sGFP-TLX-LBD titriert. Hier konnte ebenfalls durch eine konzentrationsabhängige sGFP-TLX-LBD Zunahme höhere HTRF-Signale detektiert werden. Die Behandlung mit den Testsubstanzen **ccrp2 (2)**, Koffein (**55**), **104a**, **100k** und Istradefyllin (**116**) (verwendete Konzentration jeweils 10 µM) zeigte in ähnlicher Weise durch eine negative Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven im Vergleich zur unbehandelten 1 % DMSO-Kontrolle verstärkende TLX-Homodimerisierungseffekte (siehe Abbildung 46 B). Mit Hilfe beider HTRF-basierter Setups

konnte somit eine direkte Interaktion sowohl des Referenzliganden ccrp2 (**2**) und den Xanthinen Koffein (**55**), **104a**, **100k** und Istradefyllin (**116**) an rekombinanter TLX-LBD nachgewiesen werden.

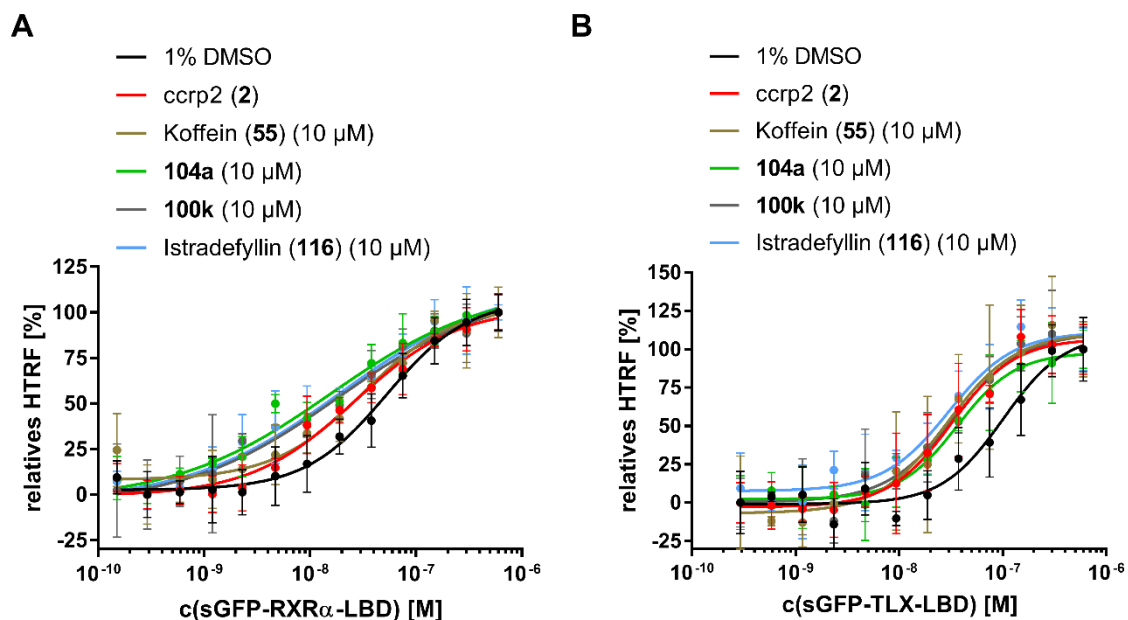


Abbildung 46: Hetero- und Homodimerisierungsexperimente unter Verwendung von sGFP-RXRα-LBD und sGFP-TLX-LBD. (A) Heterodimerisierung von Tb³⁺-Kryptat-Streptavidin (Tb-SA)-gelabelter TLX-LBD mit sGFP-RXRα-LBD wurde in Anwesenheit der Liganden ccrp2 (**2**), Koffein (**55**), **104a**, **100k**, Istradefyllin (**116**) oder einer unbehandelten 1 % DMSO-Probe studiert. (B) Homodimerisierung von Tb-SA gelabelter TLX-LBD mit sGFP-TLX-LBD wurde in Anwesenheit der Liganden ccrp2 (**2**), Koffein (**55**), **104a**, **100k**, Istradefyllin (**116**) oder einer unbehandelten 1 % DMSO-Probe studiert. Alle Substanzen wurden in beiden Experimenten bei einer Konzentration von 10 μM verwendet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 3 dargestellt.

Basierend auf Fragment **34** als inverser TLX-Agonist konnte durch die Aktivitätstestung an Gal4-TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay mit 8-Phenyltheophyllin (**97**) eine neue Leitstruktur identifiziert werden. Durch eine anschließende systematische SAR-Studie von Theophyllin (**68**) konnten potentere Verbindungen mit Hilfe des Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassays charakterisiert werden. Das Selektivitätsprofil der Xanthine deutete eine Aktivitätspräferenz an TLX innerhalb der NR-Familie auf. Allerdings sind mit sekundären Effekten über ADOR-bzw. PDE-vermittelte Signalwege zu rechnen, da die Xanthine prominente Liganden dieser Targets darstellen (wie in Kapitel 4.5.4 diskutiert). ADOR-vermittelte Effekte konnten durch Konkurrenzexperimente mit dem endogenen ADOR-Agonisten Adenosin und Inaktivität von cAMP im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay

weitgehend eingegrenzt werden. Ebenfalls deutet die ADOR-Xanthin-SAR der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Xanthinderivate eine grundlegend andere Struktur-Wirkungs-Beziehungspräferenz an (siehe Tabelle 12). So weisen Xanthin (**65**), 3-Methylxanthin (**66**), 7-Methylxanthin (**67**) und Theobromin (**70**) eine Aktivität an ADORs auf, während sie an TLX inaktiv waren. Des Weiteren zeigen die *para*-substituierten Derivate **100c** und **100i** im Vergleich zu den entsprechenden *ortho*- und *meta*-substituierten Regioisomeren im Gegensatz zu TLX eine Aktivitätspräferenz an ADORs auf. Darüber hinaus sind die Chlorderivate **104a** und **104b** am A₁-Rezeptor bis 21 µM inaktiv, während sie an TLX Potenzen im nanomolaren Bereich aufwiesen.

Tabelle 12: Übersicht literaturbekannter ADOR-Affinitäten der Xanthine und Harnsäurederivate **34**, **55**, **66-70**, **88-91**, **95-97**, **100a-k**, **104a-f**, **115** und **116** im Vergleich zu den ermittelten IC₅₀-Werten auf Gal4-TLX. [a] K_i-Werte am A₁-Rezeptor wurden durch Antagonismus des cAMP-Levels (induziert durch 10 µM Adenosin) in menschlichen, fetalen Lungenfibroblasten erhalten. [b] K_i-Werte am A₁-Rezeptor wurden durch Inhibition von 1 nM [³H]-N⁶-(Phenylisopropyl)adenosin (PIA) in Gehirnmembranen von Ratten erhalten. K_i-Werte am A₂-Rezeptor wurden durch Inhibition der 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin (NECA)-Stimulation der Adenylatcyclase in menschlichen Thrombozytenmembranen erhalten. [c] K_i-Werte oder Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven [%] am A₁-Rezeptor wurden durch Antagonismus von [³H]-PIA (oder [³H]-N⁶-Cyclohexyladenosin (CHA)) in Gehirnmembranen von Ratten, am A₂-Rezeptor durch Antagonismus von [³H]-2-[4-(2-Carboxyethyl)phenyl]ethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosin (CGS 21680) (oder [³H]-NECA in Anwesenheit von 50 nM N⁶-Cyclopentyladenosin (CPA)) in Striatummembranen von Ratten, am A₃-Rezeptor durch Antagonismus von [¹²⁵I]-N⁶-2-(4-Aminophenyl)ethyladenosin (APNEA) in CHO (engl. *chinese hamster ovary*, CHO) Membranen, welche mit A₃-cDNA stabil transfiziert waren, erhalten. [d] K_i-Werte wurden höchstwahrscheinlich anhand von Radioligandenbindungsassays in entsprechenden Spezies bestimmt. [e] K_i-Werte wurden höchstwahrscheinlich anhand von Radioligandenbindungsassays in entsprechenden Spezies bestimmt. [f] Aktivitäten am A₁-Rezeptor wurden durch Inhibition von [³H]-CHA unter Verwendung von Vorderhirnhomogenisaten aus adulten Ratten erhalten. [g] IC₅₀-Werte am A₁-Rezeptor wurden durch Antagonismus von 1 nM [³H]-CHA aus Membranen der Großhirnrinde in Ratten erhalten. IC₅₀-Werte am A₂-Rezeptor wurden durch Antagonismus von [³H]-cAMP (induziert durch 15 µM 2-Chloradenosin) in [³H]-Adenin-gelabelten in der Großhirnrinde von Meerschweinchen erhalten. [h] K_i-Werte am A₁-Rezeptor wurden durch Inhibition von [³H]-PIA aus kortikalen Membranen von Ratten erhalten. K_i-Werte am A₂-Rezeptor wurden durch Inhibition von [³H]-NECA aus Striatummembranen von Ratten erhalten. [i] K_i-Werte am A₁-Rezeptor wurden durch Inhibition von [³H]-CHA Gehirnmembranen aus Rindern erhalten. [j] IC₅₀-Werte am A₁-Rezeptor wurden durch Inhibition von [³H]-CHA in Gehirnmembranen von Rindern erhalten. [k] K_i-Werte am A₁-Rezeptor wurden durch Inhibition von 1 nM [³H]-PIA in Ratten erhalten. K_i-Werte am A₂-Rezeptor wurden durch Inhibition von 5 nM [³H]-CGS 21680 aus Ratten erhalten. Keine Daten verfügbar = -. (c) = cow = Kuh, (d) = dog = Hund, (gp) =

Ergebnisse und Diskussion

guinea pig = Meerschweinchen, (h) = human = Mensch, (m) = mouse = Maus, (r) = rat = Ratte, (rb) = rabbit = Hase, (s) = sheep = Schaf

Substanz	A ₁	A ₂	A ₃	IC ₅₀ Gal4-TLX
Xanthin 65	K _i = 130 ± 20 μM ^{173,[a]}	-	-	inaktiv (100 μM)
1-Methylxanthin 34	K _i = 6,6 ± 0,3 μM ^{173,[a]} K _i = 17 μM ^{174,[b]} K _i = 11.400 nM ^{175,[c]} K _i = 36.000 nM (r) ^{145,[d]}	K _i = 1,9 μM ^{174,[b]} A _{2A} K _i = 36.200 nM ^{175,[c]} K _i = 47.000 nM (r) ^{145,[d]} A _{2B} K _i = 6.600 nM (h) ^{145,[d]}	11,1 ± 1,6 % ^{175,[c]} K _i > 100.000 nM (r) ^{145,[d]}	(9 ± 3) μM
3-Methylxanthin 66	K _i = 87 μM ^{173,[a]} K _i = 35 μM ^{174,[b]} K _i = 35.000 nM ^{175,[c]} K _i = 100.000 nM (r) ^{145,[d]}	K _i = 240 μM ^{174,[b]} A _{2A} 38,0 ± 0,9 % ^{175,[c]} K _i = 59.000 nM (r) ^{145,[d]} A _{2B} K _i = 87.000 nM (r) ^{145,[d]}	18,1 ± 6,7 % ^{175,[c]} K _i > 100.000 nM (r) ^{145,[d]}	inaktiv (100 μM)
7-Methylxanthin 67	K _i = 97 ± 10 μM ^{173,[a]} 52,3 ± 7,9 % ^{175,[c]} K _i = 33.000 nM (r) ^{145,[d]}	A _{2A} 37,7 ± 4,9 % ^{175,[c]} K _i = 59.000 nM (r) ^{145,[d]} A _{2B} K _i = 97.000 nM (h) ^{145,[d]}	16,4 ± 9,6 % ^{175,[c]} K _i > 100.000 nM (r) ^{145,[d]}	inaktiv (100 μM)
Theophyllin 68	K _i = 4,8 ± 0,8 μM ^{173,[a]} K _i = 6.770 nM (h) ^{169,[e]} K _i = 14.000 nM (r) ^{169,[e]} K _i = 8.740 nM (r) ^{169,[e]} K _i = 7.060 nM (gp) ^{169,[e]} K _i = 4.710 nM (rb) ^{169,[e]} K _i = 9.050 nM (s) ^{169,[e]} K _i = 6.330 nM (c) ^{169,[e]}	A _{2A} K _i = 1.710 nM (h) ^{169,[e]} K _i = 6.700 nM (h) ^{169,[e]} K _i = 22.000 nM (r) ^{169,[e]} K _i = 25.300 nM (r) ^{169,[e]} A _{2B} K _i = 9.070 nM (h) ^{169,[e]} K _i = 74.000 nM (h) ^{169,[e]} K _i = 15.100 nM (r) ^{169,[e]} K _i = 5.630 nM (m) ^{169,[e]} K _i = 11.000 nM (gp) ^{169,[e]}	K _i = 22.300 nM (h) ^{169,[e]} K _i = 86.400 nM (h) ^{169,[e]} K _i = >100.000 nM (r) ^{169,[e]} K _i = 85.000 nM (r) ^{169,[e]} K _i = >100.000 nM (d) ^{169,[e]}	(10,2 ± 1,9) μM

Ergebnisse und Diskussion

		$K_i = 17.700 \text{ nM}$ $(rb)^{169,[e]}$ $K_i = 38.700 \text{ nM}$ $(d)^{169,[e]}$		
<p>Paraxanthin 69</p>	$K_i = 4,5 \mu\text{M}^{173,[a]}$ $K_i = 30.000 \text{ nM}^{175,[c]}$ $K_i = 21.000 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$	A_{2A} $K_i = 19.400 \pm 3.500 \text{ nM}^{175,[c]}$ $K_i = 32.000 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$ A_{2B} $K_i = 4.500 \text{ nM}$ $(h)^{145,[d]}$	$15,5 \pm 12,1$ $\%^{175,[c]}$ $K_i > 100.000 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$	$(10,8 \pm 1,3) \mu\text{M}$
<p>Theobromin 70</p>	$K_i = 130 \mu\text{M}^{173,[a]}$ $K_i = 83.400 \text{ nM}^{175,[c]}$ $K_i = 105.000 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$	A_{2A} $K_i = 187.000 \text{ nM}^{175,[c]}$ $K_i > 250.000 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$ A_{2B} $K_i = 130.000 \text{ nM}$ $(h)^{145,[d]}$	$19,9 \pm 7,1 \%^{175,[c]}$ $K_i > 100.000 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$	inaktiv ($100 \mu\text{M}$)
<p>Koffein 55</p>	$K_i = 13 \pm 2 \mu\text{M}^{173,[a]}$ $K_i = 10.700 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 44.900 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 41.000 \text{ nM}$ $(r)^{169,[e]}$ $K_i = 44.000 \text{ nM}$ $(r)^{169,[e]}$ $K_i = 47.000 \text{ nM}$ $(gp)^{169,[e]}$ $K_i = 44.000 \text{ nM}$ $(c)^{169,[e]}$	A_{2A} $K_i = 23.400 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 9.560 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 45.000 \text{ nM}$ $(r)^{169,[e]}$ $K_i = 32.500 \text{ nM}$ $(r)^{169,[e]}$ $K_i = 48.000 \text{ nM}$ $(r)^{169,[e]}$ A_{2B} $K_i = 33.800 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 10.400 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 20.500 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 30.000 \text{ nM}$ $(r)^{169,[e]}$ $K_i = 13.000 \text{ nM}$ $(m)^{169,[e]}$	$K_i = 13.300 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i > 100.000 \text{ nM}$ $(r)^{169,[e]}$	$(9,4 \pm 1,4) \mu\text{M}$
<p>Harnsäure 88</p>	inaktiv ^{176,[f]}	-	-	inaktiv ($100 \mu\text{M}$)
<p>1-Methylharnsäure 89</p>	-	-	-	$(25 \pm 3) \mu\text{M}$
<p>1,7-Dimethylharnsäure 90</p>	$K_i = 140 \mu\text{M}^{173,[a]}$	-	-	$(44 \pm 4) \mu\text{M}$

Ergebnisse und Diskussion

1,3,7-Trimethylharnsäure 91	$K_i = 60 \mu\text{M}^{173,[a]}$	-	-	$(24 \pm 3) \mu\text{M}$
8-Chlortheophyllin 95	$K_i = 300 \mu\text{M}^{173,[a]}$ $30,2 \pm 6,7 \%^{175,[c]}$	A_{2A} $24,7 \pm 3,9 \%^{175,[c]}$	$16,8 \pm 9,5 \%^{175,[c]}$	$(17 \pm 3) \mu\text{M}$
8-Bromtheophyllin 96	$K_i = 130 \mu\text{M}^{173,[a]}$	-	-	$(6 \pm 3) \mu\text{M}$
8-Phenyltheophyllin 97	$IC_{50} = 0,40 \pm 0,15 \mu\text{M}^{177,[g]}$ $K_i = 86,0 \pm 2,8 \text{ nM}^{178,[h]}$ $K_i = 1,2 \text{ nM}^{170,[i]}$ $K_i = 86 \text{ nM}^{175,[c]}$	$IC_{50} = 0,55 \pm 0,04 \mu\text{M}^{177,[g]}$ $K_i = 848 \pm 115 \text{ nM}^{178,[h]}$ A_{2A} $K_i = 850 \text{ nM}^{175,[c]}$	$12,0 \pm 6,0 \%^{175,[c]}$	$(0,5 \pm 0,3) \mu\text{M}$
100a	$IC_{50} = 6,50 \text{ nM}^{179,[j]}$ $K_i = 3,6 \text{ nM}^{170,[i]}$	-	-	$(0,65 \pm 0,11) \mu\text{M}$
100b	$IC_{50} = 13 \text{ nM}^{179,[j]}$ $K_i = 5,4 \text{ nM}^{170,[i]}$	-	-	$(0,51 \pm 0,18) \mu\text{M}$
100c	$K_i = 0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}^{173,[a]}$ $IC_{50} = 0,80 \text{ nM}^{179,[j]}$ $K_i = 0,51 \text{ nM}^{170,[i]}$	-	-	$(7 \pm 4) \mu\text{M}$
100d	-	-	-	$(1,8 \pm 0,6) \mu\text{M}$
100e	-	-	-	inaktiv ($30 \mu\text{M}$)
100f	$IC_{50} = 3,50 \text{ nM}^{179,[j]}$	-	-	$(7 \pm 4) \mu\text{M}$
100g	$IC_{50} = 350 \text{ nM}^{179,[j]}$ $K_i = 190 \text{ nM}^{170,[i]}$	-	-	inaktiv ($30 \mu\text{M}$)
100h	$IC_{50} = 20 \text{ nM}^{179,[j]}$ $K_i = 8,7 \text{ nM}^{170,[i]}$	-	-	$(0,29 \pm 0,09) \mu\text{M}$
100i	$K_i = 0,12 \pm 0,03 \mu\text{M}^{173,[a]}$ $IC_{50} = 1,5 \text{ nM}^{179,[j]}$ $K_i = 0,63 \text{ nM}^{170,[i]}$	-	-	$(4,1 \pm 1,4) \mu\text{M}$
100j	$K_i = 350 \pm 20 \text{ nM}^{178,[h]}$	$K_i = 2.780 \pm 50 \text{ nM}^{178,[h]}$	-	$(0,22 \pm 0,01) \mu\text{M}$
100k	$K_i = 72,4 \pm 3,7 \text{ nM}^{178,[h]}$	$K_i = 984 \pm 70 \text{ nM}^{178,[h]}$	-	$(0,158 \pm 0,018) \mu\text{M}$
104a	inaktiv bis $21 \mu\text{M}^{170,[i]}$	-	-	$(0,5 \pm 0,3) \mu\text{M}$
104b	inaktiv bis $21 \mu\text{M}^{170,[i]}$	-	-	$(0,23 \pm 0,08) \mu\text{M}$
104c	$K_i = 0,068 \pm 0,021 \mu\text{M}^{173,[a]}$ $IC_{50} = 0,80 \text{ nM}^{179,[j]}$ $K_i = 0,64 \text{ nM}^{170,[i]}$	-	-	$(0,34 \pm 0,07) \mu\text{M}$

Istradefyllin 116	$K_i = 841 \text{ nM}^{169,[e]}$ $K_i = 230 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$	A_{2A} $K_i = 12 \text{ nM}$ $(h)^{169,[e]}$ $K_i = 91,2 \text{ nM}$ $(h)^{145,[d]}$ $K_i = 2,2 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$ $K_i = 4,46 \text{ nM}$ $(r)^{145,[d]}$ A_{2B} $K_i > 10.000$ $\text{nM}^{169,[e]}$	$K_i = 4.470$ $\text{nM}^{169,[e]}$	$(0,04 \pm 0,01) \mu\text{M}$
104d	$K_i = 5.340 \pm$ $1.440 \text{ nM}^{180,[k]}$	$K_i = 1.100 \pm 250$ $\text{nM}^{180,[k]}$	-	$(0,19 \pm 0,06) \mu\text{M}$
104e	-	-	-	$(1,2 \pm 0,3) \mu\text{M}$
115	-	-	-	$(0,039 \pm 0,017)$ μM
104f	-	-	-	$(0,0090 \pm$ $0,0018) \mu\text{M}$

Der potentielle PDE-vermittelte Einfluss bleibt allerdings ungeklärt. Die Untersuchung der TLX-Zielgenexpression auf mRNA-Ebene nach Behandlung mit den Xanthinderivaten deutete zumindest für das potenteste Derivat **115** signifikant veränderte Expressionslevel der TLX-Zielgene p21, SIRT1 und SLC1a1 im Vergleich zum Referenzmodulator ccrp2 (**2**) an. Experimente an rekombinantem TLX-LBD-Protein (ITC und $^1\text{H-NMR}$) bestätigten eine direkte Interaktion der Xanthine mit der TLX-LBD. Mit Hilfe der Gal4-TLX-Mutanten konnten im Vergleich zur Wildtyp-Gal4-TLX-Form negative Verschiebungen der Dosis-Wirkungskurven beobachtet werden, die zur Interpretation einer Bindungsregionlokalisierung des XanthinGrundgerüsts in einer potentiellen, klassischen, orthosterischen Bindungstasche anregen. Zellfreie HTRF-Experimente an rekombinantem TLX-LBD-Protein unter Verwendung der Xanthinliganden zeigten eine direkte Modulation von rekombinanter TLX-LBD durch verstärkende TLX-RXR α -Heterodimerisierung und TLX-Homodimerisierung im Vergleich zu den unbehandelten Proben.

4.6 Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Propranolol

Im Gegensatz zu den bisher behandelten inversen Agonisten der Xanthine stellte Fragment 01E04 (**30**) und der damit verwandte unselektive β -Adrenorezeptorblocker Propranolol (**54**) Gegenstücke dar. Beide Verbindungen verstärkten in einer konzentrationsabhängigen Art und

Ergebnisse und Diskussion

Weise die transrepressive Wirkung von Gal4-TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (siehe Abbildung 47 A, B).

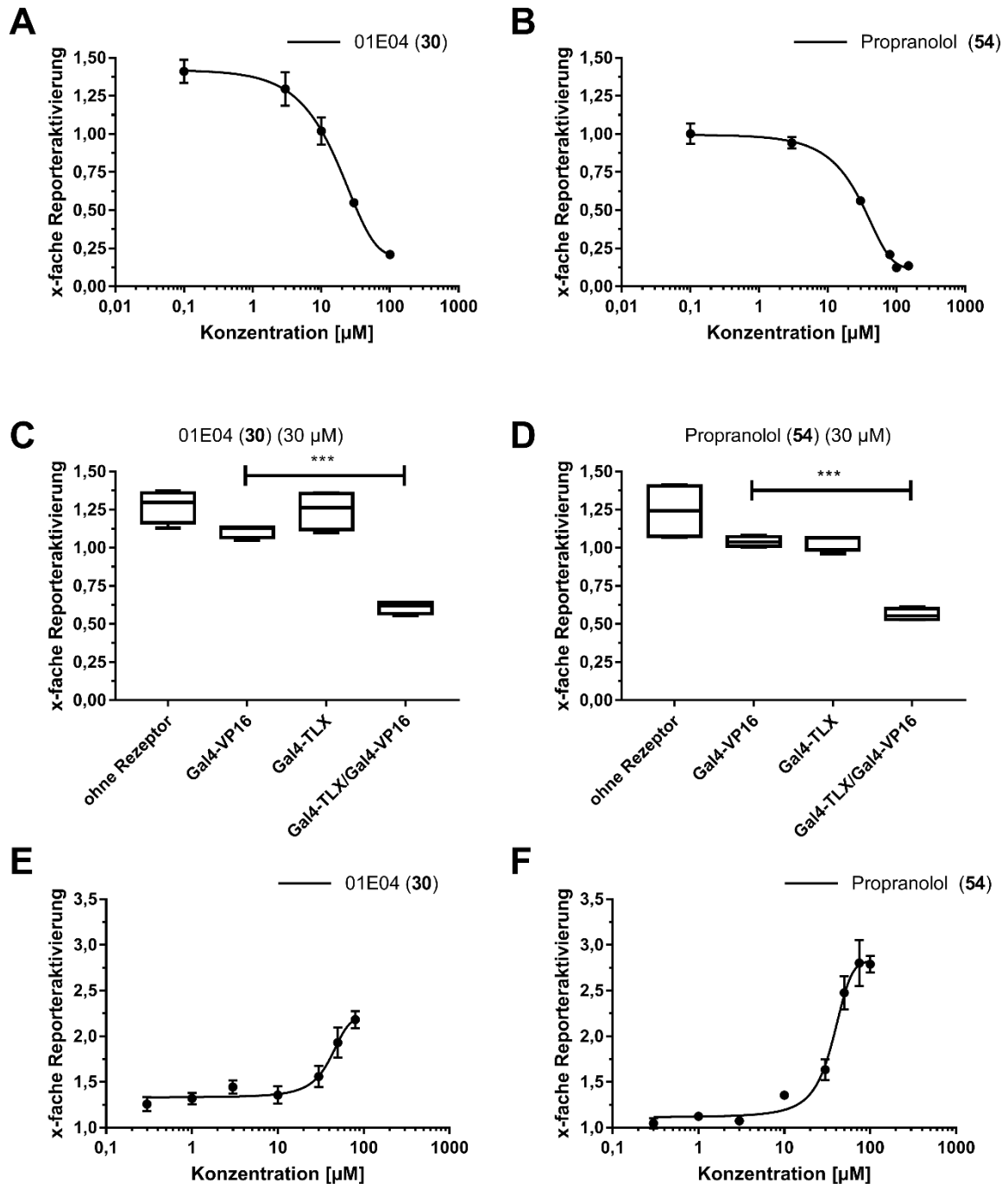


Abbildung 47: Aktivitäten der TLX-Agonisten 01E04 (**30**) und Propranolol (**54**) an TLX. Dosis-Wirkungskurven von **30** (**A**) und **54** (**B**) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Ergebnisse für (**A**) und (**B**) sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt. (**C**) und (**D**) Boxplots stellen die minimale bzw. maximale x-fache Reporteraktivierung von **30** (**C**) und **54** (**D**) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle in mit pFR-Luc und pRL-SV40 transfizierten HEK293T-Zellen, die keinen Hybridrezeptor, nur Gal4-VP16, nur Gal4-TLX oder Gal4-

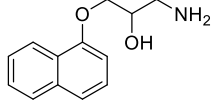
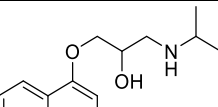
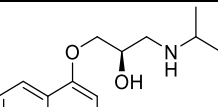
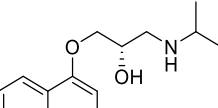
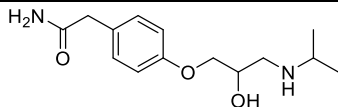
Ergebnisse und Diskussion

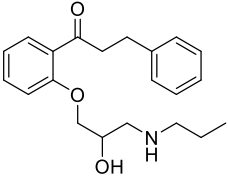
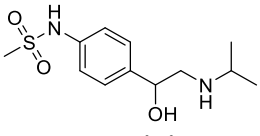
TLX/Gal4-VP16 überexprimierten dar. Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's* t-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung in Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.). (E) und (F) Dosis-Wirkungskurven im TLXfull/TAE-Reporterassay von **30** (E) und **54** (F). Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Für beide Derivate konnte ebenfalls ein unspezifischer Effekt durch Kontrolleexperimente in HEK293T-Zellen, die keinen Gal4-Hybridrezeptor, nur Gal4-TLX oder nur Gal4-VP16 exprimierten, bei einer Konzentration von 30 μM ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 47 C und D). Im orthogonalen TLXfull/TAE-Reporterassay, welcher die Aktivitätsmodulation von TLX aufgrund der Überexpression des TLX-Volllängenproteins in unter weniger artifiziellen Bedingungen erlaubte, zeigten sowohl 01E04 (**30**) als auch Propranolol (**54**) eine Dosis-Wirkungskurve mit zunehmender Reporteraktivierung (siehe Abbildung 47 E und F). Fragment **30** wies einen $EC_{50} = (19,4 \pm 0,9) \mu\text{M}$ (minimale x-fache Reporteraktivierung = $0,07 \pm 0,03$) im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und einen $EC_{50} = (43 \pm 9) \mu\text{M}$ (maximale x-fache Reporteraktivierung = $2,3 \pm 0,3$) im TLXfull/TAE-Reporterassay auf. Propranolol (**54**) hatte einen $EC_{50} = (32 \pm 4) \mu\text{M}$ (minimale x-fache Reporteraktivierung = $0,08 \pm 0,08$) im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und einen $EC_{50} = (37 \pm 4) \mu\text{M}$ (maximale x-fache Reporteraktivierung = $2,85 \pm 0,13$) im TLXfull/TAE-Reporterassay (siehe Tabelle 13). Anhand dieser Daten konnte die Rolle eines TLX-Agonisten aus der hypothetischen, angenommenen Modellvorstellung (Kapitel 4.1.8) erstmals bestätigt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 13: Übersicht der Aktivität an TLX ausgewählter Arzneistoffe **54**, **R-54**, **S-54** und **118-120** basierend auf Fragment **30**. Alle aktiven Derivate (**30**, **54**, **R-54**, **S-54** und **119**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines *Student's* t-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < \text{x-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Verbindungen mit einer x-fachen Reporteraktivierung $\leq 1,5$ auf TLXfull/TAE bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt, n.a. = nicht analysiert.

Struktur	EC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μM] und max./min. x-fache Reporteraktivierung	EC ₅₀ im TLXfull/TAE-Reporterassay [μM] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
 <p>01E04 30</p>	(19,4 \pm 0,9) μM 0,07 \pm 0,03	(43 \pm 9) μM 2,3 \pm 0,3
 <p>Propranolol 54</p>	(32 \pm 4) μM 0,08 \pm 0,08	(37 \pm 4) μM 2,85 \pm 0,13
 <p>R-Propranolol R-54</p>	(40 \pm 6) μM 0,40 \pm 0,09	n.a.
 <p>S-Propranolol S-54</p>	(72 \pm 9) μM 0,25 \pm 0,10	n.a.
 <p>Atenolol 118</p>	inaktiv (30 μM)	inaktiv (30 μM)

 <p>Propafenon 119</p>	<p>$(47 \pm 10) \mu\text{M}$ $0,15 \pm 0,14$</p>	<p>n.a.</p>
 <p>Sotalol 120</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>	<p>inaktiv (30 μM)</p>

Im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay konnten für Fragment **30** und für Propranolol (**54**) bis zu einer Konzentration von 500 μM keine signifikanten Effekte auf die RXR α -TLX-Heterodimer-vermittelte Reporteraktivierung detektiert werden (siehe Abbildung 48). Zwar konnte in einem Konzentrationsbereich von 100-500 μM eine Erhöhung der x-fachen Reporteraktivierung festgestellt werden, allerdings war diese auf sinkende Renilla-Luciferase-Werte zurückzuführen (100 und 300 μM) und bei 500 μM waren sowohl verminderte Firefly-Luciferase- als auch verminderte Renilla-Luciferase-Werte zu verzeichnen. Dieses orthogonale Experiment legte nahe, dass die ligandenabhängige TLX-Modulation durch **30** und Propranolol (**54**) vermutlich keine Auswirkung auf das RXR α -TLX-Heterodimergleichgewicht hat.

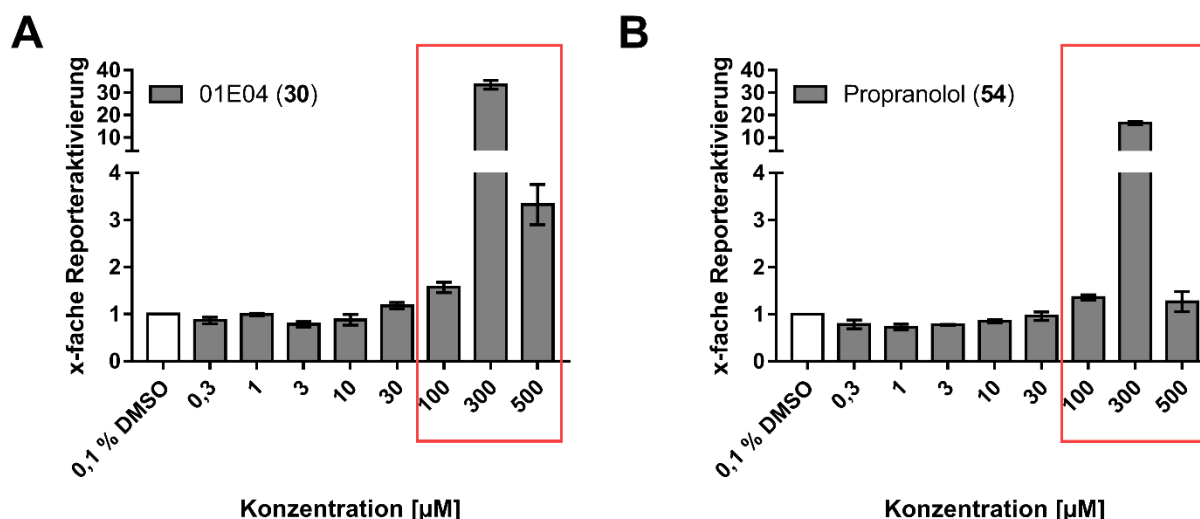


Abbildung 48: Untersuchung von 01E04 (**30**) und Propranolol (**54**) auf RXR α -TLX-Heterodimerisierungseffekte auf zellulärer Ebene. Verdünnungsreihen im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay von **30** (**A**) und **54** (**B**). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt.

Um ein potentielles Eutomer von Propranolol (**54**) zu identifizieren, wurden die reinen Enantiomere *R*-Propranolol (**R-54**) und *S*-Propranolol (**S-54**) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay charakterisiert. Dabei konnte für *R*-Propranolol (**R-54**) ein $EC_{50} = (40 \pm 6) \mu\text{M}$ (minimale Reporteraktivierung = $0,40 \pm 0,09$) und *S*-Propranolol (**S-54**) ein $EC_{50} = (72 \pm 9) \mu\text{M}$ (minimale Reporteraktivierung = $0,25 \pm 0,10$) verzeichnet werden. Diese Ergebnisse deuteten an, dass Propranolol hinsichtlich seiner Aktivität an TLX kein Eutomer besitzt (siehe Tabelle 13).

Die Charakterisierung weiterer strukturähnlicher Vertreter aus der Arzneistoffklasse der β -Adrenorezeptorblocker (**118-120**) lieferte Propafenon (**119**) als weiteren schwächeren TLX-Agonisten mit einem $EC_{50} = (47 \pm 10) \mu\text{M}$ (minimale x-fache Reporteraktivierung = $0,15 \pm 0,14$) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay, welches aber nicht weiter im TLXfull/TAE-Reporterassay untersucht wurde. Interessanter war die Charakterisierung von Atenolol (**118**) und Sotalol (**120**), die keine vergleichbare Aktivität im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay wie O1E04 (**30**) und Propranolol (**54**) zeigten und somit vor allem Atenolol (**118**) aufgrund der größeren Strukturähnlichkeit zu Propranolol (**54**) eine wertvolle Negativkontrolle für anschließende Experimente darstellte (siehe Abbildung 49).

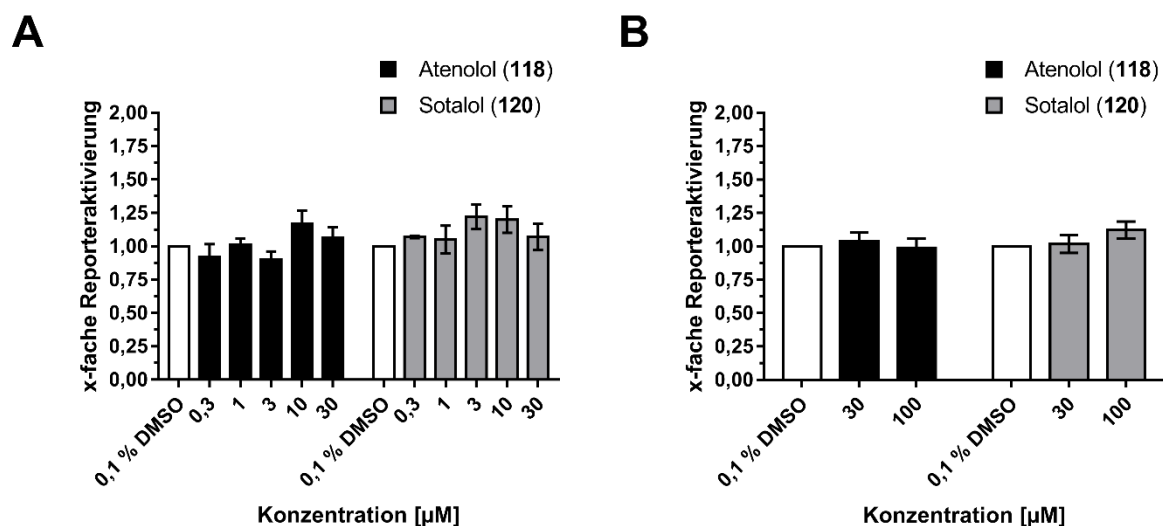


Abbildung 49: Verdünnungsreihen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay von Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) (A) und im TLXfull/TAE-Reporterassay von **118**, **120** (B). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt.

Darüber hinaus wurde das Selektivitätsprofil von Propranolol (**54**) bezüglich potentieller Aktivitäten an anderen NRs im Gal4-Hybridreporterassay untersucht. Bei einer

Konzentration von 75 μM , die an TLX bereits einen Effekt im Bereich der maximalen Aktivierung erzielte, konnten keine signifikanten Effekte auf elf weiteren NRs (CAR, FXR, LXR α/β , PPAR $\alpha/\gamma/\delta$, RAR α , RXR α , THR α , VDR) detektiert werden (siehe Abbildung 50).

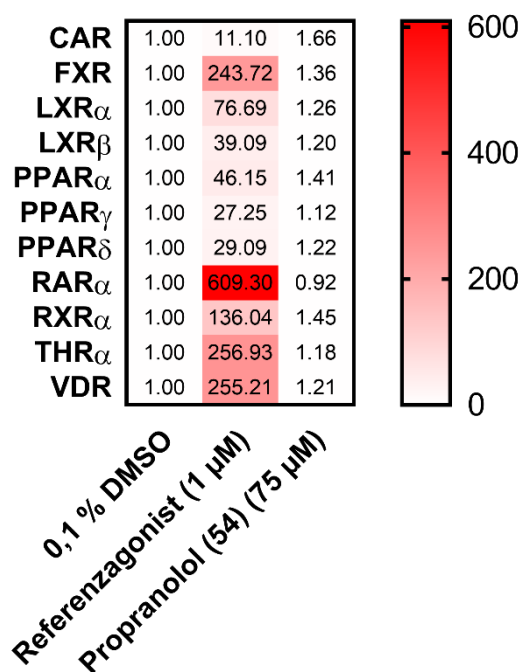


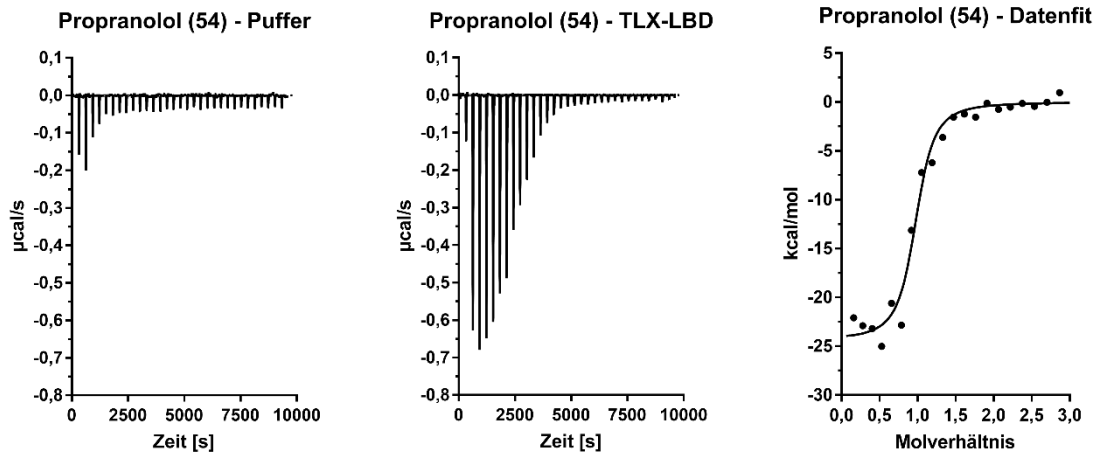
Abbildung 50: Selektivitätsprofil von Propranolol (**54**) (75 μM) im Vergleich zu einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle. Als Positivkontrolle wurden Gal4-NRs mit entsprechenden Referenzagonisten (1 μM) aktiviert (CAR: CITCO, FXR: GW4064, LXR α/β : T0901317, PPAR α : GW7647, PPAR γ : Pioglitazon, PPAR δ : L165041, RAR α : Tretinoin, RXR α : Bexaroten, THR α : T3, VDR: Calcitriol). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt.

Mit Hilfe von ITC-Experimenten konnte eine direkte Interaktion zwischen Propranolol (**54**) und der rekombinant exprimierten TLX-LBD festgestellt werden. Hierbei wurde das TLX-LBD-Protein (1 % DMSO) in der Zelle (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) mit Propranolol (**54**) (1 % DMSO) - im selben Puffer verdünnt - bei einer Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ titriert. Um sonstige unspezifische Wärmeeffekte (Verdünnungswärme etc.) auszuschließen, wurden auch die entsprechenden Kontrolltitrationen (Kontrollexperiment A: Puffer (1 % DMSO) gegen Propranolol (**54**) (1 % DMSO), Kontrollexperiment B: TLX-LBD-Protein (1 % DMSO) gegen Puffer (1 % DMSO)) mit den identischen Bedingungen wie im vorherigen Experiment durchgeführt. In allen drei Titrationsexperimenten konnte eine exotherme Reaktion beobachtet werden (siehe Abbildung 51). Allerdings war die beobachtete Wärmerate im Ligand-Protein Experiment (siehe Abbildung 51 A) erheblich größer, sodass

Ergebnisse und Diskussion

nach Subtraktion des entsprechenden Ligand-Puffer-Experiments (siehe Abbildung 51 A) immer noch eine hohe exotherme Wärmerate detektierbar war. Die Puffer-Protein Titration zeigte ebenfalls nur sehr schwache exotherme Wärmeraten (siehe Abbildung 51 B).

A



B

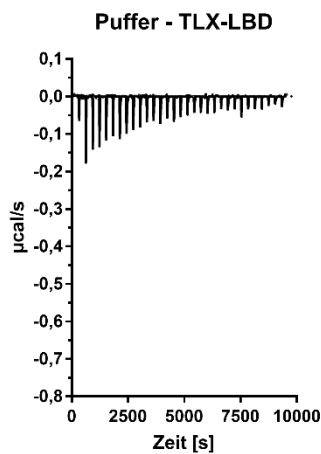


Abbildung 51: ITC-Experimente von rekombinantem TLX-LBD-Protein (40 μM) mit Propranolol (**54**) (200 μM). **(A)** Titrationsexperiment von Propranolol (**54**) in Puffer, Propranolol (**54**) in TLX-LBD-Protein und entsprechender Datenfit der korrigierten Wärmeraten. **(B)** Titrationsexperiment von Puffer in TLX-LBD-Protein.

Der Vergleich der freigesetzten Wärmeraten zwischen den verschiedenen Titrationsexperimenten bestätigte somit eine Bindung von Propranolol (**54**) an das rekombinante TLX-LBD-Protein mit einem $K_d = 0,5 \mu\text{M}$ (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Erhaltene thermodynamische Parameter von Propranolol (**54**) nach dem Fit der ITC-Daten. K_d = Dissoziationskonstante [μM], n = stöchiometrischer Koeffizient, ΔH = Enthalpieänderung [kcal/mol], $T\Delta S$ = Temperatur [K] mal Entropieänderung [kcal/mol·K].

Parameter	Propranolol (54)
K_d [μM]	0,5
n	0,93
ΔH [kcal/mol]	-24
$T\Delta S$ [kcal/mol]	-16

Da somit in drei orthogonalen Systemen (Gal4-TLX/Gal4-VP16-, TLXfull/TAE-Reporterassay und ITC) eine TLX-Modulation durch Propranolol (**54**) belegt war, wurde anschließend der Effekt von Propranolol (**54**) auf die TLX-Zielgenexpression mit Hilfe von qPCR-Experimenten untersucht. Hierbei wurde das Expressionslevel von PTEN, TET3, SIRT1, SLC1a1 und TUSC1 nach achtstündiger Inkubation von T98G-Glioblastomzellen mit Propranolol (**54**, 50 μM), Atenolol (**118**, 50 μM) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle analysiert. Die erste wichtige Erkenntnis war, dass Propranolol (**54**) keinen Einfluss auf die Expression von TLX hatte, wohingegen Atenolol (**118**) schwache, aber signifikante Effekte zeigte (siehe Abbildung 52 D). Daher war für Propranolol (**54**) anzunehmen, dass potentielle Effekte auf eine direkte TLX-Modulation und nicht auf eine Veränderung der TLX-Expression zurückzuführen sind. Propranolol (**54**) bewirkte eine fünffache Erhöhung der SIRT1 Genexpression, Atenolol (**118**) zeigte keinen signifikanten Effekt (siehe Abbildung 52 A). Darüber hinaus konnte für Propranolol (**54**) eine starke Verringerung der PTEN und TET3 Genexpression verzeichnet werden, während Atenolol (**118**) wiederum keine signifikante Veränderung der PTEN und TET3 Expression induzierte (siehe Abbildung 52 B und C). Diese Observationen bestätigten die Rolle von Atenolol (**118**) an TLX als Negativkontrolle und hoben die TLX-modulatorische Wirkung von Propranolol (**54**) hervor. Die SLC1a1 Genexpression blieb unter Verwendung der untersuchten Substanzen weitgehend unbeeinflusst, wohingegen die TUSC1 Genexpression nur durch Atenolol (**118**) eine leichte, signifikante Geninduktion zeigte (siehe Abbildung 52 E und F). TUSC1 schien zusätzlich über einen TLX-unspezifischen Signalweg regulierbar zu sein, der durch Atenolol (**118**) und nicht durch Propranolol (**54**) adressiert wurde.

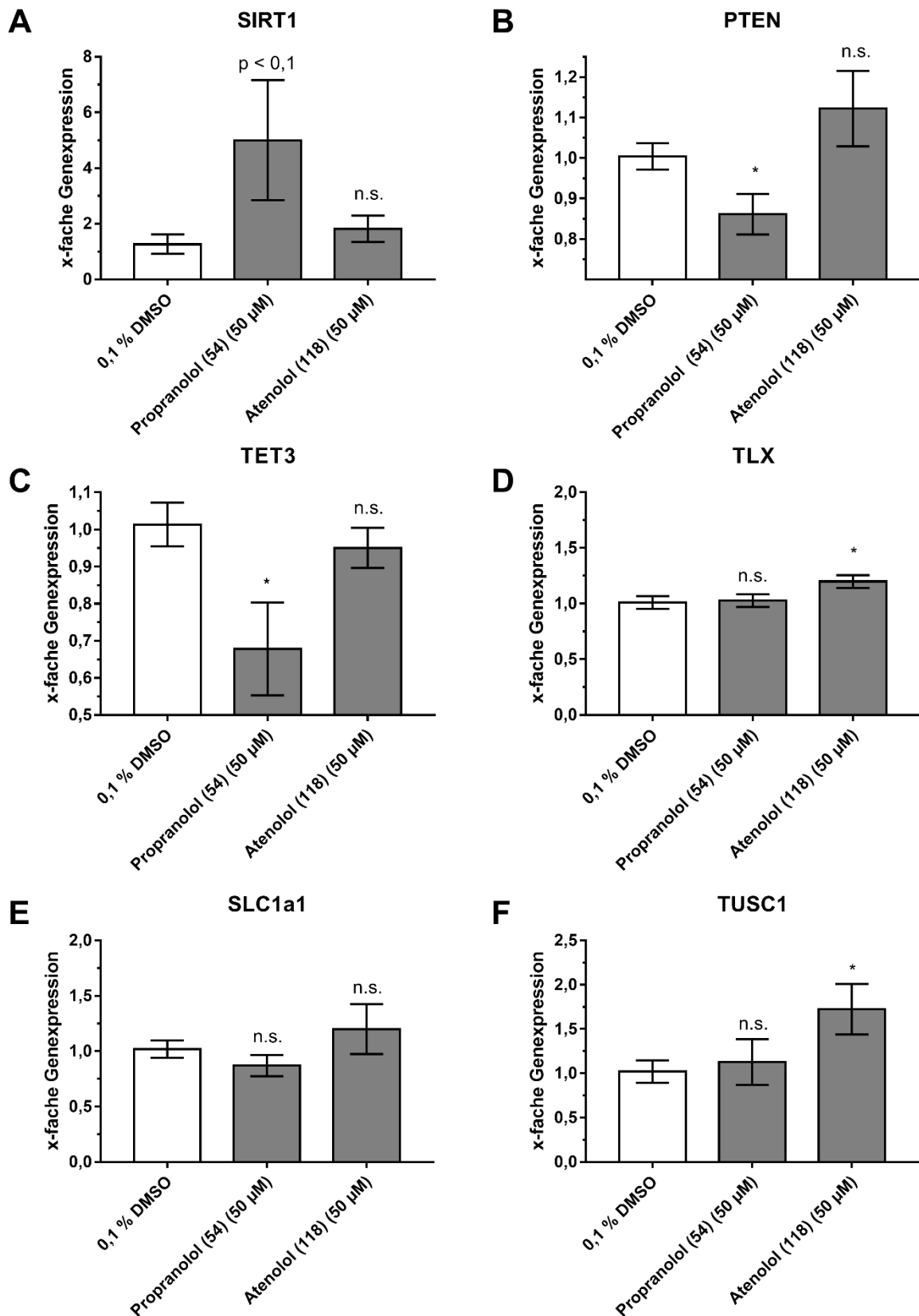


Abbildung 52: Relative Quantifizierung der x-fachen Genexpression der TLX-Zielgene SIRT1 (A), PTEN (B), TET3 (C), SLC1a1 (E) und TUSC1 (F) nach Behandlung mit Propranolol (54) und Atenolol (118). Zusätzlich wurde auch die TLX-Genexpression untersucht (D). T98G-Zellen wurden für acht Stunden mit Propranolol (54) (50 µM), Atenolol (118) (50 µM) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle behandelt. Die relative Quantifizierung

Ergebnisse und Diskussion

erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter Verwendung von GAPDH (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) als Referenzgen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x -fache Genexpression einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Probe analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Da Propranolol (**54**) basierend auf Fragment **30** als TLX-Agonist hervorging, wurde in Kooperation mit Lea Rachor im Rahmen einer Bachelorarbeit eine systematische SAR-Untersuchung der Aminoalkoholseitenkette von Propranolol (**54**) durchgeführt. Zusätzlich sollte das Naphthalen durch ein Chinolin ersetzt werden, da mehrere schwach aktive Fragmente aus dem Wirkstofffragmentscreening stickstoffhaltige, polyzyklische, anellierte Heterozyklen (**27**, **29**, **31**, **32**, **34**, **35**, **39**, **47** und **48**) als gemeinsames Muster enthielten (siehe Abbildung 53).

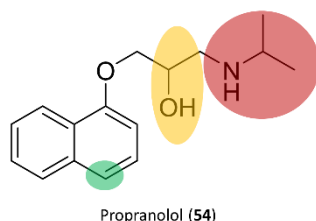


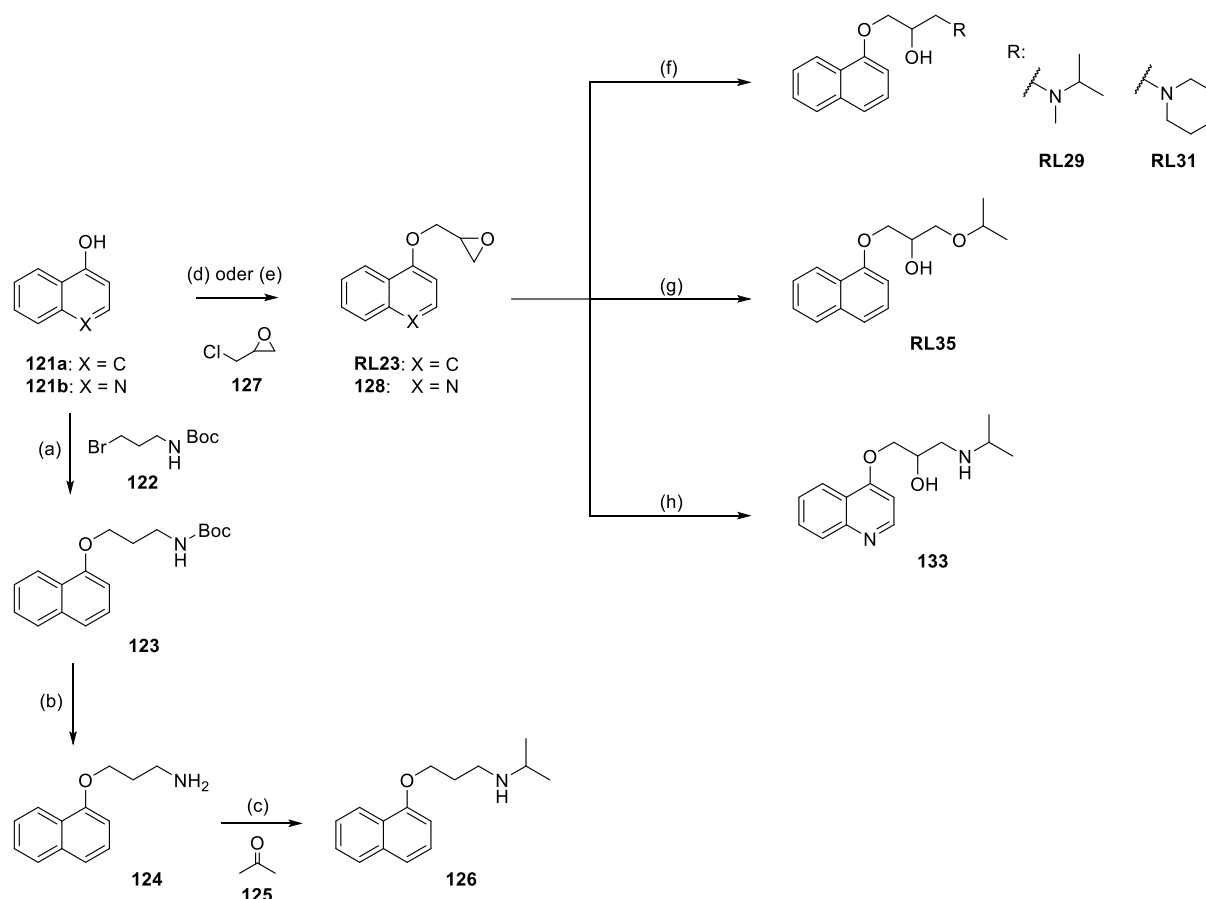
Abbildung 53: Struktur motive (grün, gelb und rot) von Propranolol (**54**), die zum Teil durch eine systematische SAR-Untersuchung (Bachelorarbeit: Lea Rachor) analysiert wurden.

Da die vorherigen Untersuchungen kein Eutomer von Propranolol identifiziert hatten, wurden keine stereoselektiven Synthesen durchgeführt. Dementsprechend wurden alle hergestellten Verbindungen als Racemate synthetisiert und charakterisiert. Alle synthetisierten Derivate mit den Initialen RL (Rachor Lea) wurden bereits in der Bachelorarbeit behandelt und werden hier nur zum Zweck einer vollständigen Diskussion aufgeführt.

Das Dehydroxy-Propranololderivat (**126**) wurde über drei Stufen hergestellt. Ausgehend von **121a** wurde über eine Williamson-Ether-Reaktion mit *tert*-Butyl-(3-brompropyl)carbammat (**122**) zunächst **123** synthetisiert. Nach saurer *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) Schutzgruppenabspaltung von **123** wurde **124** erhalten. Durch reduktive Aminierung von **124** mit Aceton (**125**) unter Verwendung von $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ anhand bekannter Protokolle wurde die Zielverbindung **126** erhalten (siehe Schema 5)^{181,182}.

Die Synthese der Derivate **RL29**, **RL31**, **RL35** und **133** erfolgte anhand einer literaturbekannten Route über zwei Stufen (siehe Schema 5)¹⁸³. Dabei wurde entweder 1-Naphthol (**121a**) oder

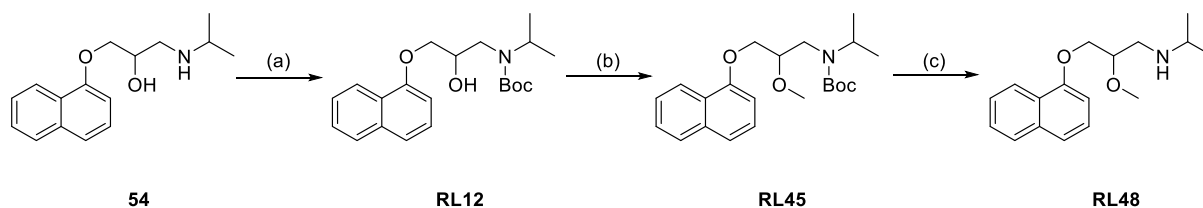
4-Hydroxychinolin (**121b**) mit Hilfe einer Williamson-Ether-Reaktion nach Deprotonierung der Hydroxygruppe mit *rac*-Epichlorhydrin (**127**) zu den entsprechenden Epoxiden **RL23** und **128** umgesetzt. Anschließend wurden die Epoxide **RL23** und **128** mit den Nukleophilen *N*-Methyl-*iso*-propylamin (**129**), Piperidin (**130**), *iso*-Propanol (**131**) oder *iso*-Propylamin (**132**) zu den entsprechenden Alkoholen (**RL29**, **RL31**, **RL35** und **133**) geöffnet.



Schema 5: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen **124**, **126**, **RL29**, **RL31**, **RL35** und **133**. Reagenzien und Bedingungen: (a) DMF, NaH, Raumtemperatur (RT), 24 Stunden, Ausbeute: 88 %. (b) CH₂Cl₂, HCl-Dioxan (4 M), RT, 21 Stunden, Ausbeute: 80 %. (c) 1,2-Dichloroethan, NEt₃, AcOH, NaBH(OAc)₃, RT, 17 Stunden, Ausbeute: 46 %. (d) DMF/H₂O, NaOH, RT, 120 Stunden, Ausbeute: 11 %. (e) Aceton, NaH, RT, 48 Stunden, Ausbeute: 27 %. (f) *N*-Methyl-*iso*-propylamin (**129**) oder Piperidin (**130**), Mikrowelle, 100 °C, 30–45 Minuten, Ausbeute: 29–89 %. (g) *iso*-Propanol (**131**), NaH, RT, 12 Stunden, Ausbeute: 90 %. (h) *iso*-Propylamin (**132**), 60 °C, 10 Stunden, HCl-Dioxan (4 M), RT, 72 Stunden, Ausbeute: 87 %.

Das Methoxy-Propranololderivat **RL48** wurde über eine dreistufige Syntheseroute hergestellt. Ausgehend von Propranolol (**54**) wurde das sekundäre Amin unter basischen Bedingungen mit einer Boc-Schutzgruppe versehen (**RL12**). Anschließend erfolgte die Methylierung des

sekundären Alkohols mit Dimethylsulfat zu **RL45**. Durch saure Boc-Schutzgruppenabspaltung konnte Zielverbindung **RL48** hergestellt werden (siehe Schema 6).

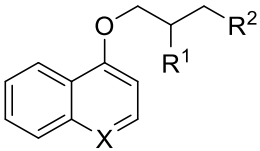









Schema 6: Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindung **RL48**. Reagenzien und Bedingungen: (a) H_2O , Boc_2O (**134**), NaHCO_3 , Raumtemperatur (RT), 18 Stunden, quantitative Ausbeute. (b) Dimethylsulfat (**135**), Mikrowelle, 60°C , 3 Stunden, Ausbeute: 14 %. (c) HCl-Dioxan (4M), RT, 12 Stunden, Ausbeute: 90 %.

Alle synthetisierten Derivate (**RL29**, **RL31**, **RL35**, **RL48**, **124**, **126** und **133**) wurden im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay charakterisiert (siehe Tabelle 15). Sowohl die Methylierung der terminalen Aminofunktion (**RL29**) als auch die Einführung eines sterisch anspruchsvollen Piperidinrests (**RL31**) führte zu einer bedeutenden Potenzverminderung (**RL29** $\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) bzw. zur vollständigen Inaktivität an Gal4-TLX (**RL31**). Die Substitution mit einem *iso*-Propylrest (**RL35**, $\text{EC}_{50} = (83 \pm 14) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,29 \pm 0,15$) führte ebenfalls zu einem signifikanten Potenzverlust. Diese Befunde deuteten auf die essentielle Rolle des sekundären Amins als potentieller Wasserstoffbrückendonator hin. Die Methylierung des sekundären Alkohols, um eine potentielle Wasserstoffbrückendonorfunktion auszuschalten, (**RL48**, $\text{EC}_{50} = (52 \pm 13) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,28 \pm 0,08$) zeigte nur geringfügige Potenzverluste. Die vollständige Entfernung der Hydroxygruppe aus Propranolol (**54**) zeigte eine ähnliche Tendenz (**126**, $\text{EC}_{50} = (50,4 \pm 1,7) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,42 \pm 0,04$) und auch beim Vergleich zwischen **30** ($\text{EC}_{50} = (19,4 \pm 0,9) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,07 \pm 0,03$) und dem entsprechenden Dehydroxy-Derivat **124** ($\text{EC}_{50} = (37 \pm 5) \mu\text{M}$, minimale Reporteraktivierung = $0,53 \pm 0,08$) wurden nur geringe Unterschiede in der Aktivität an Gal4-TLX festgestellt. Zusammengefasst wiesen diese Daten darauf hin, dass die Hydroxygruppe aus Propranolol (**54**) kein essentielles Strukturmerkmal wie die terminale NH-Funktion für die Aktivität an Gal4-TLX ist. Der Austausch des Naphthalen-Grundgerüsts mit einem Chinolin lieferte mit **133** ein inaktives Derivat, welches sowohl im Gal4-TLX/Gal4-VP16- als auch im TLXfull/TAE-Reporterassay keine vergleichbare Aktivität an TLX wie **30** und Propranolol (**54**) aufwies. Dieses Derivat ergänzte somit zu Atenolol (**118**) und Sotalol (**120**)

das Set als weitere Negativkontrolle mit hoher struktureller Verwandtschaft zu Propranolol (**54**).

Tabelle 15: Übersicht der Aktivität an TLX von 01E04 (**30**), Propranolol (**54**) und synthetisierter Propranololderivate **RL29**, **RL31**, **RL35**, **RL48**, **124**, **126** und **133**. Alle aktiven Derivate (**30**, **54**, **RL29**, **RL35**, **RL48**, **124** und **126**) wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines *Student's t*-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < x\text{-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Verbindungen mit einer x-fachen Reporteraktivierung $\leq 1,5$ auf TLXfull/TAE bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt, n.a. = nicht analysiert.

					
Substanz	X	R ¹	R ²	EC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung	EC ₅₀ im TLXfull/TAE-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
01E04 30	C	OH	NH ₂	(19,4 \pm 0,9) μ M 0,07 \pm 0,03	(43 \pm 9) μ M 2,3 \pm 0,3
Propranolol 54	C	OH		(32 \pm 4) μ M 0,08 \pm 0,08	(37 \pm 4) μ M 2,85 \pm 0,13
RL29	C	OH		EC ₅₀ > 100 μ M	n.a.
RL31	C	OH		inaktiv (100 μ M)	n.a.
RL35	C	OH		(83 \pm 14) μ M 0,29 \pm 0,15	n.a.
RL48	C	OMe		(52 \pm 13) μ M 0,28 \pm 0,08	n.a.
124	C	H	NH ₂	(37 \pm 5) μ M 0,53 \pm 0,08	n.a.
126	C	H		(50,4 \pm 1,7) μ M 0,42 \pm 0,04	n.a.
133	N	OH		inaktiv (100 μ M)	inaktiv (100 μ M)

Um potentielle TLX-vermittelte phänotypische Effekte zu studieren, wurden in Kooperation mit Dr. Iris Bischoff-Kont (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie) weitere Effekte auf die TLX-exprimierenden T98G-Zellen untersucht. Dabei wurden nach Behandlung von T98G-Zellen mit Propranolol (**54**) und den inaktiven Kontrollen Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) oder **133** in ersten Versuchsreihen zytotoxische Effekte untersucht. Hierbei wurden die Verbindungen in einem Konzentrationsbereich bis zu 100 μM in diversen Zellviabilitätsassays untersucht. Das erste System erlaubte die Bestimmung der Zellviabilität unter Verwendung des WST-1 Reagenz (engl. *water soluble tetrazolium*, WST-1). Bei diesem Reagenz handelt es sich um ein wasserlösliches Tetrazolsalz, welches durch Reduktion zellulärer Enzyme in dunkelrot gefärbtes Formazan überführt wird¹⁸⁴. In diesem Versuch geht eine höhere metabolische Aktivität der Zellen mit einer erhöhten Enzymaktivität einher, die mit der erhöhten Umwandlung von WST-1 zu Formazan korreliert und Rückschlüsse auf die Zellviabilität erlaubt. Die Quantifizierung kann dann durch Absorptionsbestimmung bei einer produktspezifischen Wellenlänge erfolgen. So konnten für Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) und **133** selbst nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen keine starken, zytotoxischen Effekte vermerkt werden (siehe Abbildung 54). Nur Propranolol (**54**) zeigte bei einer Konzentration von 100 μM eine leichte, verminderte Zellviabilität um ca. 22 % auf (siehe Abbildung 54 B).

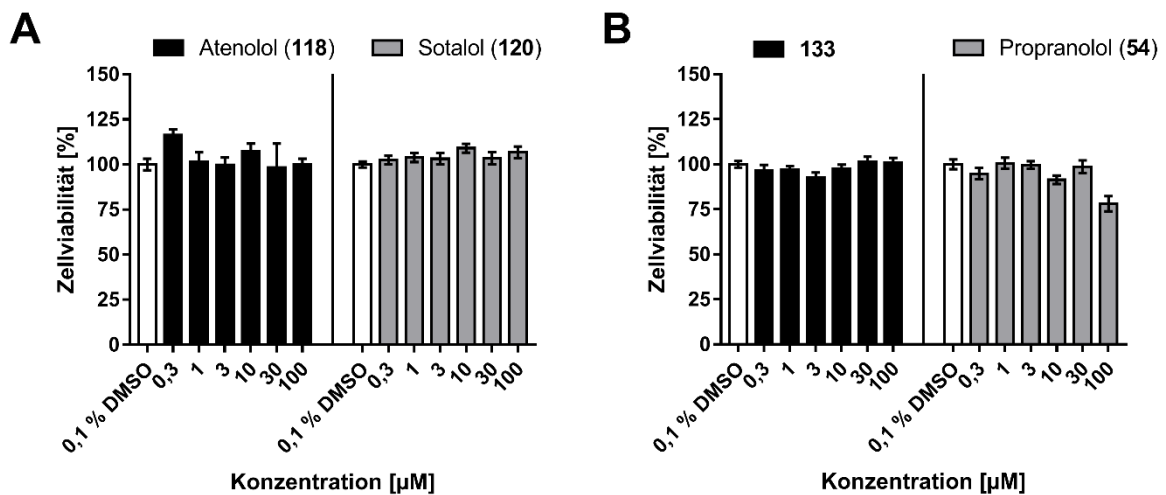


Abbildung 54: Untersuchung der Zellviabilität nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) (A) und **133**, Propranolol (**54**) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Ein weiterer Zellviabilitätsassay erlaubte die indirekte Quantifizierung der freigesetzten LDH Menge (engl. *lactate dehydrogenase*, LDH). LDH ist ein Enzym, das unter zytotoxischen

Bedingungen freigesetzt wird. Dieses katalysiert über eine gekoppelte, enzymatische Reaktion die Umsetzung eines Tetrazolsalzes in Formazan, welches ebenfalls durch Absorptionsmessungen bei einer geeigneten Wellenlänge erfasst werden kann. Somit kann die freigesetzte LDH-Menge mit den zytotoxischen Effekten korreliert werden¹⁸⁵. Hierbei konnten für Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) und **133** ebenfalls nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen keine zytotoxischen Effekte verzeichnet werden, während Propranolol (**54**) wiederum leichte, zytotoxische Effekte bei einer Konzentration von 100 μM bewirkte (siehe Abbildung 55).

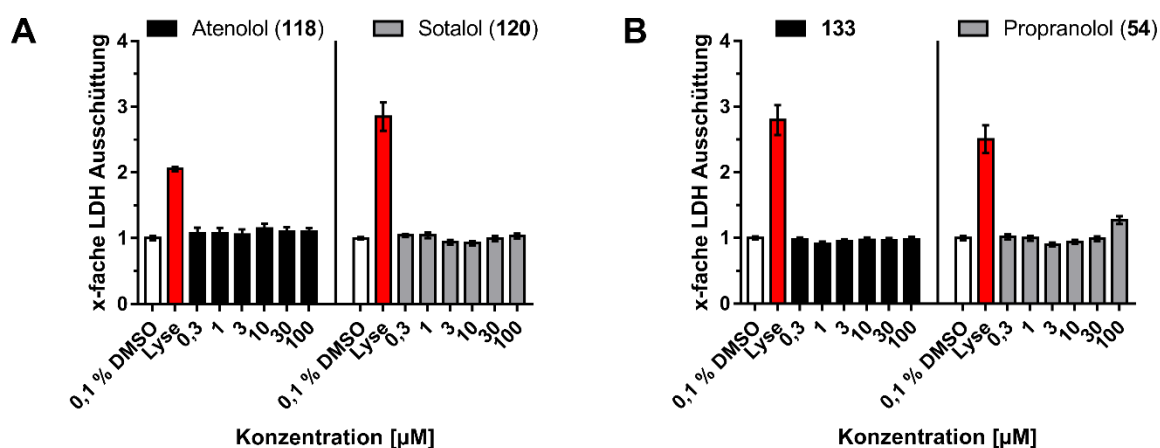


Abbildung 55: Untersuchung der Zellviabilität nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) (A) und **133**, Propranolol (**54**) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle. Als Positivkontrolle wurden T98G-Zellen 45 Minuten vor Inkubationsende mit einer Lyse-Lösung versetzt (roter Balken). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Um mögliche pro-apoptotische Effekte zu studieren, wurden T98G-Zellen nach 72 Stunden Behandlung mit Atenolol (**118**), Sotalol (**120**), **133** oder Propranolol (**54**) mit Propidiumiodid (PI) nach Nicoletti *et al.* angefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert¹⁸⁶. PI dient hierbei als DNA-Interkalator, welches nur bei toten Zellen durch die intakte Zellmembran diffundieren kann und somit die Differenzierung von toten und lebenden Zellen ermöglicht¹⁸⁷. Hierbei zeigte keine der analysierten Verbindungen bedeutende, pro-apoptotische Effekte im Vergleich zur Positivkontrolle Staurosporin (1 μM) (siehe Abbildung 56).

Ergebnisse und Diskussion

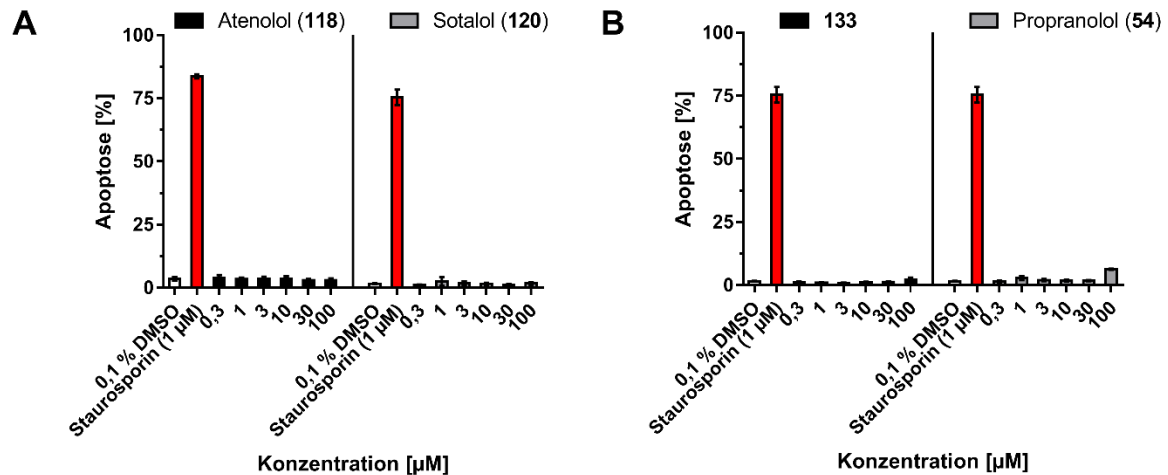


Abbildung 56: Untersuchung pro-apoptotischer Effekte unter Färbung von DNA toter Zellen mittels Propidiumiodid (PI) nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) (**A**) und **133**, Propranolol (**54**) (**B**) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle. Als Positivkontrolle wurden T98G-Zellen 24 Stunden vor Inkubationsende mit Staurosporin (1 µM) versetzt (roter Balken). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

Proliferationseffekte wurden nach 72-stündiger Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (**118**), Sotalol (**120**), **133** oder Propranolol (**54**) mit Hilfe von Kristallviolett färbung studiert. Diese Quantifizierungsmethode setzt voraus, dass abgestorbene Zellen ihre adhärenente Kapazität verlieren. Durch einen Waschschrift werden tote Zellen von intakten, lebenden Zellen entfernt. Nach anschließender Zellfixierung kann die Markierung von Proteinen und DNA unter Verwendung von Kristallviolett erfolgen und durch Extraktion der aufgenommenen Kristallviolettmenge somit die Zellzahl lebender Zellen anhand colorimetrischer Absorptionmessungen quantifiziert werden^{188,189}. Erneut zeigten Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) und **133** keine konzentrationsabhängigen Effekte, wohingegen Propranolol (**54**) bei 100 µM eine ausgeprägte anti-proliferative Wirkung aufwies (siehe Abbildung 57).

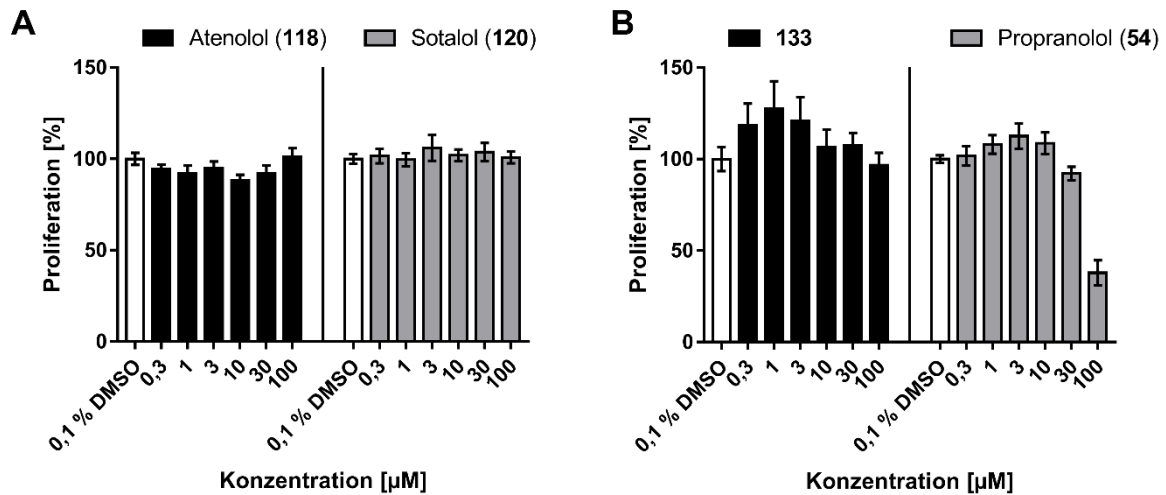


Abbildung 57: Untersuchung von Proliferationseffekten nach Entfernung toter Zellen unter Verwendung von Kristallviolett nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) (**A**) und **133**, Propranolol (**54**) (**B**) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

In einem letzten Experiment wurde die gerichtete Migration von T98G-Zellen in einer Boyden-Kammer nach 24 Stunden Inkubation mit den Testsubstanzen Atenolol (**118**), Sotalol (**120**), **133** und Propranolol (**54**) bei einer Konzentration von 75 μM studiert. Dieses Assaysetup beinhaltete drei Messungen. In der ersten Boyden Kammer wurden T98G-Zellen in FCS- (engl. *fetal calf serum*, FCS) freiem Medium im oberen Kompartiment ausgesät. Das untere Kompartiment wurde ebenfalls mit FCS-freiem Medium befüllt, sodass kein FCS-Gradient vorlag. Somit war auch keine starke Migration der Zellen durch die permeable Membran zu erwarten (siehe Abbildung 58 A). Erst durch das Vorlegen von FCS-haltigem Medium im unteren Kompartiment wurde ein FCS-Gradient geschaffen, der eine gerichtete Migration der Zellen ermöglichte (siehe Abbildung 58 B). Nun konnten die Zellen mit einer Testsubstanz bei der gewünschten Konzentration für 24 Stunden behandelt werden, um substanzabhängige, migratorische Effekte zu erfassen (siehe Abbildung 58 C).

Ergebnisse und Diskussion

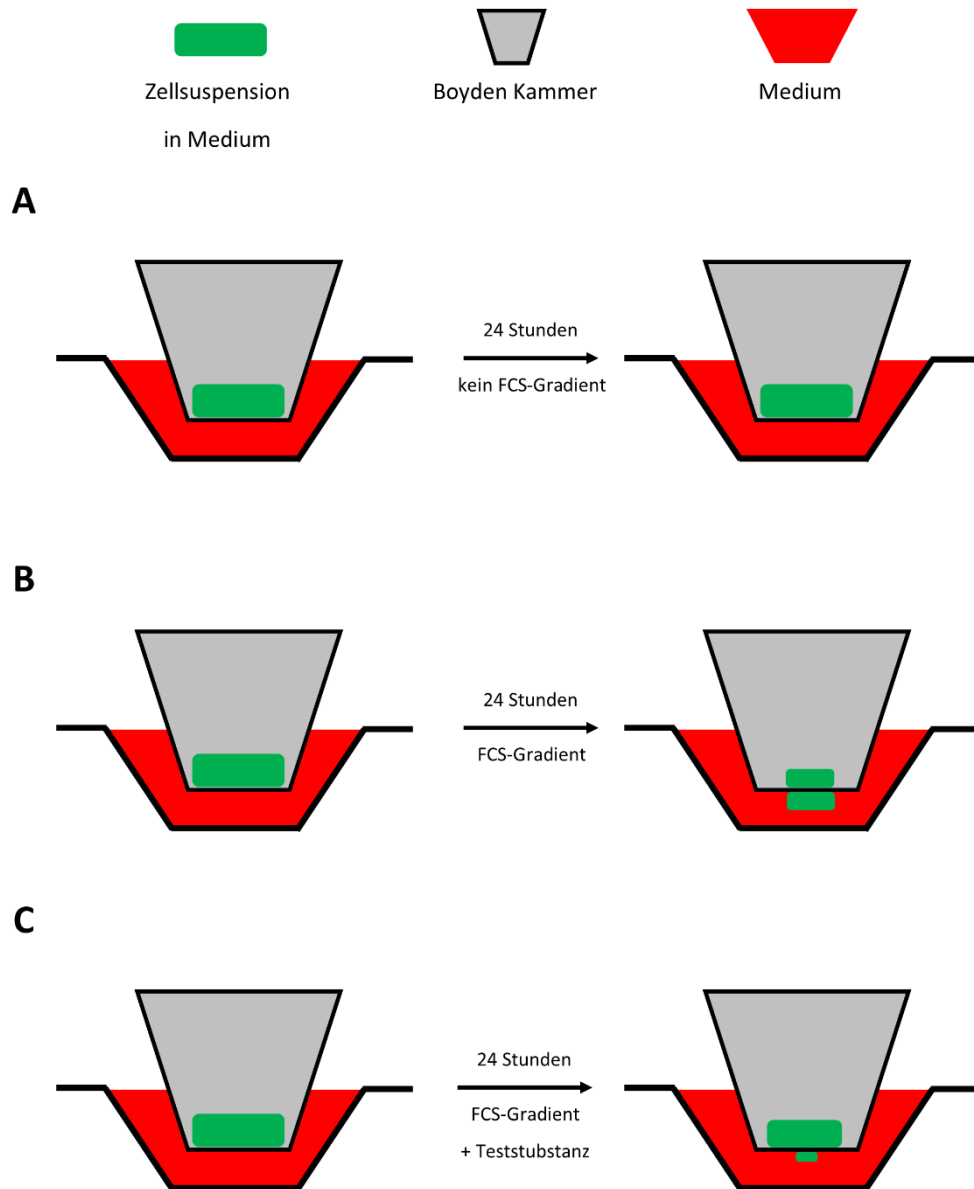


Abbildung 58: Prinzip der Migrationsuntersuchung anhand der Boydenkammer. **(A)** Ohne FCS-Gradient ist keine bzw. nur wenig Migration zu erwarten. **(B)** Mit FCS-Gradient ist eine Migration zu erwarten. **(C)** Der Zusatz einer Testsubstanz ermöglicht die substanzabhängige Untersuchung des Migrationseffekts.

In diesem Zellmigrationsassay konnten sowohl für Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) und **133** keine signifikanten Effekte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit FCS-Gradient erhalten werden (siehe Abbildung 59). Propranolol (**54**) hingegen verminderte die Migration deutlich auf < 50 % (siehe Abbildung 59 B).

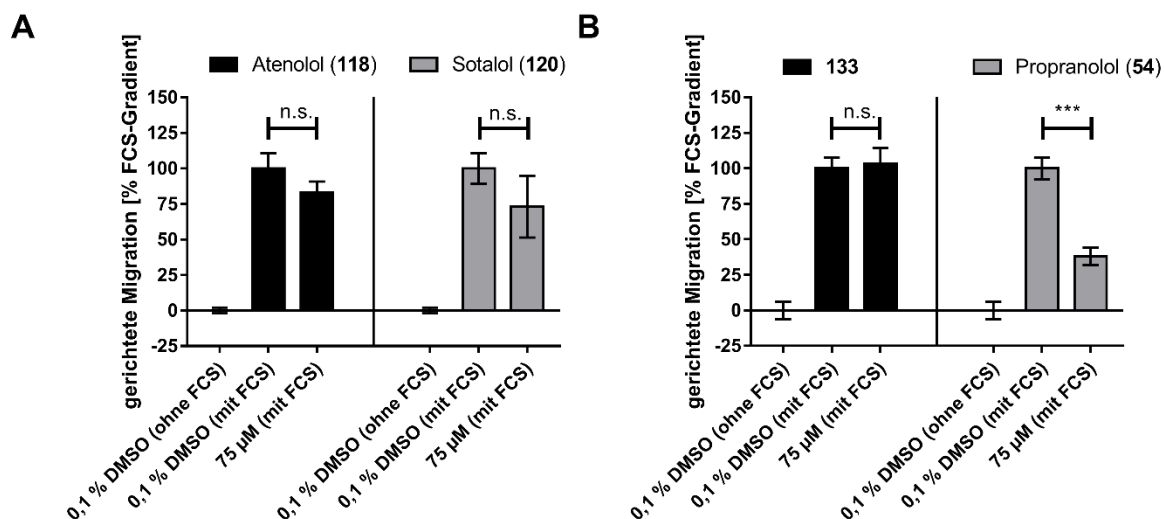


Abbildung 59: Untersuchung gerichteter Migrationseffekte nach 24 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) (A) und **133**, Propranolol (**54**) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle mit FCS-Gradienten. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t-Test* gegen die gerichtete Migration der FCS-haltigen Positivkontrolle analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Ausgehend von Fragment **30** konnte anhand einer Substruktursuche Propranolol (**54**) als TLX-Agonist identifiziert werden. Die Untersuchung weiterer β -Adrenorezeptorblocker lieferte Atenolol (**118**) und Sotalol (**120**) als inaktive, strukturähnliche Derivate als Negativkontrollen. Anhand einer SAR-Untersuchung von Propranolol (**54**) konnte die sekundäre Aminogruppe als essentielles Strukturmerkmal für eine Aktivität an TLX identifiziert werden, wohingegen die Substitution des Naphthalens durch ein Chinolin zu einem weiteren strukturähnlichen, inaktiven Derivat (**133**) an TLX führte. Für Propranolol (**54**) konnte neben anti-proliferativen und anti-migratorischen Effekten in TLX-exprimierenden T98G-Zellen im Vergleich zu den inaktiven Derivaten an TLX (Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) und **133**) ebenfalls signifikante TLX-Zielgenexpressionslevel beobachtet werden. Ein positiver Bindungsnachweis von Propranolol (**54**) an rekombinantem TLX-LBD-Protein deutete darauf hin, dass die beobachteten zellulären Effekte TLX-vermittelt sein könnten.

4.7 Design neuartiger TLX-Modulatoren anhand eines ligandenbasierten Pharmakophormodells

Fragment 06A05 (**45**) (Kapitel 4.3) stellte mit einem $EC_{50} = (20 \pm 3) \mu\text{M}$ (minimale Reporteraktivierung = $0,26 \pm 0,08$) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (siehe Abbildung 60 A) und einem $\Delta T_s = -3,2 \text{ } ^\circ\text{C}$ im DSF-Experiment ebenfalls eine interessante

Leitstruktur für die Entwicklung neuartiger TLX-Modulatoren dar. Zusätzlich bestätigte der Ausschluss von Gal4-VP16-vermittelten Effekten eine Gal4-TLX-abhängige Reportermodulation (siehe Abbildung 60 B).

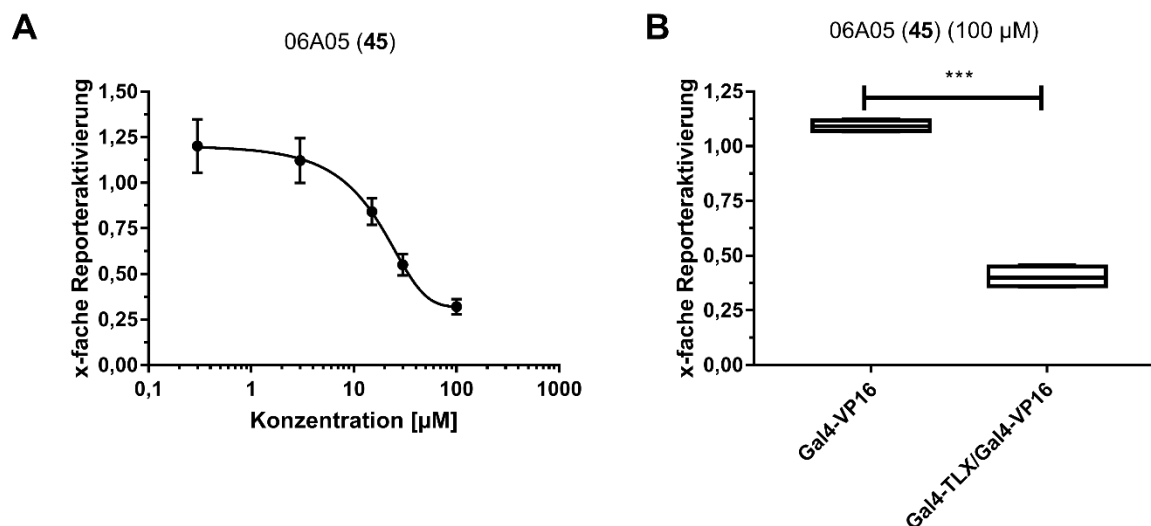


Abbildung 60: 06A05 (45) als TLX-Agonist. (A) Dosis-Wirkungskurve von 45 im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$). (B) Kontrollexperiment (nur Gal4-VP16) zur Bestätigung der TLX-vermittelten Effekte von 45 bei einer Konzentration von 100 μ M. Boxplots stellen die minimale bzw. maximale x-fache Reporteraktivierung im entsprechenden Setting gegen eine 0,1 % DMSO-Kontrolle dar. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's* t-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Fragment 45 zum Referenzliganden ccrp2 (2) wurde angenommen, dass beide Verbindungen möglicherweise über einen ähnlichen Bindungsmodus mit der TLX-LBD interagieren könnten, denn beide Substanzen besitzen einen fünfgliedrigen, stickstoffhaltigen Heterozyklus und verfügen über eine Aminofunktion (siehe Abbildung 61).

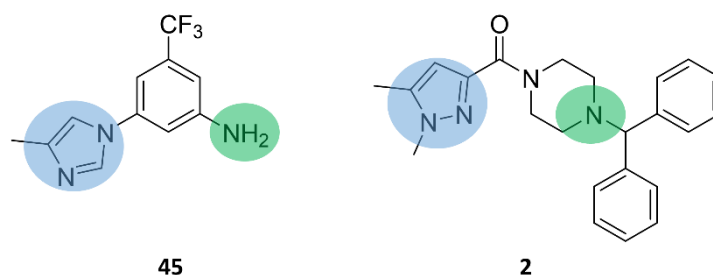


Abbildung 61: Strukturvergleich zwischen Fragment **45** und ccrp2 (**2**). Ähnliche Struktur motive (grün und blau) sind farblich hervorgehoben.

Da die in Abbildung 61 gezeigte 2D-Darstellung aber nicht die tatsächliche räumliche Struktur anordnung von Fragment **45** und ccrp2 (**2**) wiedergibt, wurden anhand eines 3D-Pharmakophormodells gemeinsame Pharmakophorpunkte beider TLX-Liganden identifiziert. Zu diesem Zweck wurde ein Pharmakophormodell basierend auf dem (1,5-Dimethyl-1*H*-pyrazol-3-yl)(piperazin-1-yl)methanon-Teil (**2a**) von ccrp2 (**2**) und Fragment **45** mit Hilfe der Software Molecular Operating Environment (Version: MOE2018.0101) entworfen. Das Pharmakophormodell suggerierte zwei hydrophobe Zentren (Methylgruppen, Benzolring und Piperazinring, grün), ein aromatisches Zentrum (Imidazol und Pyrazol, orange), einen Wasserstoffbrückenakzeptor (Stickstoffe des Imidazols und Pyrazols, cyan) und einen Wasserstoffbrückendonator (Amingruppen, magenta) als insgesamt fünf gemeinsame Pharmakophorpunkte (siehe Abbildung 62). Dieses entwickelte Pharmakophormodell deutete somit einen ähnlichen Bindungsmodus von **2a** und **45** an TLX an.

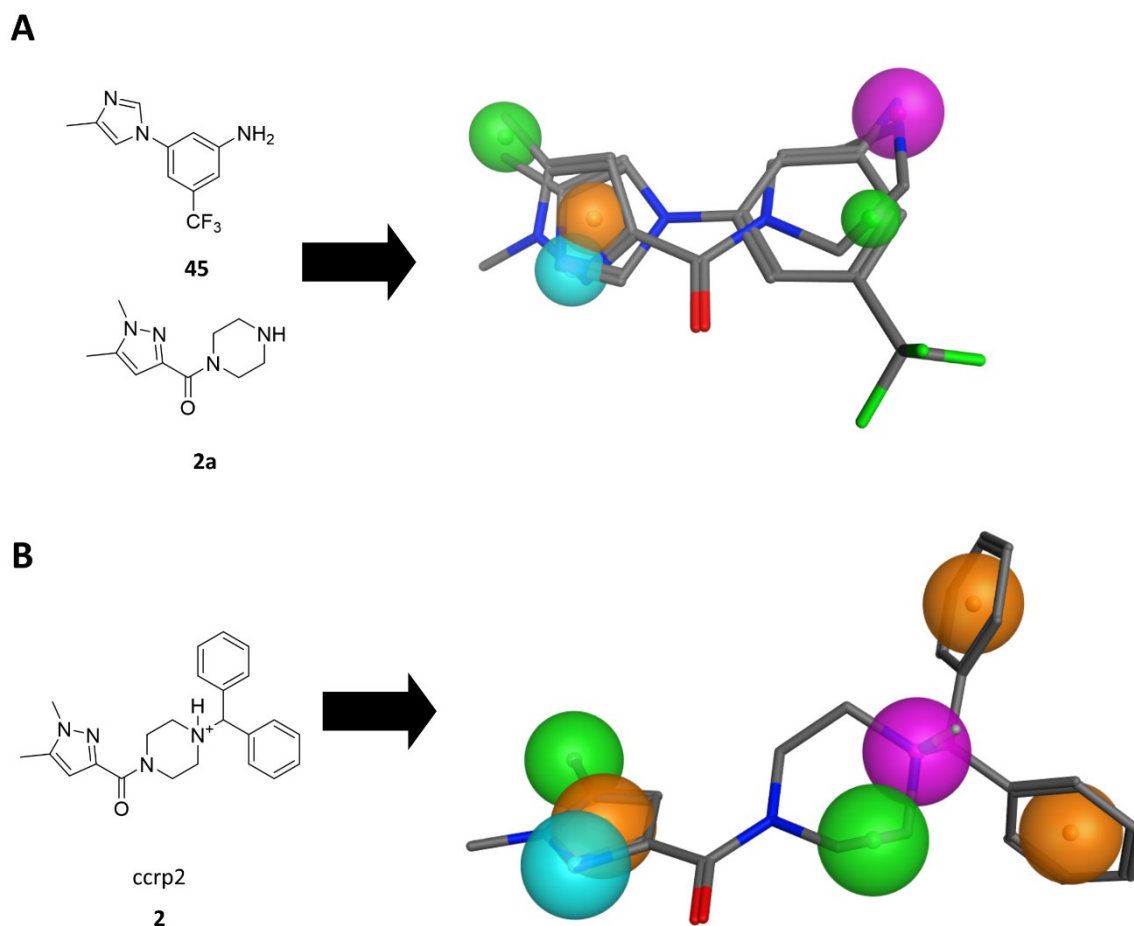
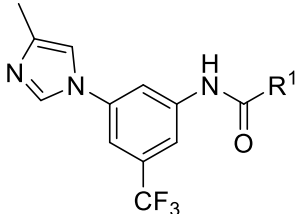
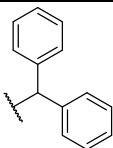
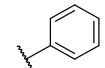
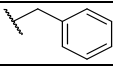
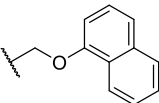
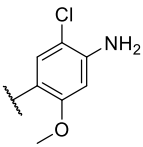
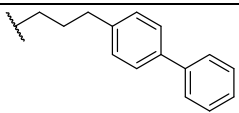
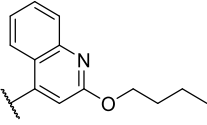
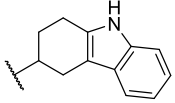


Abbildung 62: Pharmakophormodell von Fragment **45** und Molekülfragment (**2a**) aus ccrp2 (**2**) (**A**) im Vergleich zu ccrp2 (**2**), welches unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt (Ermittlung erfolgte mit MOE) (**B**). Gemeinsame Pharmakophorpunkte sind farblich hervorgehoben. Hydrophobe Zentren (grün), aromatische Zentren (orange), Wasserstoffbrückenakzeptor (cyan) und Wasserstoffbrückendonatoren (magenta).

Aufgrund des sterisch anspruchsvollen Diphenylmethans in ccrp2 (**2**) war anzunehmen, dass - unter der Annahme eines ähnlichen Bindungsmodus basierend auf dem Konsensus-Pharmakophormodell von **2a** und **45** - in **45** Kapazität für die strukturelle Erweiterung an der aromatischen Aminposition vorhanden war. Die Derivatisierung von **45** erfolgte durch Amidkupplungsreaktionen, da eine umfangreichere, kommerzielle Verfügbarkeit korrespondierender Carbonsäureedukte gegeben war. Für eine Proof-of-Concept Studie wurde das Diphenylmethan aus ccrp2 (**2**) mit Fragment **45** über eine Amidbindung in **137a** verknüpft. Dieses war allerdings bereits bei einer Konzentration von 10 μM toxisch (siehe Tabelle 16).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX synthetisierter Derivate **137a-h**, **141** und **144**. Alle aktiven Derivate wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines *Student's* t-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05$ = * gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < x\text{-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

		
Substanz	R ¹	EC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reportergenassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
ccrp2 2	-	(1,0 \pm 0,3) μ M ¹⁰⁹
137a		inaktiv (10 μ M)
137b	Me	(11,2 \pm 1,8) μ M 0,45 \pm 0,04
137c		inaktiv (10 μ M)
137d		inaktiv (30 μ M)
137e		inaktiv (10 μ M)
137f		(3,0 \pm 1,0) μ M 0,58 \pm 0,05
137g		(1,18 \pm 0,14) μ M 0,38 \pm 0,03
137h		(0,25 \pm 0,15) μ M 0,50 \pm 0,10
141		inaktiv (10 μ M)

144		$(5,2 \pm 1,3) \mu\text{M}$ $0,27 \pm 0,07$
------------	---	--

Die Einführung einer kleineren Acetylgruppe (**137b**) führte dagegen mit einem $\text{EC}_{50} = (11,2 \pm 1,8) \mu\text{M}$ (minimale Reporteraktivierung = $0,45 \pm 0,04$) zu einer Potenzverbesserung um einen Faktor von ca. zwei im Vergleich zu Fragment **45** (siehe Tabelle 16). Zudem konnten auch hier Gal4-VP16-spezifische Effekte ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 63).

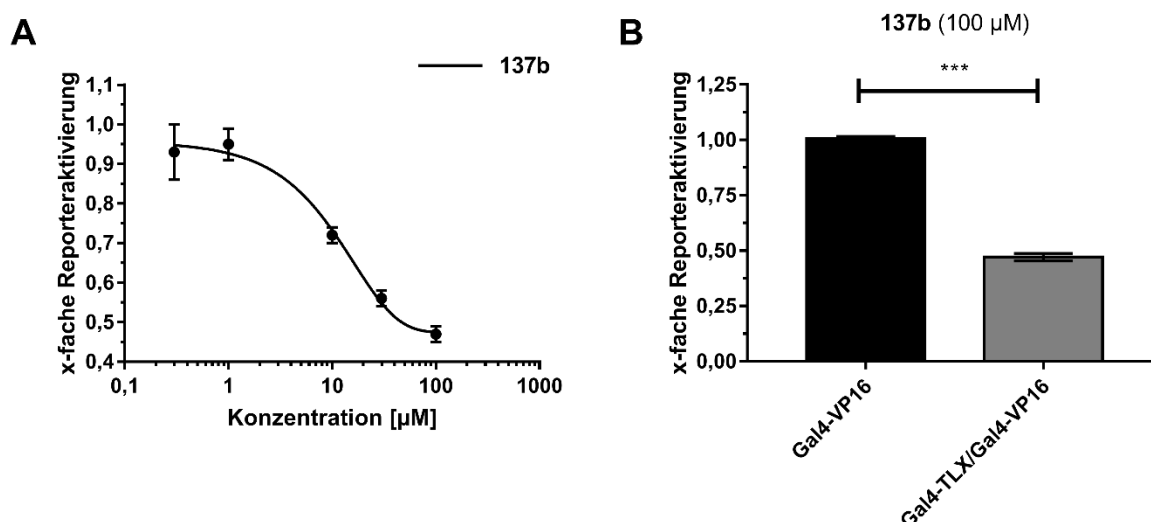


Abbildung 63: **137b** als TLX-Agonist. (A) Dosis-Wirkungskurve von **137b** im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$). (B) Kontrollelexperimente (nur Gal4-VP16) zur Bestätigung der TLX-vermittelten Modulation von **137b** bei einer Konzentration von 100 μM . Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's* t-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.).

Um das Konzept der Amidderivatisierung von Fragment **45** weiter zu bestärken, wurde **137b** (100 μM) in einem DSF-Experiment auf eine TLX-LBD-Proteinschmelzpunktverschiebung hin untersucht, um Hinweise auf eine direkte Interaktion an rekombinantem TLX-LBD-Protein zu erhalten. Als Positivkontrollen wurden *ccrp2* (**2**, 100 μM) und Fragment **45** (100 μM) verwendet. Im Vergleich zu einer unbehandelten 2 % DMSO-Kontrolle konnte für *ccrp2* (**2**, $\Delta T_s = -1,08 \text{ }^\circ\text{C}$), **45** ($\Delta T_s = -1,69 \text{ }^\circ\text{C}$) und **137b** ($\Delta T_s = -3,78 \text{ }^\circ\text{C}$) eine zunehmende negative Proteinschmelzpunktverschiebung bestimmt werden, was - neben den zellulären Daten - zusätzlich den affinitätssteigernden Gewinn der Amidderivatisierung von Fragment **45** hervorhob (siehe Abbildung 64).

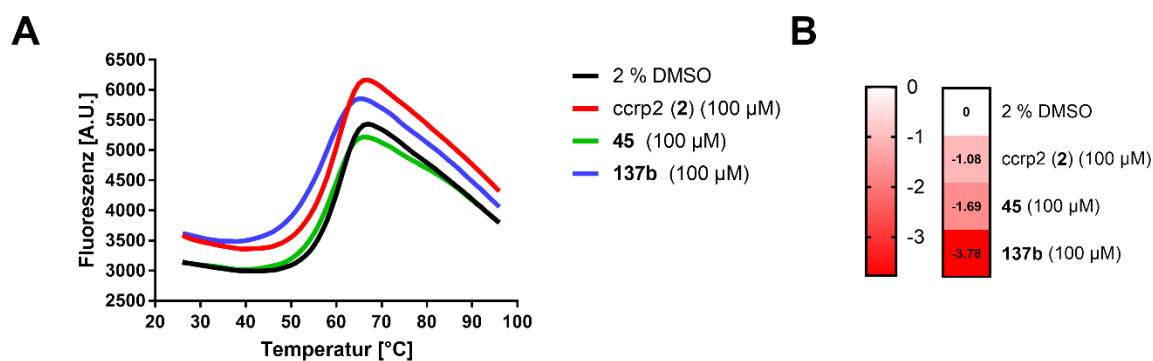


Abbildung 64: DSF-Experiment von ccrp2 (**2**), Fragment **45** und **137b** bei einer Konzentration von 100 μM gegen eine unbehandelte 2 % DMSO-Kontrolle. **(A)** Proteinschmelzkurven in Gegenwart der Testsubstanzen und einer unbehandelten 2 % DMSO-Kontrolle. **(B)** Heat-Map Darstellung der ΔT_5 -Werte gegen die unbehandelte 2 % DMSO-Kontrolle. Alle Experimente sind als Mittelwert mit $n = 2$ dargestellt.

An diesem Punkt stellte sich die Frage, welchen Verlauf die Derivatisierungsstrategie von Fragment **45** annehmen sollte. Um einen möglichst rationalen Ansatz basierend auf den erhobenen und validierten Daten zu wählen, wurden Fragmente (**29**, **30**, **37**, **38**, **48** und **49**) aus dem Wirkstofffragmentscreening verwendet, die im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay eine ähnliche verstärkende Gal4-TLX-Transrepression als TLX-Agonisten ausübten (siehe Abbildung 65).

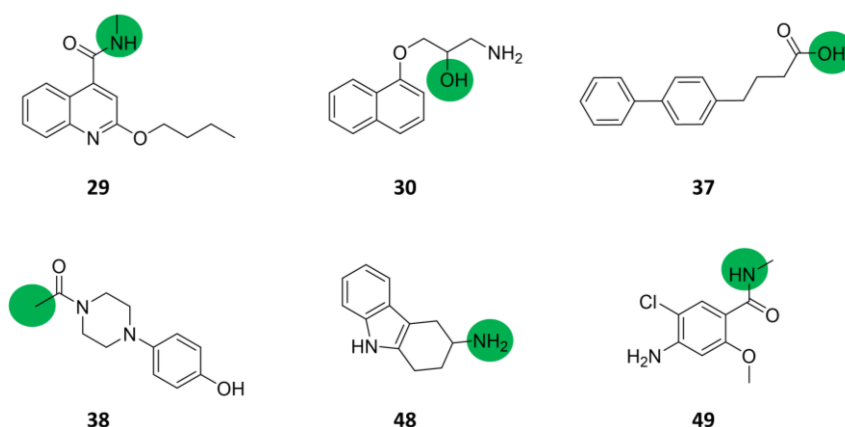


Abbildung 65: Fusionszentren oder funktionelle Gruppen, die über Amidkupplung mit Fragment **45** vereint werden sollten.

Bei dieser Herangehensweise wurden zwei wichtige Voraussetzungen angenommen:

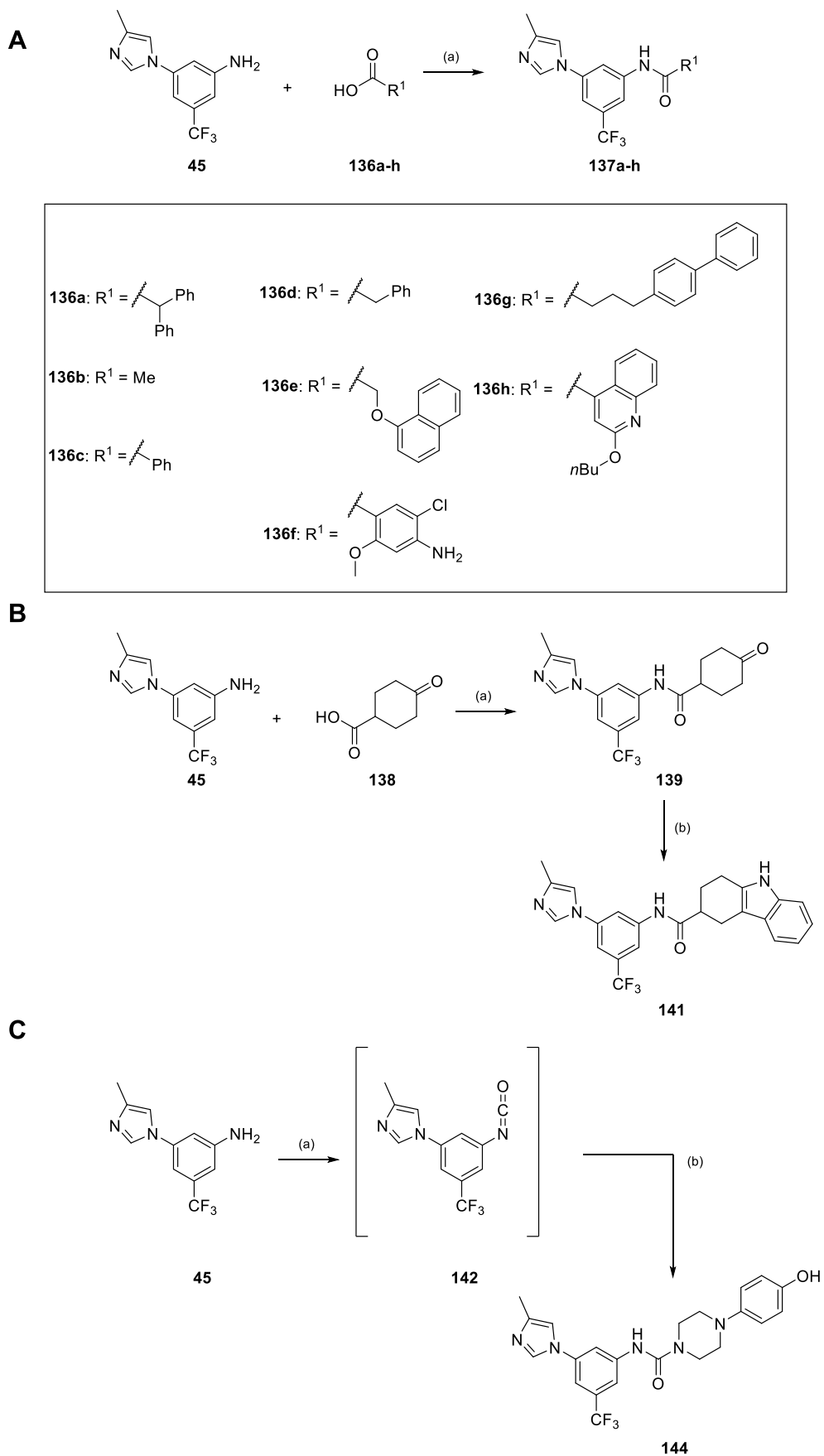
- 1) Die zu fusionierenden Fragmente (**29**, **30**, **37**, **38**, **48** und **49**) gehorchen keinem gemeinsamen Pharmakophormodell mit Fragment **45**. Andernfalls würden die Fragmente höchstwahrscheinlich um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, sodass eine Fusion in einem Molekül nicht sinnvoll wäre. In der Tat gehorchte keines der

genannten Fragmente dem entwickelten Pharmakophormodell (Analyse erfolgte mittels MOE), sodass diese Annahme valide war.

- 2) Die zu fusionierenden Fragmente (**29**, **30**, **37**, **38**, **48** und **49**) binden zumindest in der gleichen Bindungsregion von Fragment **45**, sodass ihre Fusion in ein einziges Molekül zu einem Affinitätsgewinn führen könnte.

Die meisten Derivate konnten über eine einstufige Synthese ausgehend von **45** mit Hilfe von EDC·HCl unter Verwendung der Carbonsäuren (**136a-h**) zu **137a-h** synthetisiert werden (siehe Schema 7 A). Derivat **141** wurde über eine zweistufige Syntheseroute dargestellt. Ausgehend von **45** und 4-Oxocyclohexan-1-carbonsäure (**138**) wurde ebenfalls über eine EDC·HCl-vermittelte Amidkupplung Intermediat **139** hergestellt, welches durch eine folgende Fischer-Indol-Reaktion unter Verwendung von Phenylhydrazin·HCl (**140**) zu **141** derivatisiert wurde (siehe Schema 7 B)¹⁹⁰. Harnstoffderivat **144** wurde über eine Eintopfreaktion ausgehend von **45** hergestellt. Hierbei wurde **45** unter Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) *in situ* zum Isocyanat **142** umgesetzt. Anschließend wurde 4-(Piperazin-1-yl)phenol (**143**) hinzugegeben, sodass durch einen nukleophilen Angriff am Isocyanat der Harnstoff **144** entstehen konnte (siehe Schema 7 C).

Ergebnisse und Diskussion



Schema 7: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen **137a-h**, **141** und **144**. Reagenzien und Bedingungen: **(A)** (a) CHCl₃, EDC·HCl, Raumtemperatur (RT), 24-72 Stunden, Ausbeute: 7-97 %. **(B)** (a) CHCl₃,

Ergebnisse und Diskussion

EDC-HCl, RT, 24 Stunden, Ausbeute: 60 %. (b) EtOH, Phenylhydrazin-HCl (**140**), 70 °C, 8 Stunden, Ausbeute: 13 %.
(C) (a) CHCl₃, CDI, NEt₃, RT, 120 Stunden. (b) 4-(Piperazin-1-yl)phenol (**143**), 180 Stunden, Ausbeute: 86 %.

Zusätzlich zur Fragmentfusion wurde mit den Derivaten **137c** und **137d** die Einführung eines Phenyl- bzw. Benzylsubstituenten untersucht. Beide Verbindungen (**137c** und **137d**) zeigten jedoch keine Aktivität im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Die Einführung eines 1-Methoxynaphthalens (**137e**) und Tetrahydrocarbazols (**141**) führte ebenfalls zu inaktiven Derivaten. Harnstoffderivat (**144**) wies mit einem EC₅₀ = (5,2 ± 1,3) µM (minimale Reporteraktivierung = 0,27 ± 0,07) eine Potenzverbesserung auf. In einem ähnlichen EC₅₀-Bereich lag auch Derivat **137f** (EC₅₀ = (3,0 ± 1,0) µM, minimale Reporteraktivierung = 0,58 ± 0,05). Die Charakterisierung von **137f** bewies, dass die Phenylsubstitution determinierend für eine Aktivität an Gal4-TLX ist, da **137c** im Vergleich inaktiv war. Die potentesten Derivate aus der Fragmentfusion konnten mit **137g** (EC₅₀ = (1,18 ± 0,14) µM, minimale Reporteraktivierung = 0,38 ± 0,03) und **137h** (EC₅₀ = (0,25 ± 0,15) µM, minimale Reporteraktivierung = 0,50 ± 0,10) erhalten werden. Von diesen wurde **137h** aufgrund der höheren Potenz tiefergehend untersucht.

Der Ausschluss Gal4-VP16-spezifischer Effekte von **137h** bestätigte die Aktivität als TLX-Agonist im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Zusätzlich wurde **137h** im TLXfull/TAE-Reporterassay analysiert und zeigte eine Dosis-Wirkungskurve mit einem EC₅₀ = (0,7 ± 0,3) µM (siehe Abbildung 66 A-C). Mit diesen Befunden erfüllte **137h** ähnlich wie Propranolol (**54**) die Kriterien zur Klassifizierung als TLX-Agonist. Analog zum TLX-Agonisten Propranolol (**54**) hatte **137h** bis zu einer Konzentration von 100 µM keinen modulatorischen Effekt auf die VP16-RXRα/Gal4-TLX-Heterodimer-vermittelte Reporteraktivierung (siehe Abbildung 66 D).

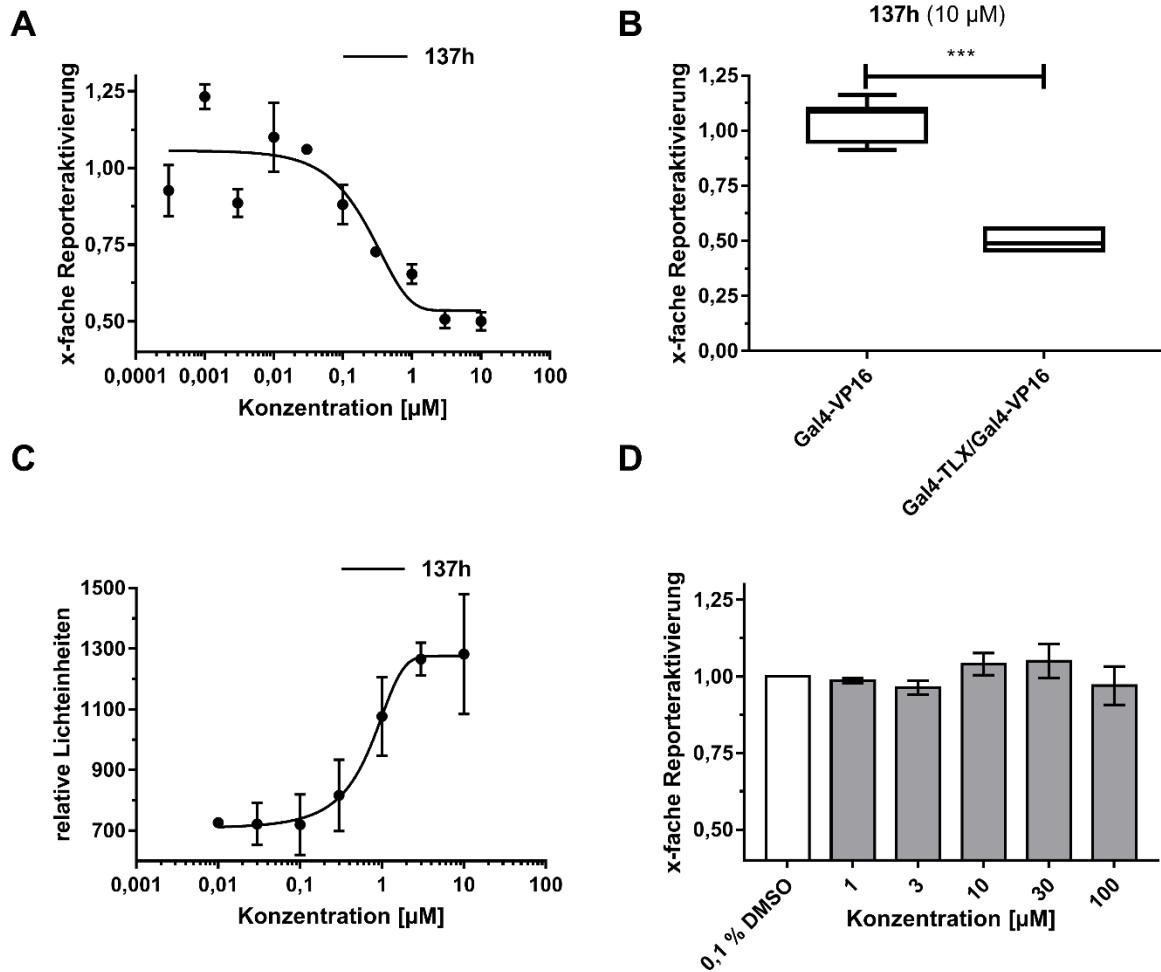


Abbildung 66: **137h** als TLX-Agonist. **(A)** Dosis-Wirkungskurve von **137h** im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt. **(B)** Kontrollexperimente (nur Gal4-VP16) zur Bestätigung der TLX-vermittelten Modulation von **137h** bei einer Konzentration von 10 μM . Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 7$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's* t-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.). **(C)** Dosis-Wirkungskurve von **137h** im TLXfull/TAE-Reporterassay. Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt. **(D)** Verdünnungsreihe von **137h** (1-100 μM) im VP16-RXRa/Gal4-TLX-Reporterassay. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt.

Als nächstes wurde auch das Selektivitätsprofil von **137h** an weiteren Gal4-NRs evaluiert. TR2 und TR4 besaßen aufgrund der hohen Verwandtschaft zu TLX eine ähnliche, intrinsische Transrepressorwirkung und wurden daher ebenfalls in Kombination mit Gal4-VP16 studiert. Insgesamt wurden 19 weitere Gal4-NRs untersucht, auf denen keine signifikante Aktivität von **137h** (3 μM) verzeichnet wurde (siehe Abbildung 67).

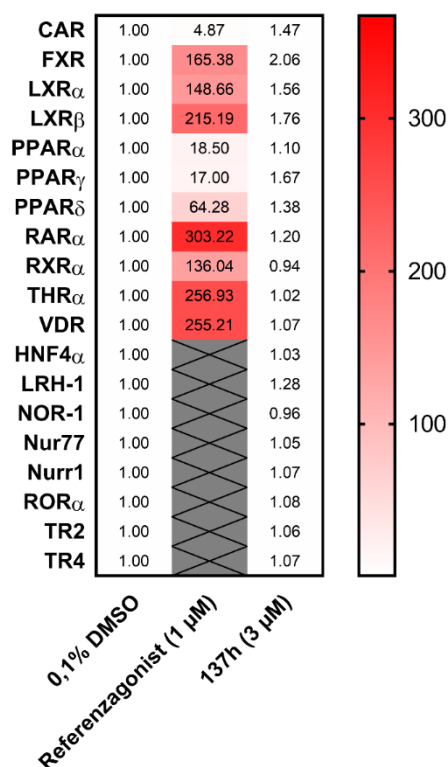


Abbildung 67: Selektivitätsprofil von **137h** (3 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle. Als Positivkontrolle wurden Gal4-NRs mit entsprechenden Referenzagonisten (1 μ M) aktiviert (CAR: CITCO, FXR: GW4064, LXR α / β : T0901317, PPAR α : GW7647, PPAR γ : Pioglitazon, PPAR δ : L165041, RAR α : Tretinoin, RXR α : Bexaroten, THR α : T3, VDR: Calcitriol). Konstitutiv transkriptionsaktive Gal4-NRs (HNF4 α , LRH-1, NOR-1, Nur77, Nurr1 und ROR α) konnten ohne einen Referenzagonisten (mit X gekennzeichnet) auf eine Aktivität studiert werden. TR2 und TR4 wurden in Kombination mit Gal4-VP16 studiert (mit X gekennzeichnet). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert mit n = 3 dargestellt.

Sowohl Fragment **45** als auch **137h** wurden bezüglich potentieller Effekte auf die TLX-Zielgenexpression untersucht. Hierbei wurden erneut T98G-Zellen acht Stunden mit **45** (30 μ M), **137h** (3 μ M) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Negativkontrolle behandelt. Beide getesteten Verbindungen zeigten keinen Einfluss auf die Expression von TLX (siehe Abbildung 68 E). Für die TLX-regulierten Gene p21 und TET3 konnte ebenfalls keine signifikant veränderte Genexpression detektiert werden (siehe Abbildung 68 A und C). Für PTEN, SLC1a1 und TUSC1 wurde für beide Testverbindungen eine leichte Induktion verzeichnet, welche allerdings nur für **45** eine statistische Signifikanz erreichte (siehe Abbildung 68 B, G und H). Stärkere Effekte wurden hingegen auf die SIRT1- und BTG2-Genexpression beobachtet, wobei **137h** für BTG2 signifikante Effekte aufwies (siehe Abbildung 68 D und F).

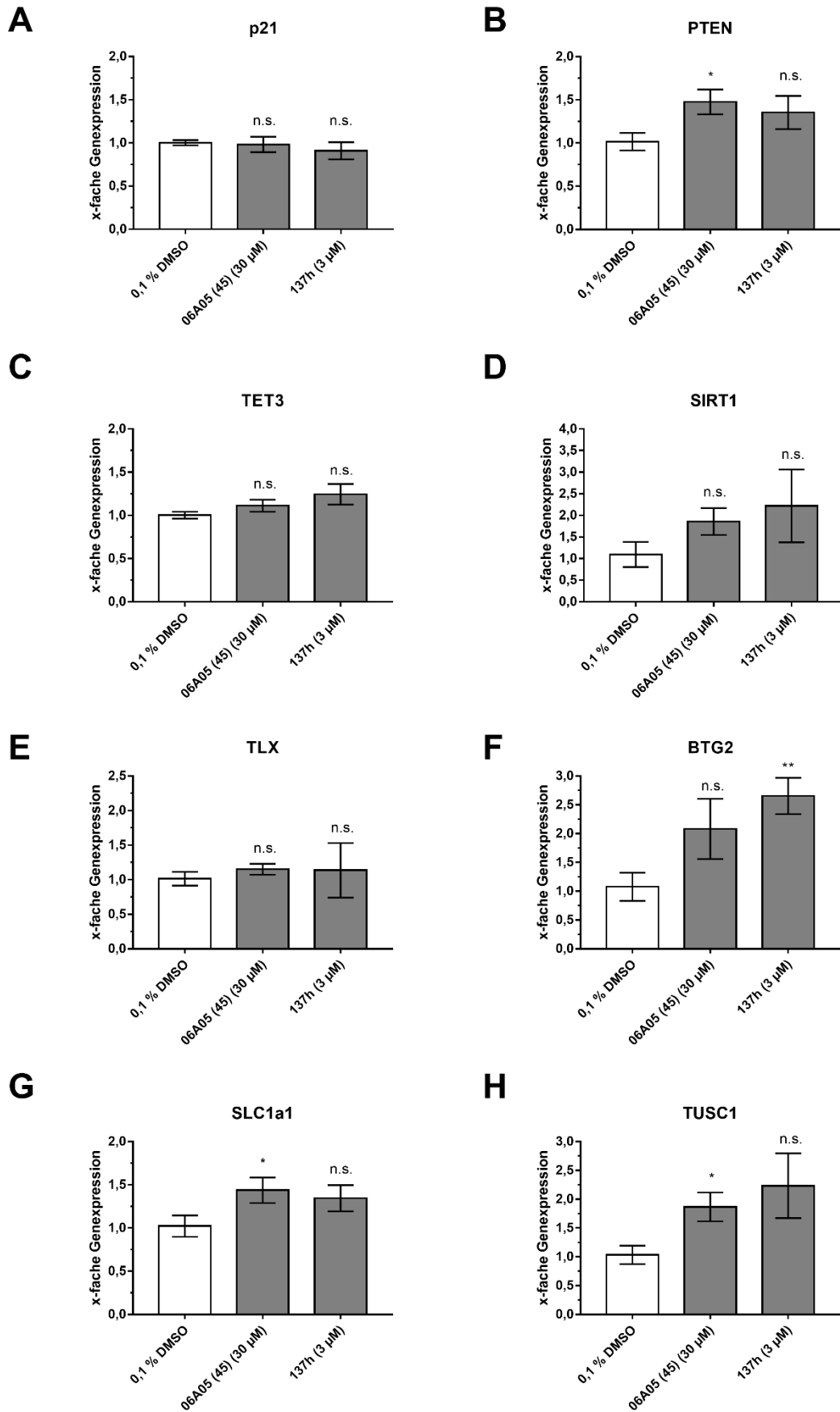


Abbildung 68: Relative Quantifizierung der x-fachen Genexpression der TLX-Zielgene p21 (A), PTEN (B), TET3 (C), SIRT1 (D), BTG2 (F), SLC1a1 (G) und TUSC1 (H) nach Behandlung mit 45 und 137h. Zusätzlich wurde auch die TLX-

Ergebnisse und Diskussion

Genexpression untersucht (E). T98G-Zellen wurden für acht Stunden mit 06A05 (**45**) (30 μM), **137h** (3 μM) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle behandelt. Die relative Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{C}_t$ -Methode unter Verwendung von GAPDH (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) als Referenzgen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 4$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test gegen die x-fache Genexpression einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Probe analysiert, $p \leq 0,001 = \text{***}$, $p \leq 0,01 = \text{**}$, $p \leq 0,05 = \text{*}$, $p > 0,05 = \text{nicht signifikant (n.s.)}$.

Mit Hilfe von ITC-Experimenten konnte außerdem ein Nachweis für die direkte Bindung von **137h** an rekombinantem TLX-LBD-Protein erbracht werden. Zu diesem Zweck wurde 40 μM rekombinantes TLX-LBD-Protein in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) mit **137h** (100 μM) bei 37 $^{\circ}\text{C}$ titriert. Um sonstige, unspezifische Wärmeeffekte (Verdünnungswärme etc.) auszuschließen, wurden auch die entsprechenden Kontrolltitrationen (Kontrollexperiment A: Puffer (1 % DMSO) gegen **137h** (100 μM), Kontrollexperiment B: 40 μM TLX-LBD-Protein (1 % DMSO) gegen Puffer (1 % DMSO)) mit den identischen Bedingungen wie im vorherigen Experiment durchgeführt. Während die Kontrolltitrationen eine exotherme Reaktion aufwiesen, zeigte das Protein-Ligand-Experiment eine endotherme Reaktion (siehe Abbildung 69).

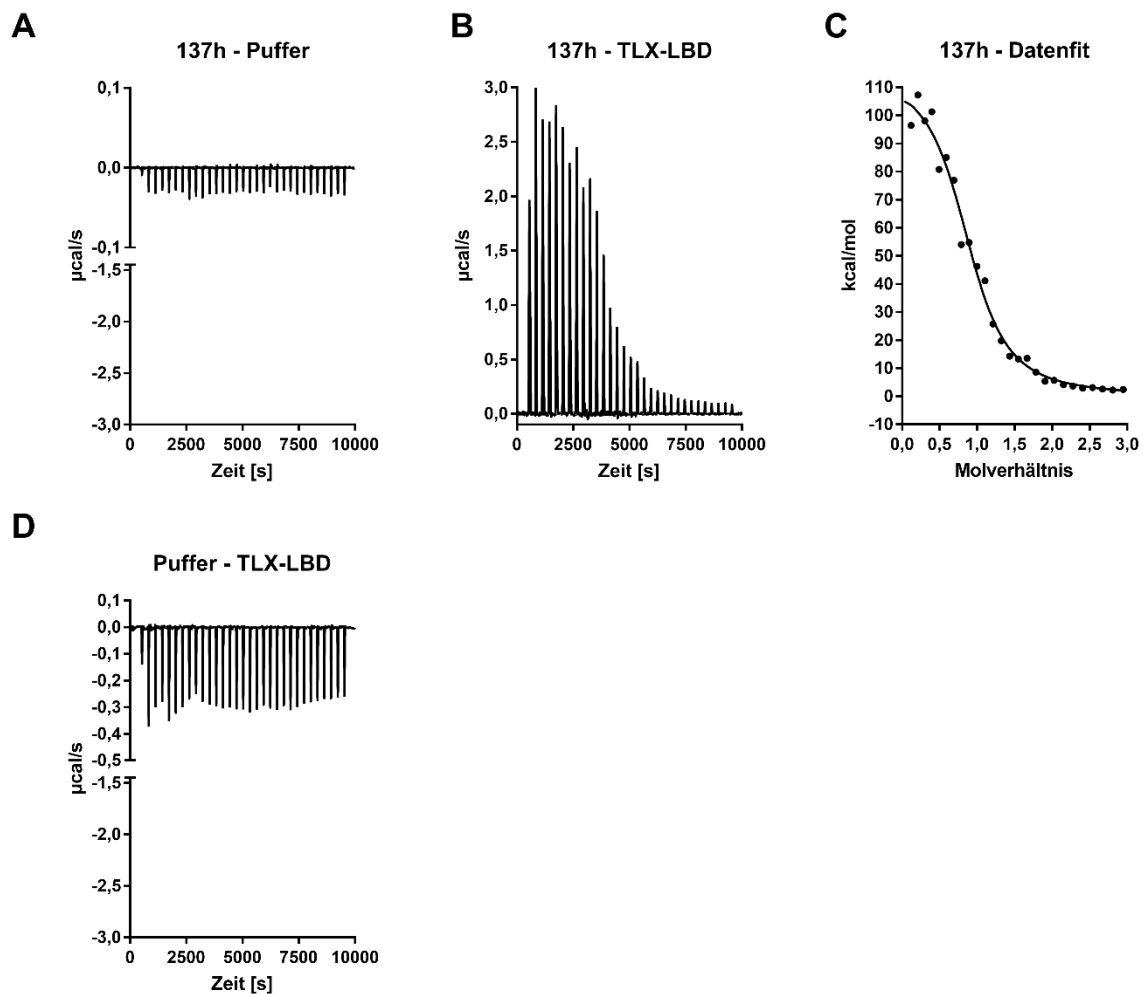


Abbildung 69: ITC-Experimente des TLX-LBD-Proteins (40 μM) mit **137h** (100 μM). Titrationsexperiment von **137h** in Puffer (**A**), **137h** in TLX-LBD-Protein (**B**), entsprechender Datenfit der korrigierten Wärmeraten (**C**) und Titrationsexperiment von Puffer in TLX-LBD-Protein als zusätzliches Kontrollexperiment (**D**).

Dieser Befund konnte als direkte Interaktion von **137h** mit einem $K_d = 1,6 \mu\text{M}$ mit rekombinantem TLX-LBD-Protein aufgefasst werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Thermodynamische Parameter von **137h** nach dem Datenfit. K_d = Dissoziationskonstante [μM], n = stöchiometrischer Koeffizient, ΔH = Enthalpieänderung [kcal/mol], $T\Delta S$ = Temperatur [K] mal Entropieänderung [kcal/mol·K].

Parameter	137h
K_d [μM]	1,6
n	0,92
ΔH [kcal/mol]	114
$T\Delta S$ [kcal/mol]	123

Zusätzlich wurde **137h** ebenfalls in zellfreien HTRF-Experimenten unter Verwendung von Tb³⁺-Kryptat-Streptavidin (Tb-SA) markierter Biotin-TLX-LBD als FRET-Donor und rekombinanter sGFP-TLX-LBD als FRET-Akzeptor studiert. Hierbei konnten für **137h** erste, fördernde TLX-Homodimerisierungseffekte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 70 A). Die Messung einer Dosis-Wirkungskurve von **137h** bei festen FRET-Donor (Tb-SA-Biotin-TLX-LBD)- bzw. FRET-Akzeptor (sGFP-TLX-LBD)-Konzentrationen resultierte in einem EC₅₀ = (5,0 ± 0,8) μM (siehe Abbildung 70 B).

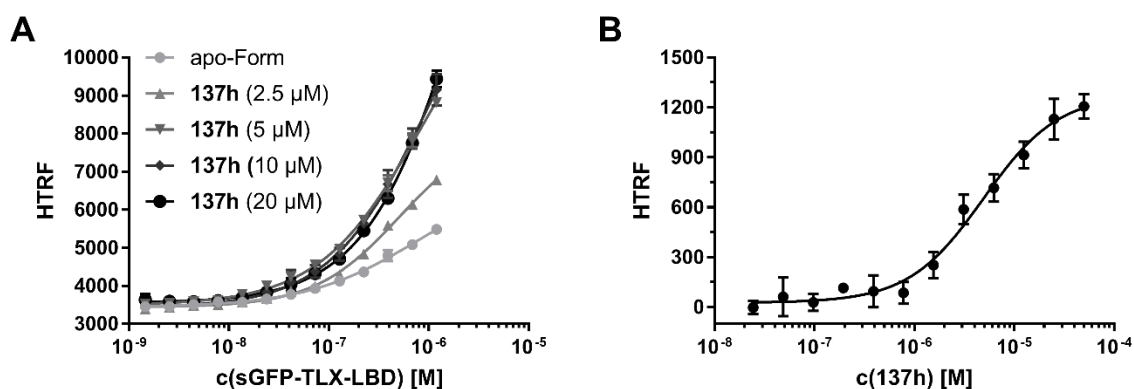


Abbildung 70: Einfluss von **137h** auf die TLX-Homodimerisierung mittels HTRF (engl. *homogenous time-resolved fluorescence*, HTRF)-Experimenten. (A) Verstärkende Homodimerisierungseffekte von **137h** unter Verwendung von rekombinanter Tb³⁺-Kryptat-markierter TLX-LBD als FRET-Donor mit zunehmender Menge an rekombinanter sGFP-markierter TLX-LBD als FRET-Akzeptor. (B) Dosis-Wirkungskurve von **137h** im TLX-Homodimerisierung HTRF-Setup (Tb³⁺-Kryptat-markierte TLX-LBD und sGFP-markierte TLX-LBD). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 3 angegeben.

Da **137h** einen neuartigen TLX-Agonisten mit großem Potential zur Weiterentwicklung darstellte, wurde neben toxischen Effekten in HEK293T-Zellen (mittels WST-Reagenzes) zusätzlich die metabolische Stabilität als wichtige pharmakokinetische Größe im Vergleich zum Startfragment 06A05 (**45**) und den Referenzliganden ccrp2 (**2**) und BMS453 (**7**) untersucht (von Astrid Kaiser durchgeführt, AK Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie). Nach einer 24-stündigen Inkubation von HEK293T-Zellen mit den Testsubstanzen wurde nach Zugabe des WST-Reagenzes die Absorption anhand der Herstellerangaben ausgelesen. Für die Bestimmung der metabolischen Stabilitäten wurden die Testsubstanzen in einem geeigneten Puffer mit Rattenleber-Mikrosomen versetzt und die Metabolisierung wurde jeweils nach 0, 15, 30 und 60 Minuten gestoppt. Anschließend wurde nach einem Zentrifugationsschritt der Restgehalt der Testsubstanzen aus dem Überstand mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid*

chromatography, HPLC) bestimmt. Ccrp2 (**2**), 06A05 (**45**) und **137h** zeigten im Vergleich zu BMS453 (**7**) über 10 μM verminderte toxische Effekte (siehe Abbildung 71 A). Startfragment 06A05 (**45**) und **137h** zeigten im Vergleich zu 7-Ethoxycoumarin (7-EC, Positivkontrolle) einen höheren Restgehalt nach entsprechenden Zeitintervallen, was die Eignung von **137h** als *tool compound* unterstrich. Ccrp2 (**2**) wies bereits nach 15 Minuten ein Restgehalt $< 10\%$, während BMS453 (**7**) chemisch instabil war, was die Bestimmung der metabolischen Stabilität bedeutend erschwerte (siehe Abbildung 71 B). Eine vorläufige Wasserlöslichkeitsabschätzung durch Absorptionsmessungen bei $\lambda = 650\text{ nm}$ von ccrp2 (**2**), BMS453 (**7**), 06A05 (**45**) und **137h** im DSF-Puffer (10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) pH 7,5, 100 mM NaCl) zeigte keine Aggregationseffekte für ccrp2 (**2**) und 06A05 (**45**) bei Konzentration von 100 μM jeweils, sodass die beobachteten negativen Proteinschmelzpunktverschiebungen im DSF-Experiment auf eine direkte Interaktion mit der TLX-LBD hinwiesen (siehe Abbildung 71 C). **137h** zeigte ein Löslichkeitsprofil, welches zwischen ccrp2 (**2**) und BMS453 (**7**) lag. Eine präzisere Wasserlöslichkeitsbestimmung von **137h** lieferte ungenügende Ergebnisse, da die Löslichkeit selbst nach 24-stündiger Inkubation mit Wasser unterhalb der Detektionsgrenze von 100 ng/mL lag, sodass hier noch Optimierungsbedarf besteht.

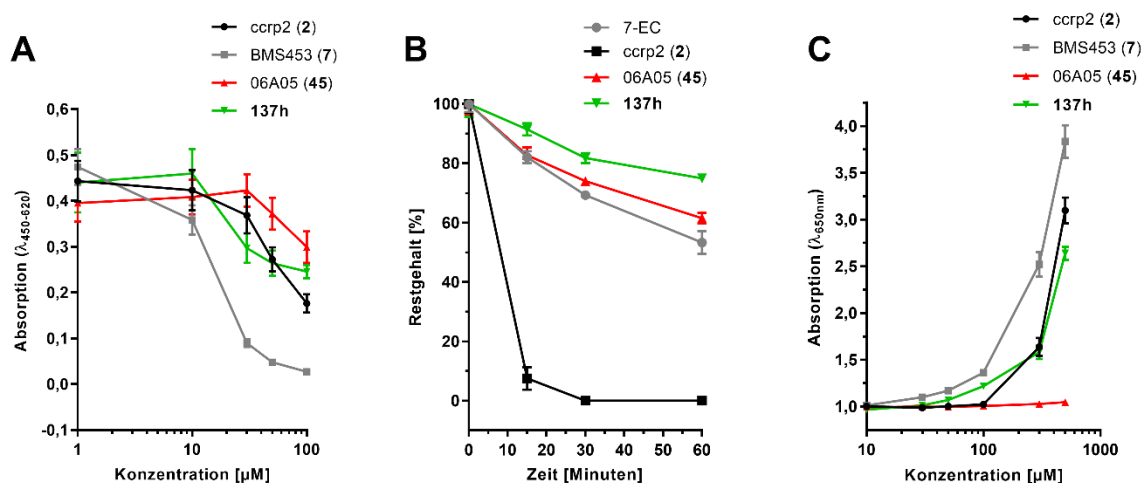


Abbildung 71: Vergleich von **137h** zur Startstruktur 06A05 (**45**) und den Referenzliganden ccrp2 (**2**) und BMS453 (**7**). (A) Untersuchung toxischer Effekte der Testsubstanzen **2**, **7**, **45** und **137h** in HEK293T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mittels WST-Reagenzes. (B) Restgehaltbestimmung von **2**, **45** und **137h** nach Behandlung mit Rattenleber-Mikrosomen nach 0, 15, 30 und 60 Minuten. 7-Ethoxycoumarin (7-EC) wurde als Positivkontrolle verwendet. (C) Löslichkeitsabschätzung im DSF-Puffer anhand von Absorptionsmessungen von **2**, **7**, **45** und **137h**. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

In der Gesamtbetrachtung zeigte **137h** ein vielversprechendes *in vitro* Profil im Vergleich zu den Referenzliganden ccrp2 (**2**), BMS453 (**7**) und dem Startfragment 06A05 (**45**), was den Einsatz von **137h** als *tool compound* hervorhob.

Der strukturelle Vergleich des Referenzliganden ccrp2 (**2**) mit dem Startfragment 06A05 (**45**) mit Hilfe eines ligandenbasierten Pharmakophormodells suggerierte einen ähnlichen Bindungsmodus an TLX. Die Acetylierung der freien aromatischen Aminogruppe mit dem Derivat **137b** hob anhand einer Potenzverbesserung und einer stärkeren Proteinschmelzpunktverschiebung im Vergleich zum Startfragment **45** die Derivatisierungsstrategie von **45** über Amidkupplungen hervor. Die anschließende Derivatisierungskampagne von **45** unter Verwendung der identifizierten Wirkstofffragmente aus dem Wirkstofffragmentscreening führte mit **137h** zu einem potenten TLX-Agonisten mit einem vielversprechenden Selektivitätsprofil bzgl. TLX innerhalb der NR-Familie. Für **137h** konnte neben der Modulation von TLX-Zielgenen ebenfalls die Bindung an rekombinantem TLX-LBD-Protein mittels ITC- und HTRF-Experimenten (Modulation der TLX Homodimerisierung) bestätigt werden. Toxizitätsstudien in HEK293T-Zellen, metabolische Stabilitätsstudien und erste Löslichkeitsstudien zeigten, dass **137h** den Referenzliganden ccrp2 (**2**) und BMS453 (**7**) überlegen ist, was den Einsatz von **137h** als *tool compound* besonders unterstreicht.

4.8 Scaffold Hopping und kombinatorische Chemie

Eine weitere Herangehensweise um neuartige TLX-Modulatoren zu entwickeln basierte auf dem strukturellen Vergleich der Fragmente **39** und **47** mit **34**. Bei allen drei Verbindungen handelte es sich um anellierte, stickstoffhaltige Ringsysteme, die ein ähnliches elektrostatisches Umgebungspotential miteinander teilen (Analyse erfolgte mit MOE, siehe Abbildung 72). Alle drei Fragmente führten im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay zu einer verminderten, transrepressiven Wirkung von Gal4-TLX und waren dementsprechend als mögliche inverse TLX-Agonisten aufzufassen.

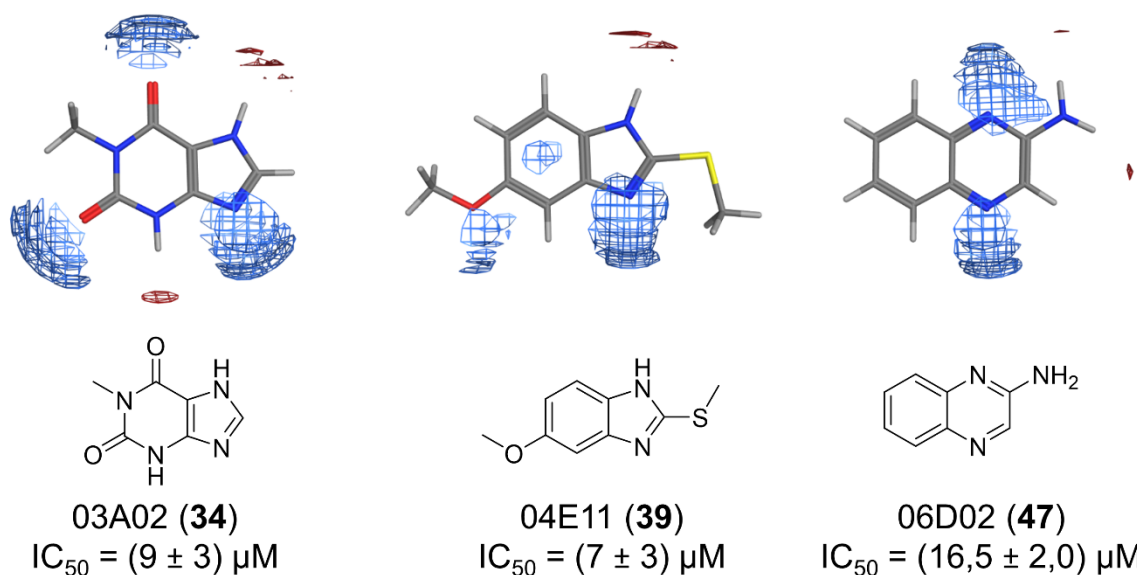
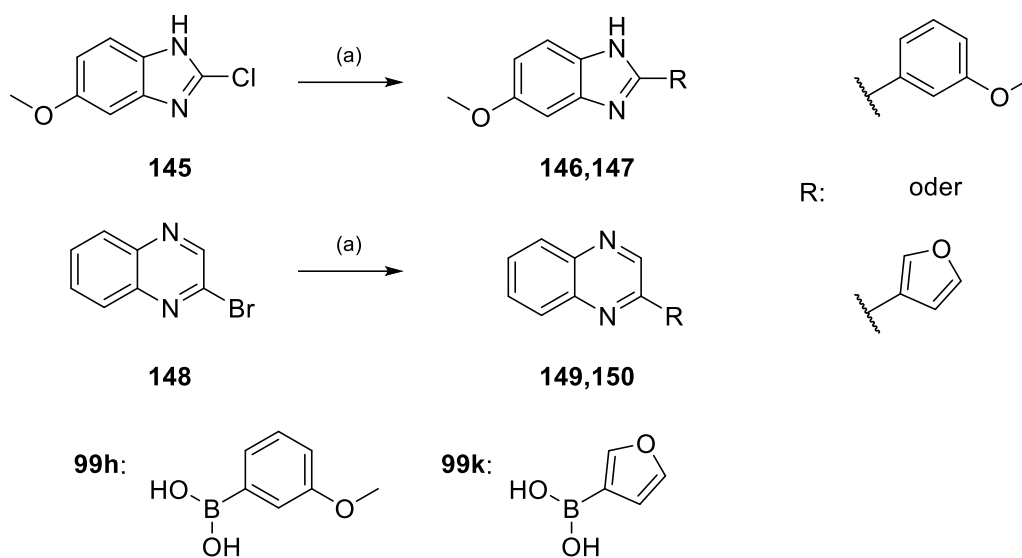


Abbildung 72: Struktureller Vergleich zwischen Fragment 03A02 (**34**), 04E11 (**39**) und 06D02 (**47**). Wasserstoffbrückenakzeptoren (blaues Gitter) und Wasserstoffbrückendonatoren (rotes Gitter) sind abgebildet.

Diese Observation ließ annehmen, dass die Fragmente **34**, **39** und **47** über einen ähnlichen Bindungsmodus an die TLX-LBD binden könnten. Sie stellten daher Kernstrukturen für einen Scaffold Hopping Ansatz dar. Ziel eines solchen Ansatzes ist ausgehend von bereits bekannten und aktiven Liganden die Entwicklung neuartiger Liganden durch Modifikation des Kerngerüsts¹⁹¹. Aus diesem Grund sollten die potenzsteigernden Struktur motive aus der SAR der Xanthine als TLX-Liganden (siehe Kapitel 4.5.5) mit **39** und **47** vereint werden, um neuartige TLX-Modulatoren von **39** und **47** abzuleiten. In diesem Zusammenhang wurde sowohl das 3-Methoxyphenyl- als auch das 3-Furyl-Strukturmotiv durch Substitution der Thioethergruppe in Fragment **39** und durch Substitution des Aminosubstituenten in Fragment **47** mit Hilfe einer Suzuki-Kupplungsreaktion eingeführt. Dabei wurden die entsprechenden Halogenderivate **145** oder **148** unter Verwendung eines Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)-Katalysators mit den Boronsäuren **99h** oder **99k** zu den Zielverbindungen **146**, **147** und **149**, **150** gekuppelt (siehe Schema 8).

Ergebnisse und Diskussion

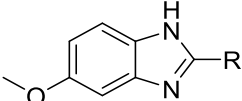
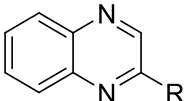
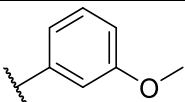
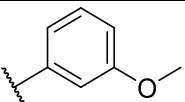
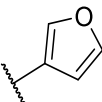
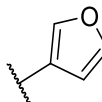


Schema 8: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen **146**, **147**, **149** und **150**. Reagenzien und Bedingungen: (a) Dioxan/H₂O (4:1 V/V), **99h** oder **99k**, Na₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, 110 °C, 2-14 Stunden, Ausbeuten: 60-87 %.

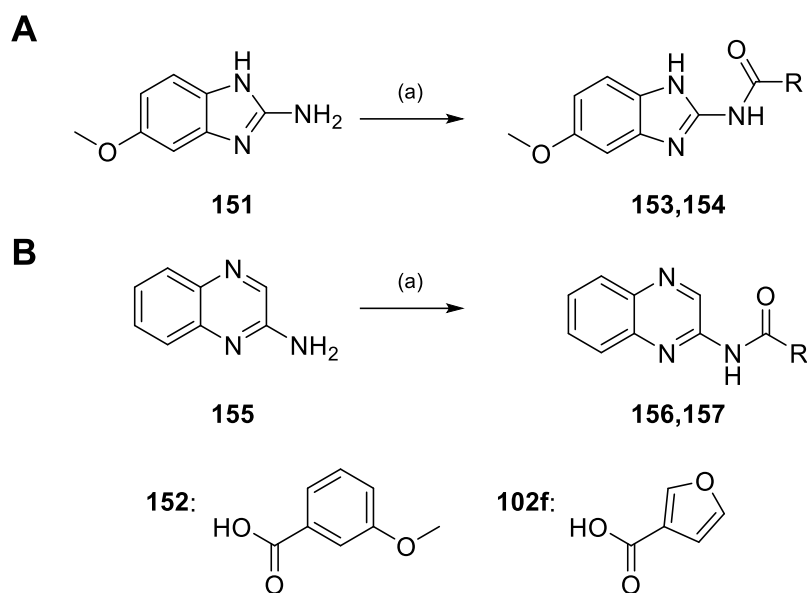
Alle synthetisierten Derivate waren bis zur angegebenen Konzentration inaktiv (siehe Tabelle 18).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 18: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX synthetisierter Derivate **146**, **147** und **149**, **150**. Alle Derivate, die eine Dosis-Wirkungskurve im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay aufwiesen, wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's t*-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Andernfalls wurden sie als inaktiv bewertet. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < x\text{-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

					
Substanz	R	IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max. x-fache Reporteraktivierung	Substanz	R	IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max. x-fache Reporteraktivierung
146		inaktiv (30 μ M)	149		inaktiv (30 μ M)
147		inaktiv (30 μ M)	150		inaktiv (30 μ M)

Die Moleküle **146**, **147** und **149,150** waren an die Xanthinderivate **100h** und **100k** angelehnt und konnten aufgrund fehlender Aktivität an Gal4-TLX deren Struktur offenbar nicht ausreichend imitieren. Betrachtet man im Vergleich Istradefyllin (**116**) und die Konfiguration von dessen 3,4-Dimethoxystyrylsubstituenten, so ergibt sich eine weitere Design-Hypothese für neue, auf die Fragmente **39** und **47** aufgebaute TLX-Liganden. Die strukturelle Eigenschaft von **116** einer zusätzlichen *trans*-konfigurierten Doppelbindung sollte daher durch eine zusätzliche Amidbindung nachgeahmt werden, welche durch den partiellen Doppelbindungscharakter ebenfalls eine *trans*-Konfiguration einnimmt. Daher wurden die Amidanaloga **153**, **154** und **156**, **157** ausgehend von **151** oder **155** mit Hilfe von EDC·HCl unter Verwendung der entsprechenden Carbonsäuren (**152** und **102f**) synthetisiert (siehe Schema 9).

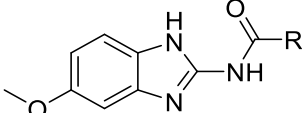
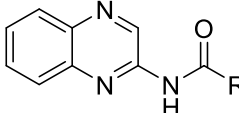
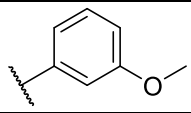
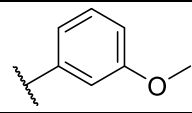
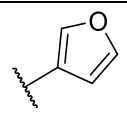
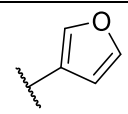


Schema 9: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen **153**, **154**, **156** und **157**. Reagenzien und Bedingungen: **(A)** (a) CHCl_3 , **152** oder **102f**, 4-DMAP, Raumtemperatur (RT), 35-48 Stunden, Ausbeuten: 18-69 %. **(B)** (a) CHCl_3 , **152** oder **102f**, EDC-HCl oder DCC, 50 °C, 7-23 Stunden, Ausbeuten: 10-22 %.

Im Vergleich zur vorherigen Serie ohne Amidlinker (**146**, **147** und **149**, **150**) konnten in dieser Serie (**153**, **154** und **156**, **157**) drei an Gal4-TLX aktive Derivate (**154**, **156** und **157**) identifiziert werden (siehe Tabelle 19).

Ergebnisse und Diskussion

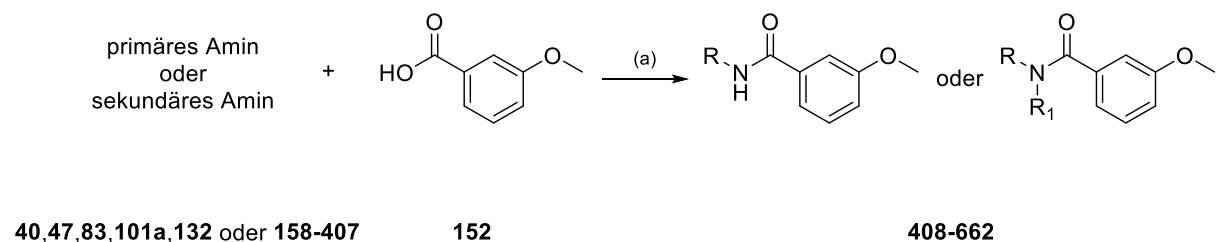
Tabelle 19: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX synthetisierter Derivate **153**, **154** und **156**, **157**. Alle aktiven Derivate wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an Gal4-TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's* t-Test die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Andernfalls wurden sie als inaktiv bewertet. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < x\text{-fache Reporteraktivierung} \leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt.

					
Substanz	R	IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max. x-fache Reporteraktivierung	Substanz	R	IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max. x-fache Reporteraktivierung
153		inaktiv (3 μ M)	156		(1,13 \pm 0,19) μ M 3,48 \pm 0,17
154		(0,53 \pm 0,14) μ M 2,30 \pm 0,08	157		(1,0 \pm 0,4) μ M 4,6 \pm 0,4

Alle drei wiesen IC₅₀-Werte im hohen nanomolaren bis einstelligen mikromolaren Bereich auf (**154**: IC₅₀ = (0,53 \pm 0,14) μ M; **156**: IC₅₀ = (1,13 \pm 0,19) μ M; **157**: IC₅₀ = (1,0 \pm 0,4) μ M). Somit konnte durch Nachahmung einer *trans*-konfigurierten Doppelbindung durch Einführung einer Amidbindung eine Potenzsteigerung im Vergleich zu **39** und **47** erzielt werden.

Anhand der bisherigen Daten aus der Xanthin-SAR und des vorläufigen Scaffold Hopping Ansatzes konnte geschlossen werden, dass das 3-Methoxyphenylgerüst ein bevorzugtes Strukturmotiv für die Modulation der Aktivität an Gal4-TLX durch Liganden darstellte. Dementsprechend eignete sich 3-Methoxybenzoesäure (**152**) als vielversprechende Startstruktur für die Derivatisierung im Sinne einer strukturdiversen Substanzbibliothek. Daher wurde 3-Methoxybenzoesäure (**152**) in einer kombinatorischen Bibliothek mit 255 verschiedenen primären und sekundären Aminen mit Hilfe von EDC-HCl derivatisiert (siehe Schema 10). Hierbei wurden Amine ausgewählt, die bereits im arbeitskreisinternen

Lagerbestand vorhanden waren, um eine ökonomische und große Strukturdiversität im Sinne eines „Repurposing“-Prinzips zu gewährleisten (siehe Anhang 2).

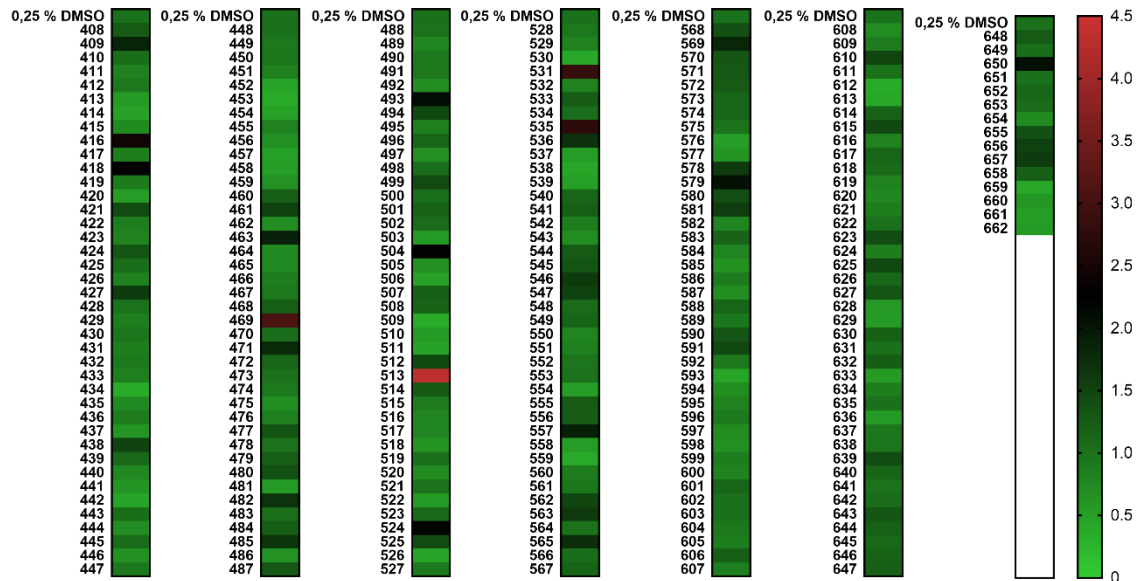


Schema 10: Syntheseroute zur Generation einer Substanzbibliothek. Reagenzien und Bedingungen: (a) CHCl_3 , je ein Amin (**40**, **47**, **83**, **101a**, **132** oder **158-407**), 3-Methoxybenzoesäure (**152**), EDC-HCl, 900 rpm, 40 °C, 24 Stunden.

Die Synthese erfolgte dabei in kleinem Maßstab in 1,5 mL Eppendorf-Tubes ohne Isolierung der Produkte unter Annahme einer 100 % Ausbeute. Hierbei wurden die Amine (0,0506 mmol, 1,00 Äq), 3-Methoxybenzoesäure (**152**, 0,066 mmol, 1,3 Äq) und EDC-HCl (0,066 mmol, 1,3 Äq) in 500 μL CHCl_3 für 24 Stunden bei 900 rpm und 40 °C inkubiert. Anschließend wurde nach einmaligem Waschen der organischen Phase mit H_2O die Chloroformphase bei Raumtemperatur abgedampft und der Rückstand in eine definierte Menge DMSO aufgenommen. Für die *in vitro* Charakterisierung in beiden TLX-Reporterassays erfolgte eine 400-fache Verdünnung dieser DMSO-Stammlösung, sodass bei einer 100%-igen Ausbeute eine maximale wirksame Konzentration von 25 μM und selbst bei einer 10%-igen Ausbeute eine Konzentration von 2,5 μM getestet wurde. Durch diesen niedrigen Schwellenwert (Aktivität bei 25 μM) waren nur wenige aktive Treffer zu erwarten als bei einer höheren Konzentration, sodass nur die interessantesten Kandidaten identifiziert wurden. Die Substanzbibliothek wurde sowohl im Gal4-TLX/Gal4-VP16- als auch im TLXfull/TAE-Reporterassay in zwei unabhängigen Experimenten im Vergleich zu einer unbehandelten 0,25 % DMSO-Kontrolle getestet. Dabei wurden im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay x-fache Reporteraktivierungen zwischen 0-1 (TLX-Agonisten) und 1-4,5 (inverse TLX-Agonisten) und im TLXfull/TAE-Reporterassay x-fache Reporteraktivierungen 0-1 (inverse TLX-Agonisten) und 1-4,7 (TLX-Agonisten) beobachtet (siehe Abbildung 73).

A

Gal4-TLX/Gal4-VP16



B

TLXfull/TAE

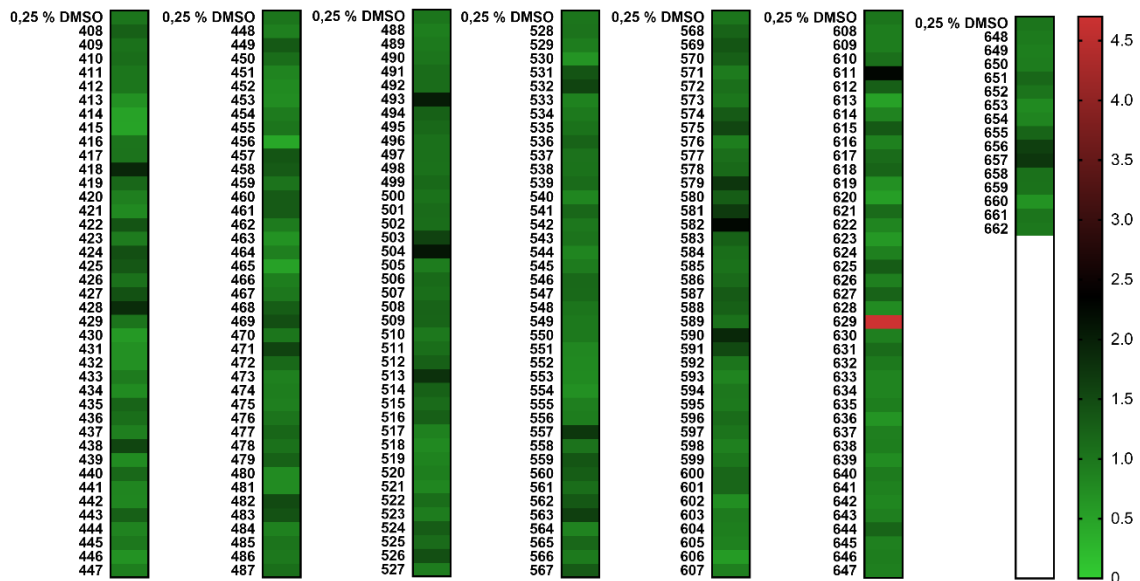
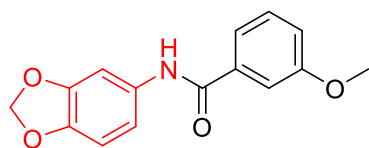


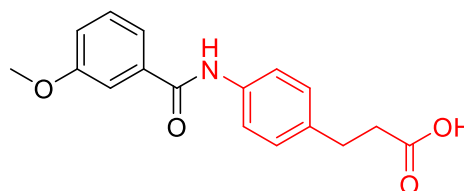
Abbildung 73: Heat Map Darstellung der x-fachen Reporteraktivierungen der Verbindungen **408-662** im Gal4-TLX/Gal4-VP16- (**A**) und im TLXfull/TAE-Reporterassay (**B**) gegen eine unbehandelte 0,25 % DMSO-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit $n = 2$. Leere Felder sind in weiß dargestellt.

Beide Reporterassays lieferten zahlreiche Treffer. Um die Aktivitäten der potentiellen Zielverbindungen **408-662** zu verifizieren, mussten diese Moleküle gezielt synthetisiert und isoliert werden. Um nur die vielversprechendsten Trefferkandidaten zu synthetisieren, wurden sehr strenge Auswahlkriterien festgesetzt. Ziel war es TLX-Agonisten ausfindig zu

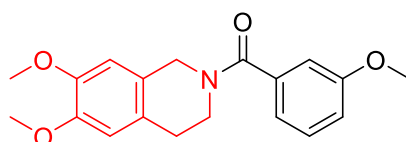
machen, daher wurde die Bibliothek nach Substanzen mit den Kriterien x-fache Reporteraktivierung (Gal4-TLX/Gal4-VP16) ≤ 1 und x-fache Reporteraktivierung (TLXfull/TAE) ≥ 2 auf genau drei potentiell entstandenen Zielverbindungen (**582**, **611** und **629**) reduziert (siehe Abbildung 74).



582
Gal4-TLX/Gal4-VP16: 0,796
TLXfull/TAE: 2,267



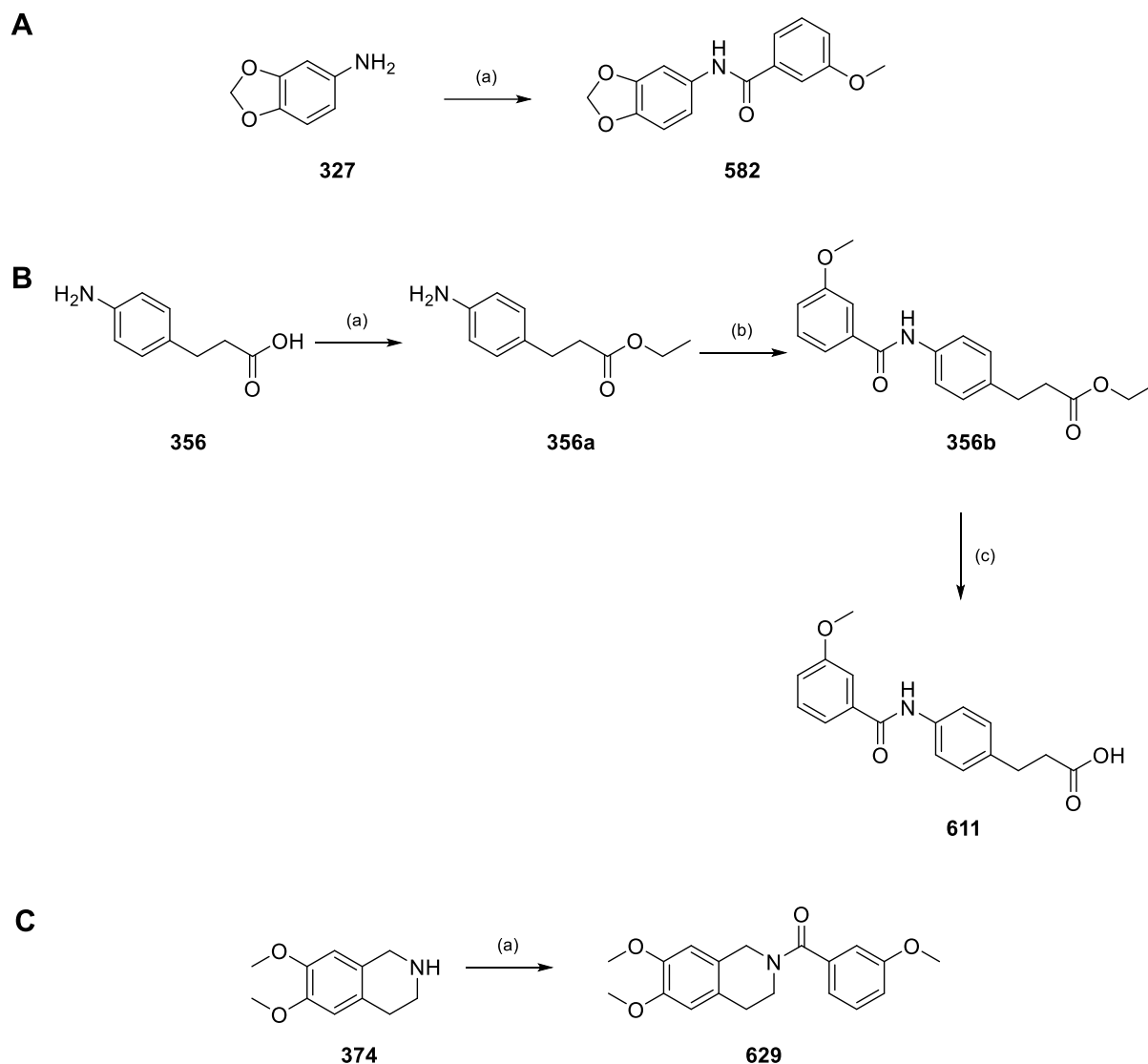
611
Gal4-TLX/Gal4-VP16: 0,997
TLXfull/TAE: 2,274



629
Gal4-TLX/Gal4-VP16: 0,534
TLXfull/TAE: 4,690

Abbildung 74: Darstellung der drei interessantesten, möglichen Trefferkandidaten **582**, **611** und **629** mit den entsprechenden x-fachen Reporteraktivierungen im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay. Die neu identifizierten Strukturmodule sind rot hervorgehoben.

Die Verbindungen **582** und **629** wurden über eine einstufige Synthese ausgehend von **327** und **374** mit Hilfe von EDC·HCl unter Verwendung von 3-Methoxybenzoesäure (**152**) synthetisiert (siehe Schema 11 A und C). Das Carbonsäurederivat **611** wurde über eine dreistufige Syntheseroute dargestellt. Ausgehend von **356** wurde die Carbonsäurefunktion durch eine säurekatalysierte Veresterungsreaktion mit EtOH geschützt. Dies war notwendig um die darauffolgende Amidkupplungsreaktion von **356a** unter Verwendung von EDC·HCl mit 3-Methoxybenzoesäure (**152**) selektiv mit der freien Carbonsäure von **152** zu gewährleisten und somit **356b** zu erhalten. Durch eine basische Verseifungsreaktion des Esters **356b** wurde das freie Carbonsäurederivat **611** erhalten (siehe Schema 11 B).

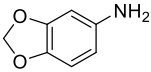
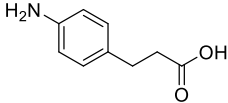
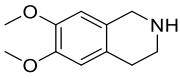
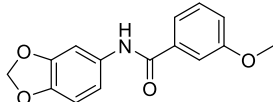
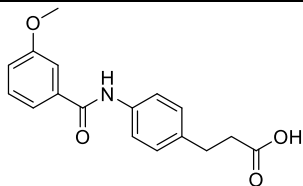
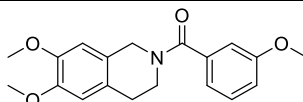


Schema 11: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen **582**, **611** und **629**. Reagenzien und Bedingungen: **(A)** (a) CHCl_3 , 3-Methoxybenzoesäure (**152**), EDC-HCl, Raumtemperatur (RT), 48 Stunden, Ausbeute: 37 %. **(B)** (a) EtOH, kat. H_2SO_4 , RT-100 °C, 20 Stunden, Ausbeute: 89 %. (b) CHCl_3 , 3-Methoxybenzoesäure (**152**), EDC-HCl, RT, 48 Stunden, Ausbeute: 80 %. (c) THF/ H_2O (1:2 V/V), LiOH, RT, 24 Stunden, Ausbeute: 92 %. **(C)** (a) CHCl_3 , 3-Methoxybenzoesäure (**152**), NEt_3 , EDC-HCl, RT, 48 Stunden, Ausbeute: 70 %.

Da die detektierten Aktivitäten der Rohprodukte aus dem Screening theoretisch als ein Artefakt aus unreaktierten Eduktmolekülen (**327**, **356** und **374**) hervorgehen könnten, wurden auch diese Edukte *in vitro* charakterisiert. Hierbei konnte für **356** und **374** sowohl im Gal4-TLX/Gal4-VP16- als auch im TLXfull/TAE-Reporterassay bis zu einer Konzentration von 100 μM keine Aktivität an TLX verzeichnet werden (siehe Tabelle 20).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: Übersicht der Aktivität an TLX der Verbindungen **327**, **356**, **374**, **582**, **611** und **629**. Alle aktiven Derivate **327**, **582**, **611** und **629** wurden ebenfalls auf einen Gal4-VP16-Effekt getestet und als aktiv an TLX klassifiziert, wenn nach statistischer Auswertung anhand eines einseitigen *Student's t-Test* die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei einer ausgewählten Konzentration im oberen Aktivitätsplateau im Vergleich zu Gal4-VP16 mit mindestens $p \leq 0,05 = *$ gegeben war. Verbindungen mit der Bedingung $0,7 < x$ -fache Reporteraktivierung $\leq 1,5$ auf Gal4-TLX/Gal4-VP16 bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Verbindungen mit einer x-fachen Reporteraktivierung $\leq 1,5$ auf TLXfull/TAE bei der angegebenen Konzentration unter Ausschluss toxischer Effekte (Renilla-Luciferase) wurden als inaktiv klassifiziert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt, n.a. = nicht analysiert.

Substanz	EC ₅₀ /IC ₅₀ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung	EC ₅₀ /IC ₅₀ im TLXfull/TAE-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung	EC ₅₀ /IC ₅₀ im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay [μ M] und max./min. x-fache Reporteraktivierung
 327	EC ₅₀ > 100 μ M	EC ₅₀ > 100 μ M	n.a.
 356	inaktiv (100 μ M)	inaktiv (100 μ M)	n.a.
 374	inaktiv (100 μ M)	inaktiv (100 μ M)	n.a.
 582	IC ₅₀ = (0,17 \pm 0,06) μ M 2,03 \pm 0,09	EC ₅₀ = (10 \pm 5) μ M 3,5 \pm 0,5	EC ₅₀ = (5,2 \pm 0,7) μ M 3,88 \pm 0,11
 611	IC ₅₀ = (22 \pm 10) μ M 2,1 \pm 0,3	EC ₅₀ = (2,4 \pm 0,6) μ M 1,96 \pm 0,08	EC ₅₀ > 100 μ M
 629	EC ₅₀ = (7 \pm 3) μ M 0,57 \pm 0,05	EC ₅₀ = (6,5 \pm 1,0) μ M 8,2 \pm 0,5	IC ₅₀ = (0,8 \pm 0,5) μ M 0,23 \pm 0,09

Nur **327** war in beiden Reporterassays mit einem EC₅₀ > 100 μ M schwach aktiv. Die Verknüpfung mit dem 3-Methoxybenzamid Strukturmotiv in **582**, **611** und **629**, führte

dagegen zu TLX-Modulatoren mit beachtlicher Potenz, wobei nur **629** in beiden zum Screening eingesetzten Reportergergenassays konsistent eine Aktivität zeigte, die dem angenommenen Profil eines TLX-Agonisten entsprach. Trotzdem wurden **582**, **611** und **629** im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reportergergenassay hinsichtlich ihrer Effekte auf die RXR α -TLX-Heterodimer-regulierte Reportergergenexpression untersucht. **611** wies eine erhöhte x-fache Reporteraktivierung auf, allerdings war das maximale Aktivitätsplateau bis 100 μ M nicht erreicht, sodass ein EC₅₀ > 100 μ M angenommen werden konnte. Auch **582** förderte die Reportergergenexpression und damit eine TLX-RXR α -Interaktion mit einem EC₅₀ = (5,2 \pm 0,7) μ M und einer maximalen x-fachen Reporteraktivierung = 3,88 \pm 0,11. **629** alleine war imstande die RXR α -TLX-Heterodimer-regulierte Reportergergenexpression herabzusetzen (IC₅₀ = (0,8 \pm 0,5) μ M, minimale x-fache Reporteraktivierung = 0,23 \pm 0,09).

Neben ihrer Aktivität in drei TLX-basierten Reportergergenassays bestätigten auch Kontrollexperimente den Ausschluss Gal4-VP16-spezifischer Effekte von **582** und **629** an TLX (siehe Abbildung 75 E und F).

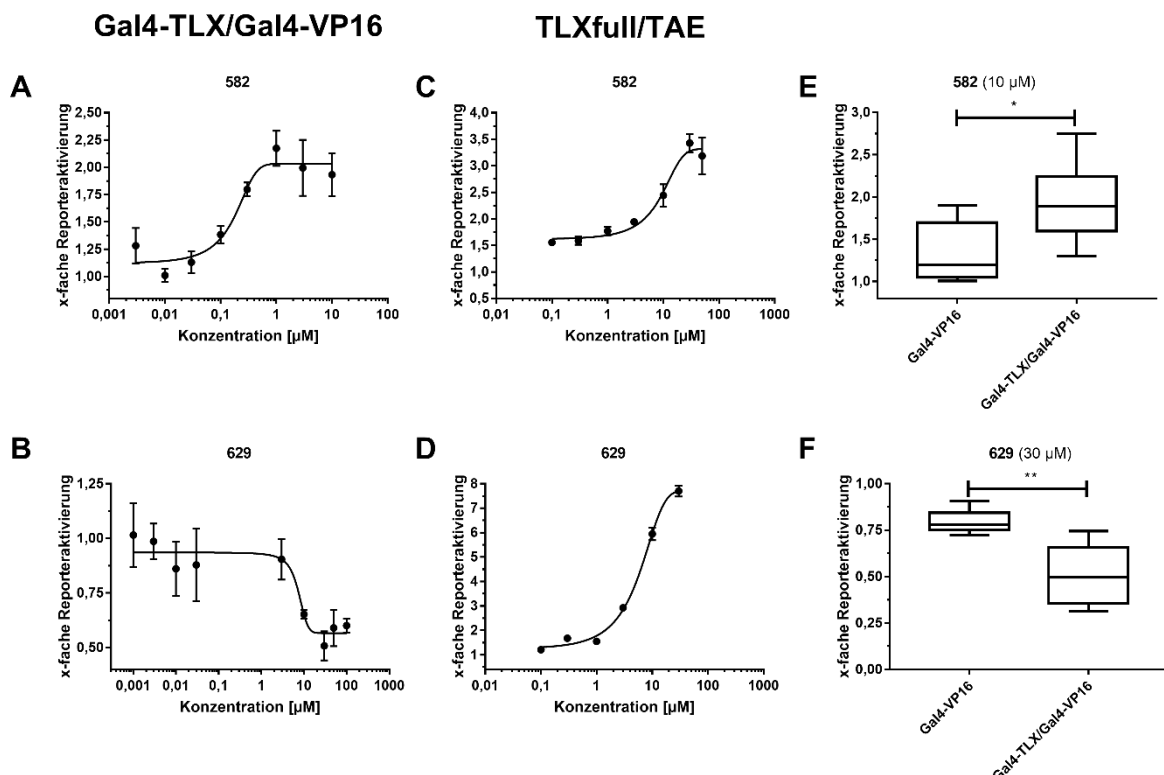


Abbildung 75: Dosis-Wirkungskurven von **582** und **629** im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reportergergenassay (A und B) und im TLXfull/TAE-Reportergergenassay (C und D). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt. Kontrollexperimente von **582** (10 μ M) und **629** (30 μ M) auf Gal4-VP16 alleine wurden durchgeführt, um unspezifische Effekte auszuschließen (E und F). Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen

Ergebnisse und Diskussion

Student's t-Test gegen die x-fache Reporteraktivierung auf Gal4-VP16 alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 = \text{n.s.}$ = nicht signifikant. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 5$ dargestellt.

Darüber hinaus wurde neben den Dosis-Wirkungskurven im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay die dazugehörigen Kontrollexperimente durchgeführt, um sowohl VP16-RXR α - als auch selektivitätsabhängige Gal4-RXR α -spezifische Effekte auszuschließen (siehe Abbildung 76). Die Kontrollexperimente zeigten, dass die beobachteten Effekte nicht über eine Modulation von RXR α vermittelt wurden (siehe Abbildung 76 C, D und E).

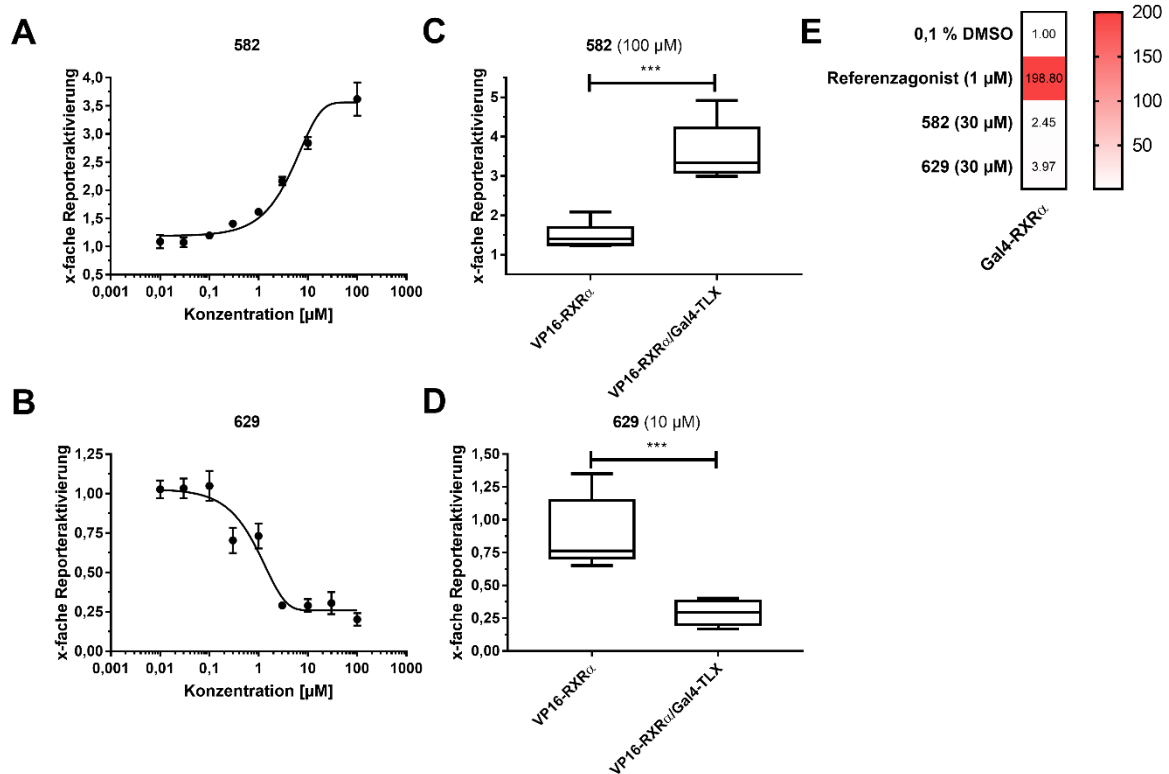


Abbildung 76: Dosis-Wirkungskurven von **582** und **629** im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay (**A** und **B**). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 3$ dargestellt. Kontrollexperimente von **582** (100 μM) und **629** (10 μM) auf Gal4-VP16 alleine wurden durchgeführt, um unspezifische Effekte auszuschließen (**C** und **D**). Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t-Test* gegen die x-fache Reporteraktivierung auf VP16-RXR α alleine analysiert, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 = \text{n.s.}$ = nicht signifikant. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n \geq 5$ dargestellt. (**E**) x-fache Reporteraktivierungen von **582** (30 μM) und **629** (30 μM) auf Gal4-RXR α . Als Positivkontrolle wurde Bexaroten (1 μM) verwendet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler mit $n = 3$ dargestellt.

Um eine direkte Interaktion an rekombinantem TLX-LBD-Protein nachzuweisen, wurde **629** in ITC-Experimenten studiert. Hierfür wurde 40 μM rekombinantes TLX-LBD-Protein in Puffer

(20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) mit **629** (100 μ M) bei 37 °C titriert. Um sonstige unspezifische Wärmeeffekte (Verdünnungswärme etc.) auszuschließen, wurden auch die entsprechenden Kontrolltitrationen (Kontrollexperiment A: Puffer (1 % DMSO) gegen **629**, Kontrollexperiment B: 40 μ M TLX-LBD-Protein (1 % DMSO) gegen Puffer (1 % DMSO)) mit den identischen Bedingungen wie im vorherigen Experiment durchgeführt. Während die Kontrolltitrationen eine exotherme Reaktion aufwiesen, zeigte das Protein-Ligand-Experiment eine endotherme Wärmerate (siehe Abbildung 77). Dieser Befund konnte daher ebenfalls als qualitativer Bindungsnachweis interpretiert werden.

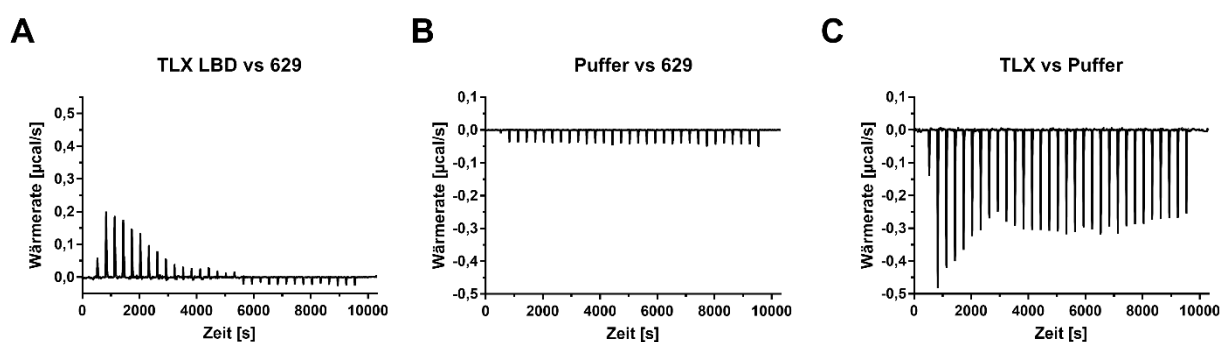


Abbildung 77: ITC-Experimente der TLX-LBD (40 μ M) mit **629** (100 μ M). (A) Dargestellt ist die Wärmerate, die bei der Zugabe von **629** (Spritze) zur TLX-LBD-Pufferlösung (Zelle) frei wird. (B) Dargestellt ist die Wärmerate, die bei der Zugabe von **629** (Spritze) zur Pufferlösung (Zelle) frei wird. (C) Dargestellt ist die Wärmerate, die bei der Zugabe von Puffer (Spritze) zur TLX-LBD-Pufferlösung (Zelle) frei wird.

Der strukturelle Vergleich der Startfragmente **34**, **39** und **47** suggerierte ein ähnliches, elektrostatisches Potential und somit einen ähnlichen Bindungsmodus an TLX. Durch einen Scaffold Hopping Ansatz konnte durch Übertragung des 3-Methoxyphenyl- und 3-Furylstrukturmotivs aus der Xanthin-SAR auf die Fragmente **39** und **47** durch Amidkupplung mit **154**, **156** und **157** potentere Verbindungen an Gal4-TLX im Vergleich zur entsprechenden Startstruktur erhalten werden. Die inaktiven Derivate **146**, **147**, **149**, **150** und **153** deuteten allerdings daraufhin, dass neben den erwähnten Strukturmotiven andere Parameter essentiell für die Aktivität an Gal4-TLX sind. 3-Methoxybenzoesäure (**152**) wurde zur Leitstrukturoptimierung unter Verwendung eines kombinatorischen, chemischen Ansatzes mit 255 Aminen im Mikromaßstab zu den entsprechenden Amidn derivatisiert. Die Charakterisierung der potentiellen Rohprodukte mit entsprechenden Aktivitätsfiltern im Gal4-TLX/Gal4-VP16- (x-fache Reporteraktivierung ≤ 1) und TLXfull/TAE-Reporterassay (x-fache Reporteraktivierung ≥ 2) lieferte mit **582**, **611** und **629** neue Leitstrukturen, die nach gezielter

chemischer Synthese und Isolierung in drei zellulären Reporterassays (Gal4-TLX/Gal4-VP16, TLXfull/TAE und VP16-RXR α /Gal4-TLX) eine Aktivität an TLX zeigten. Hierbei wurde **629** in ITC-Experimenten studiert und ein Bindungsnachweis an rekombinantem TLX-LBD-Protein konnte nachgewiesen werden. Da das Amineredukt (**374**) aus **629** bis zu 100 μ M inaktiv im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay war, wäre hier ein ähnlicher kombinatorischer, chemischer Ansatz durch Variation der Carbonsäureedukte denkbar, um einen strukturdiversen und großen chemischen Raum für eine Leitstrukturoptimierung abzudecken.

5 Zusammenfassung, Ausblick und Diskussion

5.1 Zusammenfassung und Ausblick

TLX ist als Waisenrezeptor eines der am wenigsten studierten Mitglieder der NR-Familie. Diverse Studien deuten eine Beteiligung von TLX sowohl an visuellen, neurodegenerativen, mentalen und kognitiven Erkrankungen als auch an Tumorerkrankungen an, was aus der essentiellen Rolle von TLX in der Homöostase neuronaler Stammzellen resultiert. Demnach stellt TLX aus pharmazeutischer Perspektive ein interessantes Wirkstofftarget mit einem vielversprechenden therapeutischen Potential dar. Der Mangel an validierten, kleinen organischen Molekülen als *tool compounds* limitiert jedoch die tiefgehendere Targetvalidierung^{109,119–121}. Daher ist das Interesse groß neue, potente, selektive und validierte TLX-Liganden zu entwickeln, um die pharmakologische Validierung von TLX als Wirkstofftarget zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere zelluläre Reporterassays etabliert, welche die Untersuchung der Modulation von TLX sowohl im Gal4-Hybridformat als auch als TLX-Volllängenprotein erlaubten. Die starke intrinsische Transrepressorwirkung im Gal4-Format führte zu einer bemerkenswerten Unterdrückung der basalen Reporterexpression und damit zu einem Detektionslimit modulatorischer Aktivitäten an Gal4-TLX. Dieses Detektionslimit konnte erfolgreich durch die gleichzeitige Verwendung von Gal4-VP16, einem Fusionsprotein, das als starker Transkriptionsaktivator das Gegenstück zu Gal4-TLX darstellte und die Reporterexpression induzierte, überwunden werden. Ebenfalls zeigte Gal4-TLX in Kombination mit weiteren Gal4-NRs eine Unterdrückung der Reporterexpression von Agonisten-aktivierten Gal4-NRs, was eine Aktivität von Gal4-TLX als universeller Transkriptionsrepressor andeutete. Allerdings ist die physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse fraglich, da die RE-Sequenzen von TLX und den übrigen NRs unterschiedlich sind und daher eine Interaktion unter physiologischen Bedingungen über mögliche Heterodimerisierungsmechanismen erklärbar wäre. Zusätzlich konnte durch Applikation einiger, funktionaler Gal4-TLX-Mutanten die Beteiligung bestimmter Aminosäuren in der Ligandenerkennung innerhalb einer potentiellen orthosterischen Ligandenbindetasche studiert werden. Um TLX in der nativen Form zu analysieren, wurde der TLXfull/TAE-Reporterassay eingeführt, in dem das TLX-Volllängenprotein im Vergleich zum Gal4-Hybridformat eine schwache Transaktivatorwirkung des Reportergens durch Bindung

des TAE-REs aufwies. Ergänzend dazu konnte im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reportergenassay eine Reportermodulation, welche auf einen bisher unbekanntem Heterodimerisierungsmechanismus der RXR α - und TLX-LBDs zurückzuführen ist, etabliert werden (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht der eingeführten Reporterassays zur Aktivitätsstudie von TLX. Alle Gal4-Hybridassays wurden mit pFR-Luc, pRL-SV40 und den entsprechenden Plasmiden in HEK293T-Zellen durchgeführt. Der TLX-Volllängen-Reporterassay wurde mit pFR-TAE-Luc und pRL-SV40 in HEK293T-Zellen durchgeführt.

Assayformat	Plasmidkonstrukte	Fusionsprotein	Vorteil	Nachteil
Gal4-Hybrid	pFA-CMV-TLX/pECE-SV40-Gal4-VP16	Gal4-TLX/Gal4-VP16	<ul style="list-style-type: none"> • primäre Screeningplattform zur Identifizierung potentieller Agonisten und inverser Agonisten • Effekte durch potentielle TLX-Oligomere observierbar • Untersuchung von TLX in Kombinationen mit anderen NRs 	<ul style="list-style-type: none"> • artifizieller Charakter aufgrund der Gal4-DBD
	pFA-CMV-TLX _{A189E} oder pFA-CMV-TLX _{F226W I230E} /pECE-SV40-Gal4-VP16	Gal4-TLX _{A189E} oder Gal4-TLX _{F226W I230E} /Gal4-VP16	<ul style="list-style-type: none"> • Untersuchung einer potentiellen Bindungstasche • Effekte durch potentielle TLX-Oligomere observierbar 	
	pFTI-CMV-VP16-RXR α /pFA-CMV-TLX	VP16-RXR α /Gal4-TLX	<ul style="list-style-type: none"> • Untersuchung von Heterodimerisierungseffekten 	
Volllängenprotein	pFA-CMV-TLXfull	Wildtyp TLX DBD und LBD bindet an TAE-RE	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivitätsuntersuchung von Liganden an TLX-Volllängenprotein unter natürlicheren Konditionen 	<ul style="list-style-type: none"> • nur TLX-Monomer-abhängige Effekte studierbar

Die publizierten Aktivitäten der Referenzliganden ccrp1 (**1**), ccrp2 (**2**), ccrp3 (**3**), BMS453 (**7**) und ATRAL (**8**) konnten im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay nicht für alle Verbindungen reproduziert werden, was deren Einsatz als *tool compounds* in Frage stellt. Ein möglicher Grund könnte die Verwendung der verschiedenen Reporterassays sein, die andere Plasmidkonstrukte in anderen Zelllinien beinhalten. Nur für ccrp2 (**2**) konnte im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay und anhand von zellfreien Experimenten (HTRF, NMR und DSF) eine Interaktion mit der TLX-LBD festgestellt werden.

Ein primäres Aktivitätsscreening der Prestwick-Wirkstofffragment-Bibliothek unter Verwendung des Gal4-TLX/Gal4-VP16 Reporterassays identifizierte 24 Fragmente (**26-49**) (24/480, 5 % Hit-Rate) als potentielle TLX-Agonisten bzw. inverse Agonisten. Eine Hit-Validierung durch Reproduktion der Aktivitäten aus dem primären Screening reduzierte die Zahl auf 17 Kandidaten (17/480, 4 % Hit-Rate). Ein darauffolgendes Aktivitätsscreening ausgewählter, strukturähnlicher Arzneistoffe im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay ermöglichte ausgehend von 03A02 (**34**) die Charakterisierung von Koffein (**55**) als inversen TLX-Agonisten und ausgehend von 01E04 (**30**) Propranolol (**54**) als TLX-Agonisten. Beide Strukturklassen wurden im Rahmen einer systematischen Struktur-Wirkungs-Beziehungs-Studie sowohl in zellulären Reporterassays als auch an zellfreiem, rekombinantem TLX-LBD-Protein analysiert. Darüber hinaus resultierten anhand der Startfragmente 06A05 (**45**) und 04E11 (**39**), 06D02 (**47**) ebenfalls zwei unabhängige Projekte zur Darstellung neuartiger TLX-Modulatoren (siehe Abbildung 78).

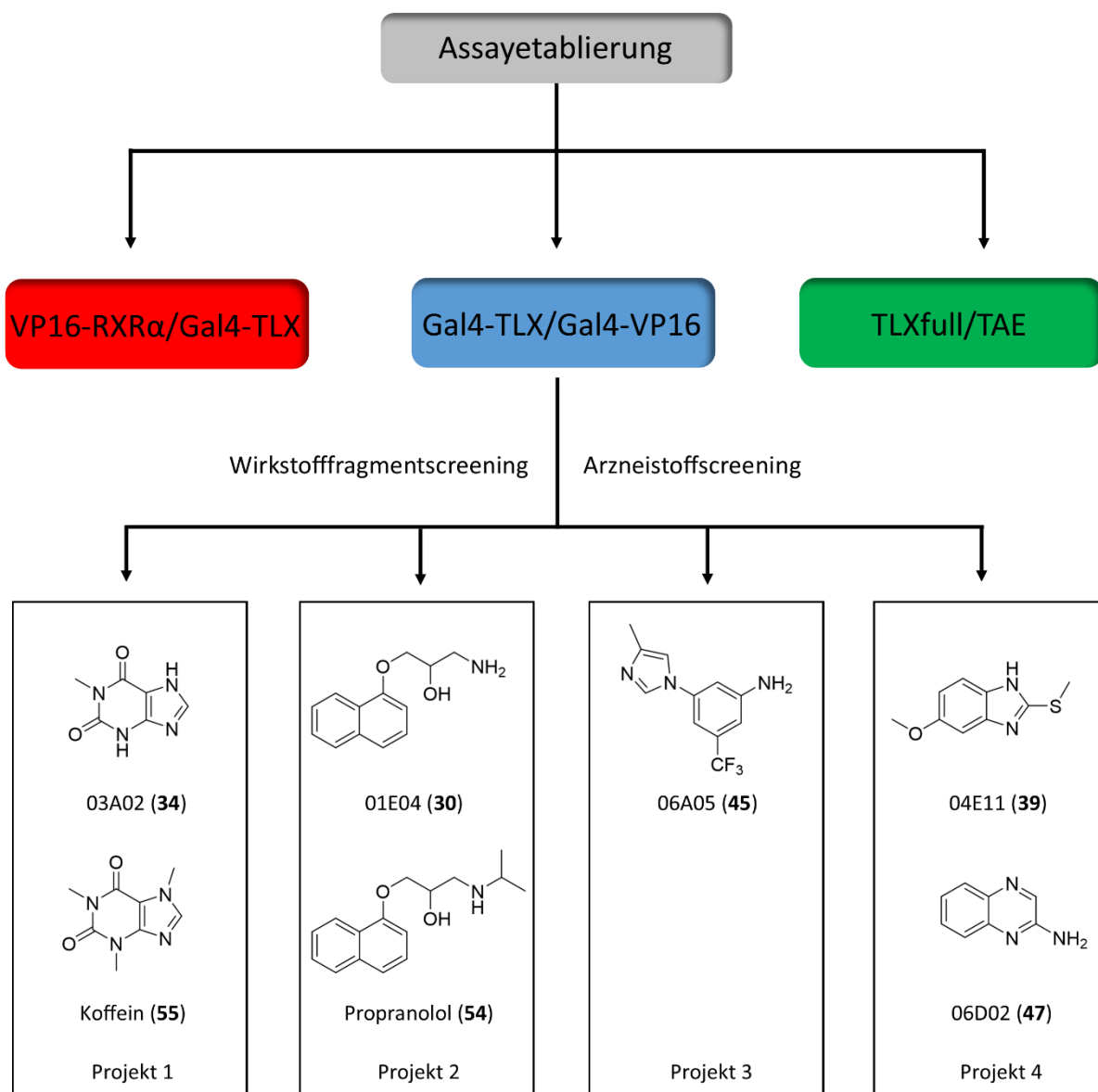


Abbildung 78: Übersicht der Projekte ausgehend von der Assay etablierung und dem Wirkstofffragment- bzw. Arzneistoffscreening.

Projekt 1 begann mit der Identifizierung des Wirkstofffragments 03A02 (34) als inversen TLX-Agonisten mit einem moderaten $IC_{50} = (9 \pm 3) \mu M$ (siehe Abbildung 79).

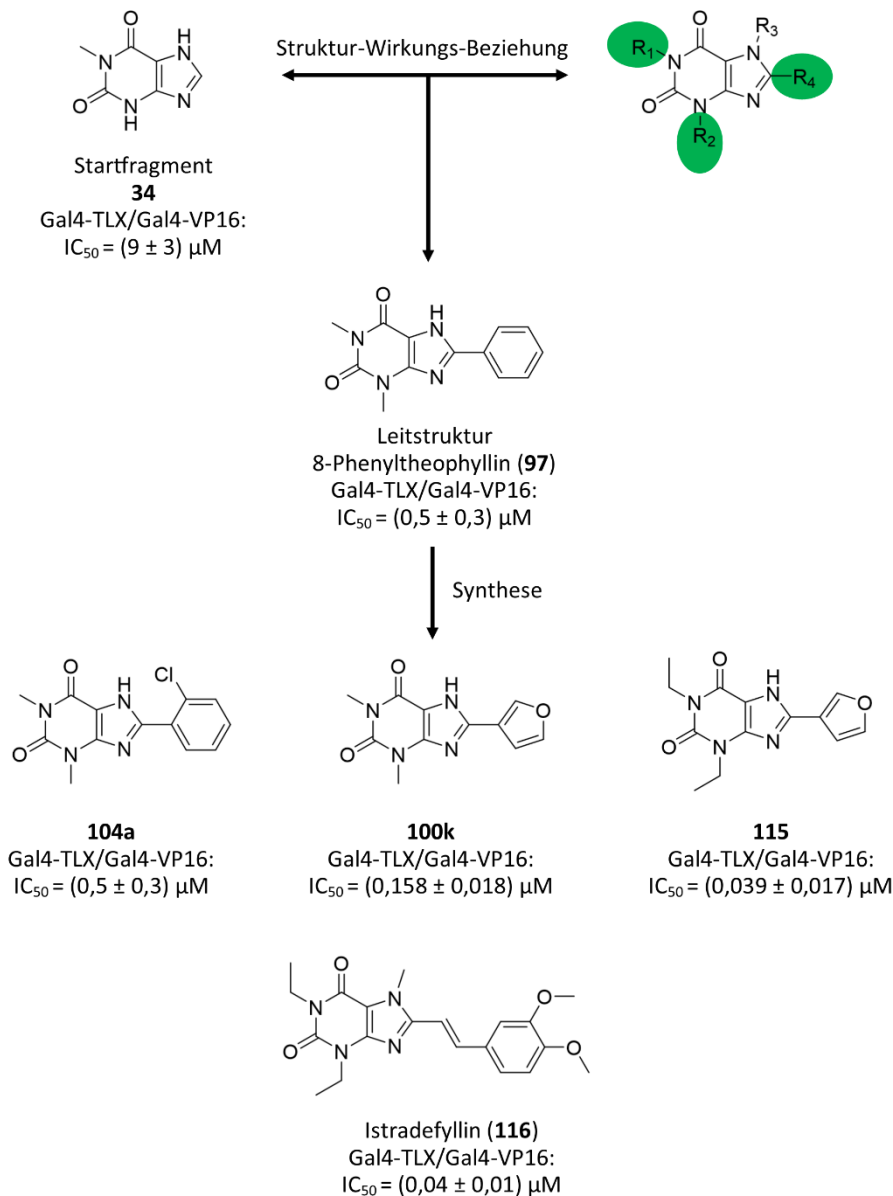


Abbildung 79: Übersicht und Meilensteine der Xanthinderivate als inverse TLX-Agonisten. Essentielle Substitutionspositionen (R^1 , R^2 und R^4) für eine Aktivität an Gal4-TLX sind grün hervorgehoben.

Durch eine vorläufige Struktur-Wirkungs-Beziehungs-Untersuchung des Xanthingerüsts konnte das Alkylierungsmuster an Position 1 (R^1) und 3 (R^2) und ein 8-Phenylsubstituent an R^4 als essentielle Struktur motive für eine hohe Aktivität an Gal4-TLX charakterisiert werden (siehe Abbildung 79, grün markiert). Somit diente 8-Phenyltheophyllin (**97**) mit einem $IC_{50} = (0,5 \pm 0,3) \mu\text{M}$ im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay als neue Leitstruktur. Die weitere Identifizierung von Istradefyllin (**116**) ($IC_{50} = (0,04 \pm 0,01) \mu\text{M}$) und die systematische Struktur-Wirkungs-Beziehungs-Studie des 8-Phenylsubstituenten an 8-Phenyltheophyllin (**97**) lieferte mit **104a** ($IC_{50} = (0,5 \pm 0,3) \mu\text{M}$) und den 3-Furylanaloga **100k** ($IC_{50} = (0,158 \pm 0,018) \mu\text{M}$), **115** ($IC_{50} = (0,039 \pm 0,017) \mu\text{M}$) potente, inverse TLX-Agonisten. Alle studierten Xanthinderivate

zeigten keine Aktivität am TLX-Volllängenprotein im TLXfull/TAE-Reporterassay, was darauf hindeutet, dass sich die xanthinvermittelte TLX-Modulation möglicherweise nicht über TLX-Monomere entfalten kann, wie sie im TLXfull/TAE-Reporterassay vorliegen, und dass stattdessen TLX-Oligomere eine tragende Rolle spielen. Die Aktivitätsuntersuchung von Koffein (**55**), **100k**, **104a** und Istradefyllin (**116**) an den Gal4-TLX_{A189E}- und Gal4-TLX_{F226W|I230E}-Mutanten deuteten durch eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve im Vergleich zum Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay auf die Beteiligung von F226 und I230 auf die Xanthinerkennung hin, sodass eine potentielle, orthosterische Bindungstasche vermutet werden konnte. Diese Hypothese kann jedoch nur durch eine Kristallstrukturaufklärung unter Verwendung der Xanthine abschließend aufgeklärt werden. Die Beteiligung ADOR-vermittelter Effekte in den zellulären Assays konnte sowohl durch die Inaktivität von Adenosin (**81**) und cAMP (**82**) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay als auch durch negative Konkurrenzexperimente von Adenosin (**81**) mit den entsprechenden Xanthinderivaten weitgehend ausgeschlossen werden. PDE-vermittelte Effekte wurden nicht untersucht, sodass ein Beitrag in der Reporteraktivierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Anhand fünf orthogonaler Experimente an rekombinantem TLX-LBD-Protein (NMR, ITC, HTRF-basierte Modulation von TLX-Homodimeren und RXR α -TLX-Heterodimeren, TLX-SMRT-Modulation durch Istradefyllin (**116**)) zeigten die Xanthinderivate eine direkte Interaktion mit der TLX-LBD. Die HTRF-basierte TLX-Coregulatorrekrutierung zeigte, dass TLX in der Lage ist mit dem Atroboxpeptid, NCoR und SMRT zu interagieren. In diesem Zusammenhang konnte nur für Istradefyllin (**116**) eine Modulation der TLX-SMRT-Wechselwirkung im Vergleich zu *ccrp2* (**2**) detektiert werden. Darüber hinaus konnten erhöhte HTRF-Signale für die TLX-D11-FXXLF, TLX-ARA70, TLX-PRIPPRAP250 und TLX-RIP140L8 Interaktion detektiert werden, welche aber im Rahmen der bisherigen Kooperationsarbeit in Abhängigkeit der Xanthinliganden nicht tiefergehend untersucht wurden. Zusammenfassend konnte die Strukturklasse der Xanthine als inverse TLX-Agonisten identifiziert werden und somit für zukünftige TLX-Target-Validierungsstudien als *tool compounds* dienen. Allerdings sollte hierbei die Aktivität an den übrigen Targets (ADORs und PDEs) berücksichtigt werden und nach Möglichkeit ADOR- bzw. PDE-vermittelte Effekte ausgeschlossen werden. Da die SAR-Studien der Xanthine an ADORs bzw. PDEs relativ umfangreich sind, wäre hier die selektive Testung inaktiver Xanthine an ADORs und PDEs an TLX sinnvoll, um die bisherigen Ergebnisse zu validieren.

Projekt 2 umfasste die Identifizierung der TLX-Agonisten 01E04 (**30**) und Propranolol (**54**) (siehe Abbildung 80).

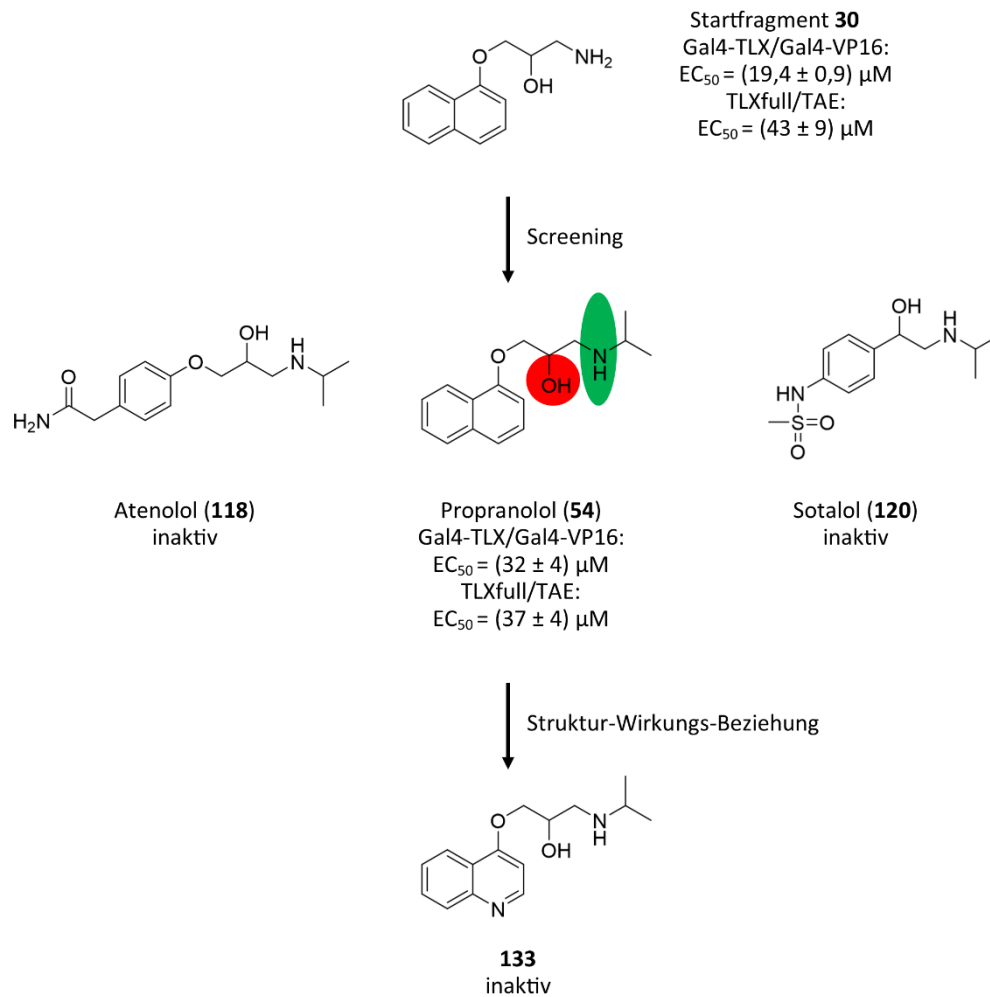


Abbildung 80: Propranolol (**54**) als TLX-Agonist. Die essentielle Substitutionsposition für eine Aktivität an TLX ist grün markiert, während die nicht essentielle Hydroxygruppe rot markiert ist.

Beide Verbindungen zeigten im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay eine Verstärkung der transrepressorischen Wirkung von Gal4-TLX, während im TLXfull/TAE-Reporterassay eine Verstärkung der Transaktivatorwirkung des TLX-Vollängenproteins detektiert werden konnte. Zusätzlich wurden Atenolol (**118**) und Sotalol (**120**) als inaktive Strukturanaloga in beiden Reporterassays, welche als wertvolle Negativkontrollen in zellulären Experimenten dienen, charakterisiert. Ein Bindungsnachweis über ITC-Experimente an rekombinantem TLX-LBD-Protein, die Modulation der TLX-Zielgene PTEN, TET3, SIRT1 und erste vielversprechende Selektivitätsstudien innerhalb der NR-Familie durch Propranolol (**54**) motivierten zu einer systematischen Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Propranolol (**54**). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Hydroxygruppe (siehe Abbildung 80, rot markiert) im

Gegensatz zur sekundären Aminofunktion (siehe Abbildung 80, grün markiert) kein essentielles Strukturmerkmal für eine Aktivität an TLX darstellte. Gleichzeitig konnte mit der Substitution des Naphthalens durch ein Chinolin ein strukturähnliches, inaktives Derivat (**133**) zu Propranolol (**54**) generiert werden. Abschließend wurde Propranolol (**54**) im Vergleich zu den inaktiven Analoga Atenolol (**118**), Sotalol (**120**) und **133** in Zellviabilitäts- und Migrationsassays in T98G-Zellen studiert, in denen nur für Propranolol (**54**) leichte, zytotoxische Effekte und starke, anti-migratorische Effekte beobachtet werden konnten. Propranolol (**54**) stellt somit ebenfalls eine attraktive Leitstruktur zur TLX-Ligandenoptimierung dar.

Im Rahmen von Projekt 3 wurde der TLX-Agonist 06A05 (**45**) identifiziert. Ein ligandenbasierter Pharmakophorvergleich mit dem Referenzliganden ccrp2 (**2**) suggerierte einen ähnlichen Bindungsmodus (siehe Abbildung 81).

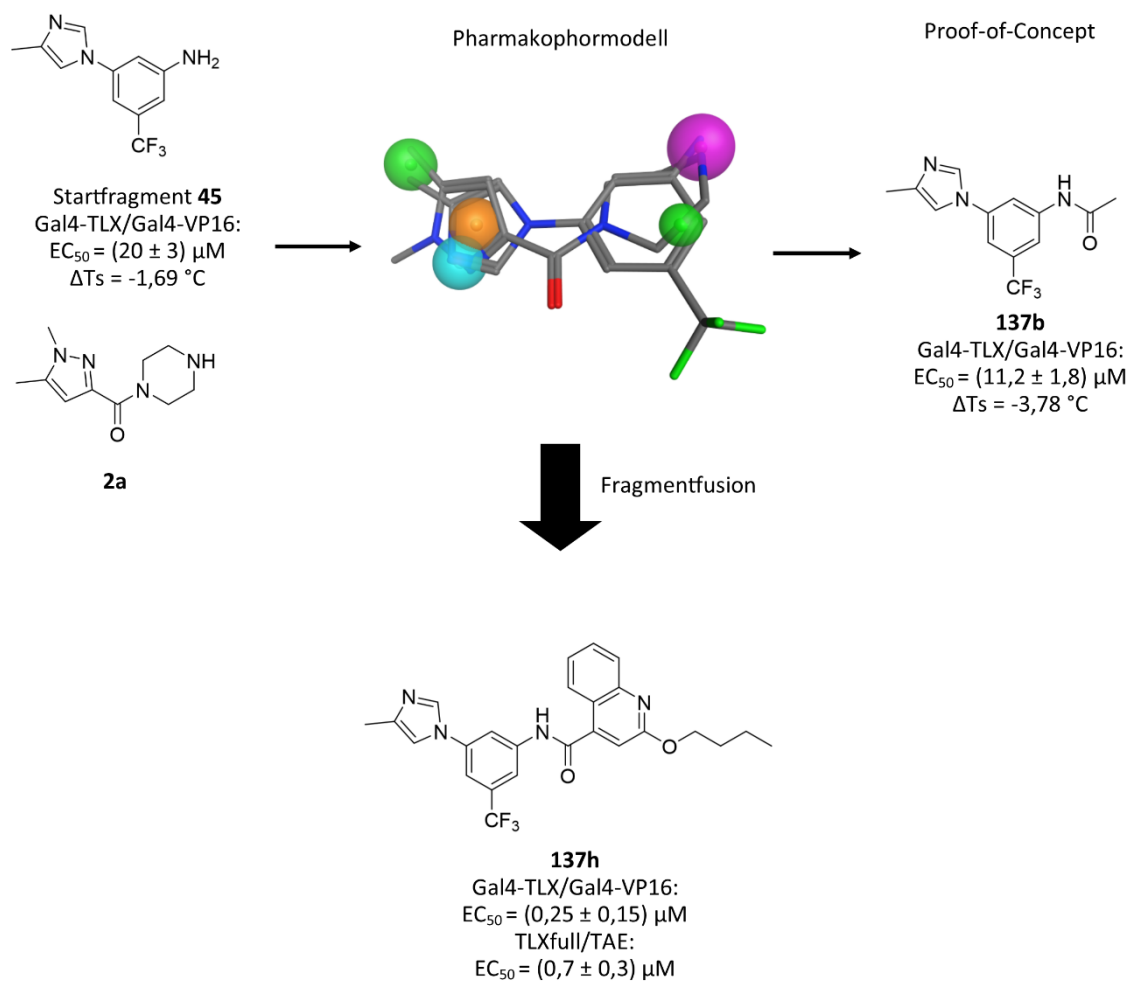


Abbildung 81: Übersicht und Meilensteine zur Generierung von **137h** als potenter neuartiger TLX-Agonist.

Die Acetylierung von **45** resultierend im Derivat **137b** zeigte sowohl eine Potenzverbesserung im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay als auch eine stärkere, negative Proteinschmelzpunktverschiebung im DSF-Experiment im Vergleich zur Startstruktur **45** und dem Referenzliganden ccrp2 (**2**), sodass die Derivatisierungsstrategie über Amidkupplung als Proof-of-Concept gewährleistet wurde. Folglich wurde **45** im Rahmen einer Struktur-Wirkungs-Beziehungs-Studie an der aromatischen Aminofunktion durch Amidkupplung mit weiteren Wirkstofffragmenten, die TLX-Agonisten darstellten, fusioniert. Hierbei konnte **137h** als potentester Kandidat synthetisiert werden, welcher darüber hinaus eine deutliche Aktivitätspräferenz an Gal4-TLX im Vergleich zu übrigen Gal4-NRs aufwies. Zusätzlich konnte für **137h** mittels ITC-Experimenten und durch Modulation von TLX-Homodimerisierungseffekten im HTRF-Format eine direkte Interaktion an rekombinatem TLX-LBD-Protein nachgewiesen werden. **137h** wies im Vergleich zu den Referenzliganden ccrp2 (**2**) und BMS453 (**7**) im WST-Assay in HEK293T-Zellen geringere toxische Effekte auf. Zudem ragte **137h** im Vergleich zu ccrp2 (**2**) durch höhere mikrosomale Stabilität heraus, während das Löslichkeitsprofil vergleichbar zu dem von ccrp2 (**2**) und zugleich besser als von BMS453 (**7**) war. In der gesamten Betrachtung übertraf **137h** damit die bisherigen Referenzliganden ccrp2 (**2**) und BMS453 (**7**) und ermöglicht eine vielversprechende Einsatzmöglichkeit als *tool compound* für eine TLX-Targetvalidierung.

Projekt 4 wurde anhand der strukturellen Ähnlichkeit der Startfragmente 04E11 (**39**) und 06D02 (**47**) mit dem Xanthinderivat **34** entworfen (siehe Abbildung 82).

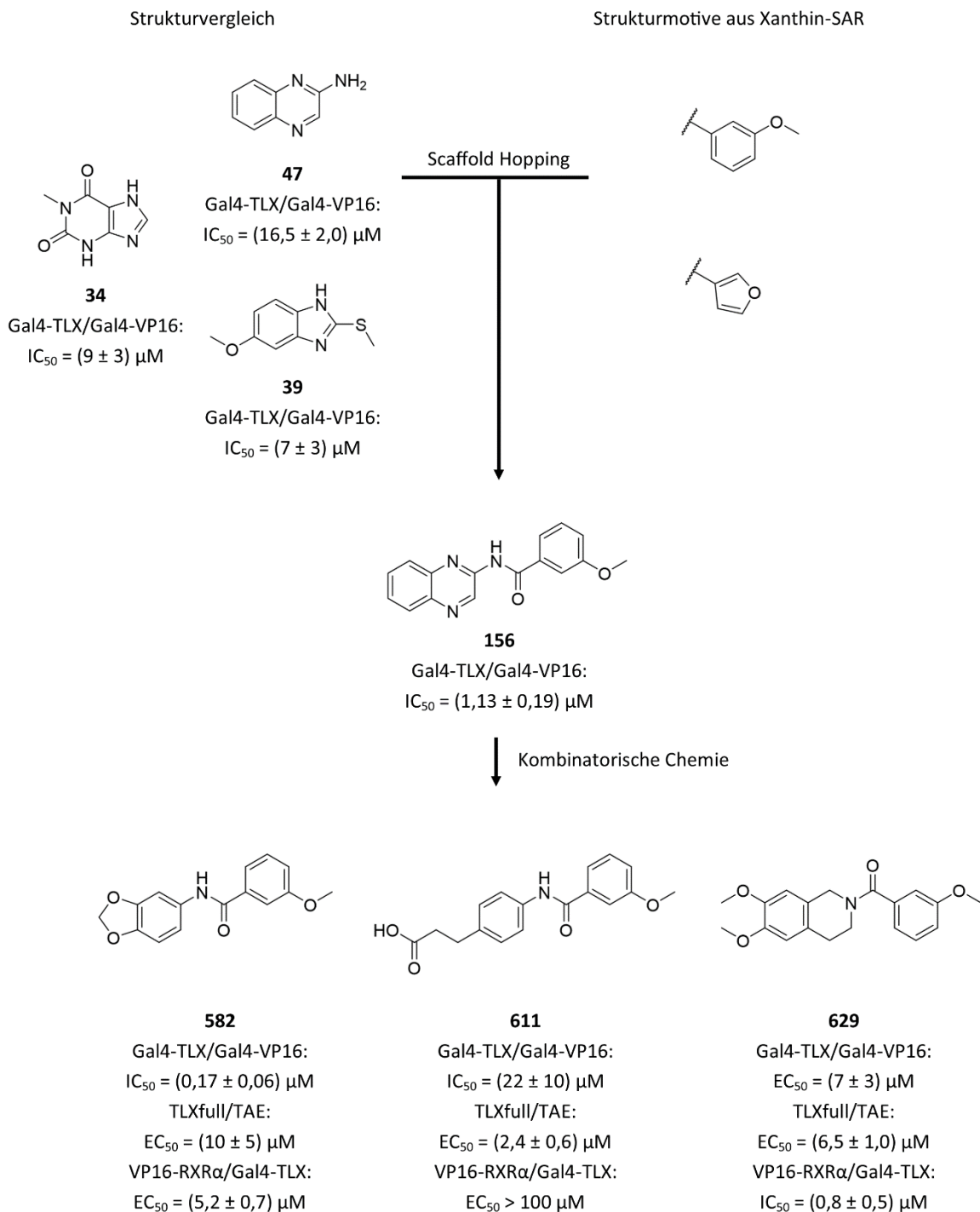


Abbildung 82: Übersicht und Meilensteine des Scaffold Hopping Ansatzes und darauffolgender kombinatorischer Chemie zur Darstellung neuartiger TLX-Modulatoren **582**, **611** und **629**.

Hierbei wurde durch einen Scaffold Hopping Ansatz das 3-Methoxyphenyl- und 3-Furylstrukturmotiv (basierend auf der Xanthin-SAR) auf die Fragmente **39** und **47** übertragen. Derivat **156** resultierte im Vergleich zum Startfragment **47** mit einer verbesserten Potenz um

Faktor ≈ 15 . Aus diesem Grund wurde die 3-Methoxybenzoesäure (**152**) im Rahmen eines kombinatorisch-synthetischen Ansatzes mit 255 primären und sekundären Aminen derivatisiert. Die *in vitro* Aktivitätstestung der potentiellen 255 Amidprodukte im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay lieferte zahlreiche Treffer, welche durch Anwendung von Aktivitätsfilter auf die potentiellen Zielverbindungen **582**, **611** und **629** reduziert wurden. Die anschließende chemische Synthese und Isolierung von **582**, **611** und **629** und Aktivitätstestung im Gal4-TLX/Gal4-VP16-, TLXfull/TAE- und VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay zeigte in allen drei zellulären Systemen modulatorische Effekte an TLX. Zusätzlich wurde für **629**, welches in der Gesamtheit der Reporterassays die höchste Potenz aufwies, ein direkter Bindungsnachweis an rekombinantem TLX-LBD-Protein mittels ITC-Experimenten gezeigt. Somit konnten neuartige TLX-Modulatoren dargestellt werden, die für zukünftige Leitstrukturoptimierungen einen vielversprechenden Startpunkt bieten. Mit Hinblick zur Entwicklung neuartiger TLX-Modulatoren ist ebenfalls eine Umkehrung des kombinatorischen Ansatzes denkbar, in dem die Aminatedukte **327** aus **582**, **356** aus **611** und **374** aus **629** mit strukturdiversen Carbonsäuren funktionalisiert werden.

5.2 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte der Waisenrezeptor TLX mit Hilfe diverser orthogonaler Experimente studiert werden. Die bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten bestätigten, dass TLX durch kleine organische Moleküle moduliert werden kann und deuteten komplexe Gleichgewichte zwischen TLX-Homodimeren, RXR α -TLX-Heterodimeren und TLX-Coregulatorkomplexen als wichtige Interaktionsschritte der TLX-Modulation an.

Sehr auffällig war, dass TLX in Abhängigkeit der fusionierten DBDs (Gal4-DBD oder native TLX-DBD) und dem Reporter gen vorgeschalteten Responseelement (Gal4-RE oder TAE-Sequenz) eine veränderte, konstitutive Aktivität aufweist, was möglicherweise auf das unterschiedliche Responseelement zurückzuführen ist. Wichtig in diesem Kontext wird die weitere Analyse des TLX-Coregulatorrekrutierungsprofils in Abhängigkeit der verschiedenen Modulatoren sein. Denkbar wären auch erste *in vivo* Applikationen in Mausstudien nach umfassender Bestimmung und Optimierung der ADMET-Parameter (engl. *administration, distribution, metabolism, excretion, toxicity*, ADMET) der dargestellten *tool compounds*.

Die Analyse des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten rekombinanten TLX-LBD-Proteins anhand massenspektrometrischer Untersuchung und SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) zeigte, dass die rekombinant exprimierte TLX-LBD in monomerer Form vorlag (siehe Anhang 3 und 4). Die positiven Bindungsnachweise mittels ITC-Experimenten für **54**, **115** (stellvertretend für die restlichen Xanthinderivate), **137h** und **629** an rekombinantem TLX-LBD-Protein deuteten darauf hin, dass der Startpunkt der TLX-Signalkaskade möglicherweise eine initiiierende Bindung an monomerem TLX ist (siehe Abbildung 83).

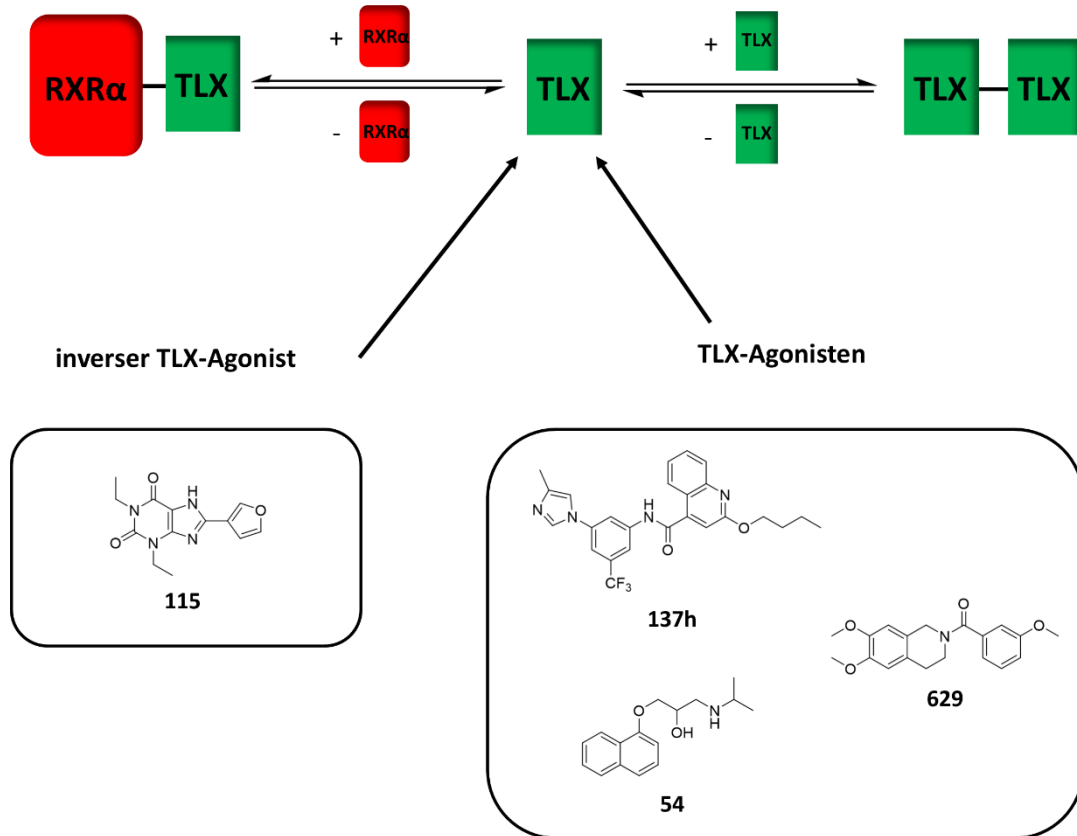


Abbildung 83: Postuliertes, dynamisches Gleichgewicht von TLX-Homodimeren und RXR α -TLX-Heterodimeren. TLX-Liganden **115**, **137h**, **54** und **629** beginnen höchstwahrscheinlich die TLX-Signalkaskade durch Bindung an monomeres TLX.

Für die TLX-Agonisten **54**, **137h** und **629** konnte die hypothetische Rolle eines TLX-Agonisten, welche zu Beginn dieser Arbeit postuliert wurde, erfolgreich bestätigt werden (siehe Kapitel 4.1.8). Demnach verstärkten **54**, **137h** und **629** die Transrepressorwirkung von Gal4-TLX im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay, während im TLXfull/TAE-Reporterassay die schwache Transaktivatorwirkung des TLX-Vollängenproteins ligandenabhängig verstärkt wurde. Nur die Xanthinderivate erfüllten nicht in vollständiger Weise die Rolle eines inversen Agonisten. Zwar konnte im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay die Transrepressorwirkung von Gal4-TLX partiell aufgehoben werden, allerdings konnte trotz mittels ITC nachgewiesener Bindung an die TLX-LBD im TLXfull/TAE-Reporterassay keine Verminderung des Reportersignals detektiert werden. Dieser Befund ließ vermuten, dass die xanthinvermittelte TLX-Modulation nicht über TLX-Monomere abläuft und daher noch andere komplexe Mechanismen involviert sein könnten. Tatsächlich konnte in HTRF-basierten TLX-Homodimerisierungs- und RXR α -TLX-Heterodimerisierungsstudien eine xanthinabhängige Modulation dieser Gleichgewichte detektiert werden. Ebenfalls konnte für **137h** anhand von

HTRF-basierten Experimenten eine Modulation der TLX-Homodimerisierung beobachtet werden. Bemerkenswert waren die relativ großen Enthalpieänderungen in den ITC-Experimenten unter Verwendung der Xanthine und **137h**, die möglicherweise in Folge einer ligandenstimulierten Konformationsänderung von TLX die Homodimerisierung begünstigten. Zusätzlich ist anzunehmen, dass das Coregulatorrekrutierungsprofil von TLX eine zentrale Rolle in der Modulation spielt. Hierbei konnte nur für Istradefyllin (**116**) eine ligandenabhängige Modulation der TLX-SMRT-Interaktionen detektiert werden, während die TLX-Atrobox bzw. TLX-NCoR-Wechselwirkung durch die Xanthine keine signifikanten Effekte zeigte. Die weiterführende Untersuchung des TLX-Coregulatorrekrutierungsprofils in Abhängigkeit der generierten *tool compounds* wird ein essentieller Schritt sein, um neue mechanistische Einblicke von TLX zu gewinnen.

Die Entdeckung der TLX-Modulation durch die Strukturklasse der Xanthine gibt möglicherweise einen neuen Anhaltspunkt für die Erklärung der pharmakologischen Effekte von Koffein (**55**) und Istradefyllin (**116**) wieder. So ist für Koffein (**55**) ein protektiver Effekt gegen Alzheimer in Mausstudien bekannt^{192,193}. Außerdem wird eine erhöhte Koffeineinnahme mit einem verminderten Risiko einer Parkinson Erkrankung assoziiert^{194–196}. Die gute Permeabilitätskapazität der Blut-Hirn-Schranke seitens Koffein (**55**) schließt somit die Adressierung von TLX unter physiologischen Bedingungen nicht aus und bestärkt die potentielle Beteiligung von TLX in diesen protektiven Effekten¹⁹⁷. Ähnliche Tendenzen sind für Istradefyllin (**116**), welches aktuell als A_{2A}-Rezeptorantagonist als Zusatzbehandlung in der Parkinson Erkrankung Anwendung findet, bekannt^{164,198}. Eine Studie in Mäusen konnte zeigen, dass die Behandlung mit Istradefyllin (**116**) mit verminderten Gedächtnisdefiziten einhergeht¹⁹⁹.

Auch die Entdeckung von Propranolol (**54**) als TLX-Agonist weist auf einen möglichen, neuen Erklärungsansatz beobachteter pharmakologischer Effekte in Bezug auf die Parkinson Erkrankung hin, die bisher auf die Blockade von β -Adrenorezeptoren zurückzuführen sind²⁰⁰. Bekannt ist, dass durch Behandlung mit Propranolol (**54**) Verbesserungen von Tremorzuständen erzielt werden konnten^{201–203}. In diesem Kontext ist für den TLX-Agonisten Propranolol (**54**) im Vergleich zum inaktiven TLX-Derivat Atenolol (**118**) eine gute Permeabilitätskapazität der Blut-Hirn-Schranke bekannt, sodass es zu einer Akkumulation von Propranolol (**54**) in diversen Hirnarealen kommen kann^{204,205}. Darüber hinaus weisen

Untersuchungen auf anti-proliferative Effekte von Propranolol (**54**) in der Gehirntumorgenese hin^{206,207}. Ein möglicher Signalweg wird über eine verminderte MMP-9 Ausschüttung nach Behandlung mit Propranolol (**54**) diskutiert²⁰⁸. MMP-9, welches durch einen TLX-Knockdown verminderte Expressionslevel aufwies, stellt ein TLX-Zielgen dar, welches eine tragende Rolle in der Invasion und Metastasierung von Gehirntumoren spielt¹⁰³.

Zusammenfassend leistet diese Arbeit durch die Identifikation und breite Charakterisierung mehrerer neuartiger TLX-Liganden-Chemotypen als potentielle *tool compounds* einen Beitrag zum Fortschreiten der Validierung von TLX als vielversprechendes Wirkstofftarget. Die entwickelten TLX-Modulatoren werden helfen das funktionelle Verständnis des Waisenrezeptors TLX zu verbessern und bieten eine wertvolle chemische Startmaterie zur Entwicklung von potenten und selektiven TLX-Liganden als mögliche Wirkstoffe der Zukunft.

6 Experimenteller Teil

6.1 Biochemische und biophysikalische Methoden

6.1.1 Kultivierung von HEK293T- und T98G-Zellen

HEK293T- (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ) und T98G-(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) Zellen wurden in separaten Zellkulturflaschen in Dulbeccos modifiziertem Eagles Medium (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) unter Glucosezusatz mit 10 % fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS), Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

6.1.2 Plasmidkonstrukte

Als Reporterplasmid für die Hybridreportergenassays wurde pFR-Luc (Stratagene, San Diego, CA, USA) verwendet, während pRL-SV40 (Promega, Fitchburg, WI, USA) zu Normierungszwecken des Reportersignals und zur Abschätzung sowohl der Transfektionseffizienz als auch von toxischen Effekten angewendet wurde. pECE-SV40-Gal4-VP16 (Addgene # 71728; RRID:Addgene_71728; Addgene, Watertown, MA, USA)¹³⁵ wurde freundlicherweise von Lea Sistonen (Institut für Biowissenschaften, Åbo Akademi Universität, Turku, Finnland; Turku Zentrum für Biotechnologie, Universität Turku, Åbo Akademi Universität, Turku, Finnland) erhalten und zur Expression von Gal4-VP16 als starker Transkriptionsaktivator verwendet. Die Gal4-basierten Hybridkonstrukte der humanen NR-LBD wurden durch Insertion der entsprechenden kodierenden DNA-Sequenz inklusive Linker in pFA-CMV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) hergestellt. pFA-CMV-TLX (NR2E1; uniprot Eintrag: Q9Y466-1; Aminosäuren: 150-385) wurde durch Insertion eines cDNA Fragments, welches mit Hilfe von PCR-Vervielfältigung (TLX BC028031.1, erworben als I.M.A.G.E. cDNA Klon #5242079 von BioScience, Nottingham, Vereinigtes Königreich) erhalten wurde, zwischen den KpnI und BamHI Restriktionsstellen des pFA-CMV Vektors (Stratagene, San Diego, CA, USA) konstruiert. Entsprechende TLX-Mutanten wurden durch zielgerichtete Mutagenese unter Verwendung einer Q5 *high fidelity* Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) generiert. Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung der gesamten Gal4-TLX-ORF (engl. *open reading frame*, ORF) verifiziert. Die Konstruktion von pFA-CMV-CAR²⁰⁹, pFA-CMV-FXR²¹⁰, pFA-CMV-HNF4α²¹¹, pFA-CMV-LRH-1, pFA-CMV-LXRα²¹⁰, pFA-CMV-LXRβ²¹⁰,

pFA-CMV-NOR-1²¹², pFA-CMV-Nurr1²¹², pFA-CMV-Nurr77²¹², pFA-CMV-PPAR α ²¹³, pFA-CMV-PPAR γ ²¹³, pFA-CMV-PPAR δ ²¹³, pFA-CMV-RAR α ²⁰⁹, pFA-CMV-RAR β ²⁰⁹, pFA-CMV-RAR γ ²⁰⁹, pFA-CMV-ROR α ²¹⁴, pFA-CMV-RXR α ²⁰⁹, pFA-CMV-RXR β ²⁰⁹, pFA-CMV-RXR γ ²⁰⁹, pFA-CMV-PXR²⁰⁹, pFA-CMV-THR α ²¹⁵, pFA-CMV-TR2, pFA-CMV-TR4 und pFA-CMV-VDR²⁰⁹ wurden zum Teil bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben.

Um eine RXR α -TLX-Heterodimer-vermittelte Reportermodulation in einem zellulären Assay zu untersuchen, war ein RXR α -Konstrukt notwendig, welches unter Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie nicht das Gal4-RE erkennen konnte. Zu diesem Zweck wurde die Gal4-DBD-kodierende Sequenz in pFA-CMV durch eine entsprechende VP16-kodierende Sequenz (uniprot Eintrag: P06492; Aminosäuren: 413-490) gefolgt von einem Glycin-Serin-Linker ersetzt. Das resultierende Plasmidkonstrukt wurde pFTI-CMV (engl. *fusion trans-inducing factor plasmid*, FTI) genannt. Mit Hilfe eines isothermalen Zusammenbaus nach Gibson wurde die RXR α -DNA-Sequenz (Aminosäuren: 225-462) zwischen den BamHI und XbaI Restriktionsstellen innerhalb der ursprünglichen MCS (engl. *multiple cloning site*, MCS) eingefügt. Das resultierende Plasmidkonstrukt pFTI-CMV-VP16-RXR α -LBD ist somit in der Lage das Fusionsprotein MDYKDDVAST-[VP16-(aa 413-490)]-SSGGGGSSGGS-[RXR α -LBD (aa 225-262)] unter der Kontrolle des CMV-Promotors zu exprimieren. Zur Vereinfachung wird dieses Fusionsprotein in der vorliegenden Arbeit als VP16-RXR α Fusionsprotein bezeichnet.

Um TLX als Volllängenprotein zu studieren, waren zwei neue Plasmidkonstrukte notwendig. Eines davon kodierte TLX als Volllängenprotein unter gleichzeitiger Deletion der ursprünglichen Gal4-DBD. Um das zu gewährleisten, musste eine BamHI Restriktionsstelle vor die kodierende Gal4-DBD-Sequenz inseriert werden. Dazu wurde der Vektor mittels PCR unter Verwendung einer *high fidelity* DNA-Polymerase Q5 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) mit folgenden Primersequenzen amplifiziert: KpnI Vorwärtsprimer: CCC CGG TAC CAG ATC TTG AAT AAG TAG; BamHI Rückwärtsprimer: GCT TGG ATC CCA TGA TTC AGG AGG CTT GCT TAT CG. pFA-CMV-TLXfull (NR2E1; uniprot Eintrag: Q9Y466-1; Aminosäuren: 2-385) wurde durch Insertion eines komplementären cDNA-Fragments, welches mit Hilfe von PCR-Vervielfältigung (TLX BC028031.1, erworben als I.M.A.G.E. cDNA Klon #5242079 von BioScience, Nottingham, Vereinigtes Königreich) erhalten wurde, zwischen der neu erhaltenen BamHI und KpnI Restriktionsstellen der ursprünglichen MCS des pFA-CMV Vektors (Stratagene, San Diego, CA, USA) konstruiert. Beim zweiten Plasmid handelte es sich um ein

modifiziertes Reporterplasmid pFR-TAE-Luc. Hierbei wurden die Gal4-REs durch eine native TLX-Erkennungssequenz (engl. *TLX activating element*, TAE) (TAE-Sequenz: GGTACCGGGTCACGTGACGGGAGCTC) ersetzt. Die minimale TAE-Sequenz wird hierbei durch die KpnI und SacI Restriktionsstellen flankiert, um das literaturbekannte Plasmidkonstrukt #10 von Iwahara *et al.* darzustellen¹³⁶.

Alle Arbeiten zur Planung und Konstruktion der genannten Plasmidkonstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Jan Heering (Fraunhofer Institut für Translationale Medizin ITMP) durchgeführt.

6.1.3 Plasmidamplifikation und Aufreinigung

Zur Plasmidamplifikation wurden kompetente *E. coli* SURE Zellen (Stratagene, San Diego, CA, USA) verwendet. Zur Transformation wurden die Zellen für zehn Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden vorsichtig 10 µL des Plasmidtemplats hinzugegeben und die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock durch Inkubation für 45 Sekunden bei 42 °C. Die transformierten Zellen wurden anschließend in einem LB-Medium entweder mit Ampicillin (50-100 mg/mL für pRL, pFR und pECE) oder Kanamycin (50 mg/mL für pFA, pFTI) supplementiert über Nacht bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm geerntet. Nach Resuspension erfolgte die Plasmidaufarbeitung unter Verwendung des NucleoBond®Xtra Maxi Plus Kits (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben. Nach Resuspension in H₂O wurde die Plasmidkonzentration an einem NanoDrop 2000c UV-Spektrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen. Für die erstmalige Isolierung und Aufreinigung von pECE-SV40-Gal4-VP16 wurden DH5α-Zellen als Bakterienstich in einem Agarmedium (addgene, #71728)¹³⁵ kommerziell erworben. Hierbei wurden die Zellen wie vorher beschrieben unter identischen Bedingungen im LB-Medium über Nacht kultiviert. Alle darauffolgenden pECE-SV40-Gal4-VP16 Plasmidpräparationen erfolgten unter Verwendung des isolierten Plasmidtemplats.

6.1.4 Gal4-basierte Reporterassays in HEK293T-Zellen

6.1.4.1 Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay-Etablierung und Durchführung zur

Charakterisierung von TLX-Liganden

HEK293T-Zellen (30.000 Zellen/Well) wurden in frischem Kulturmedium in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit Opti-MEM (ThermoFisher Scientific,

Waltham, MA, USA) ohne jegliche Zusätze ersetzt. Anschließend erfolgte die transiente Transfektion mit pFR-Luc (100 ng/Well), pRL-SV40 (1 ng/Well) und zunehmenden Mengen an pECE-SV40-Gal4-VP16 (6, 12 und 25 ng/Well) und zunehmenden Mengen an pFA-CMV-TLX (0,5, 1, 3 und 6 ng/Well) unter Verwendung des Lipofectamin-LTX-Reagenzes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben. Fünf Stunden nach Transfektion wurde das Medium durch frisches Opti-MEM mit Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) mit den entsprechenden Testsubstanzen und einem Gehalt von 0,1 % DMSO (für das Wirkstofffragmentscreening 0,4 % DMSO mit entsprechender Testsubstanzkonzentration von 100 µM) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle ersetzt. Jede Konzentration wurde in Duplikaten getestet und jedes Experiment wurde mindestens in drei unabhängigen Experimenten wiederholt (das Wirkstofffragmentscreening erfolgte in Einzelpunktbestimmungen in zwei unabhängigen Experimenten). Nach einer 14-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen zur Detektion der Luciferase-Lumineszenz unter Verwendung des Dual-Glo-Luciferase-Assay-System-Kits (Promega, Fitchburg, WI, USA) nach Herstellerangaben lysiert. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe eines Plattenauslesegeräts (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) detektiert. Um die Transfektionseffizienz und potentielle wachstumsverändernde Einflüsse zu erfassen, wurde das Firefly-Luciferase-Signal durch Division mit dem Renilla-Luciferase-Signal normiert und mit einem Faktor 1000 multipliziert, um die RLE zu erhalten. Die x-fache Reporteraktivierung wurde durch Division der RLE einer Testsubstanz bei der entsprechenden Konzentration durch die Division der RLE einer entsprechenden unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle erhalten. EC₅₀- bzw. IC₅₀-Werte wurden durch Auftragen der x-fachen Reporteraktivierungen oder RLEs gegen die entsprechenden Testsubstanzkonzentrationen und anschließender nichtlinearer Regressionsanalyse mit einer Vier-Parameter-Logistikkurve in SigmaPlot 12.5 bestimmt. Für alle folgenden Gal4-TLX/Gal4-VP16-Experimente wurden folgende Plasmidmengen als optimal bewertet und verwendet: pFR-Luc (100 ng/Well), pRL-SV40 (1 ng/Well), pECE-SV40-Gal4-VP16 (6 ng/Well) und pFA-CMV-TLX (3 ng/Well). Um Gal4-VP16-vermittelte Effekte auszuschließen, wurde das Experiment bei Bedarf nur durch Transfektion mit pFR-Luc (100 ng/Well), pRL-SV40 (1 ng/Well) und pECE-SV40-Gal4-VP16 (6 ng/Well) wiederholt. Experimente zur Untersuchung der jeweiligen Gal4-TLX-Mutanten wurden in identischer Weise unter Verwendung von pFA-CMV-TLX_{A189E}, pFA-CMV-TLX_{L268R}, pFA-CMV-TLX_{A189E|L268R}, pFA-CMV-TLX_{F226W|I230E}, pFA-CMV-TLX_{A189E|F226W|I230E} oder pFA-CMV-TLX_{A189E|F226W|I230E|L268R}

statt pFA-CMV-TLX durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde über einen einseitigen *Student's t*-Test der gemessenen x-fachen Reporteraktivierungen oder RLEs gegen die x-fache Reporteraktivierung oder RLEs einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle mit $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant (n.s.) analysiert.

6.1.4.2 Reporteragenassay-Durchführung zur Untersuchung von Gal4-TLX in Kombination mit diversen Gal4-NRs

Die Wechselwirkung von Gal4-TLX mit anderen NRs im Gal4-Format wurde in identischer Weise zum Gal4-TLX/Gal4-VP16 (Kapitel 6.1.4.1) analysiert. Die transiente Transfektion erfolgte hierbei mit pFR-Luc (100 ng/Well), pRL-SV40 (2 ng/Well) und zunehmenden Mengen an pFA-CMV-TLX (1,5, 3, 6 und 12 ng/Well für NRs mit geringer konstitutiver Aktivität; 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well für NRs mit starker konstitutiver Aktivität) und die entsprechenden Gal4-NR-Plasmidkonstrukten bei einer unveränderten Konzentration unter Verwendung des Lipofectamin-LTX-Reagenzes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben. NRs mit schwacher konstitutiver Aktivität wurden durch entsprechende Referenzagonisten bei einer Konzentration von 1 μ M aktiviert. Folgende Gal4-NR-Plasmidmengen (pFA-CMV) und dazugehörige Referenzagonisten wurden verwendet: Gal4-CAR (25 ng/Well, CITCO); Gal4-FXR (25 ng/Well, GW4064), Gal4-LXR α (50 ng/Well, T0901317), Gal4-LXR β (50 ng/Well, T0901317), Gal4-Nurr1 (6 ng/Well), Gal4-PPAR α (25 ng/Well, GW7647), Gal4-PPAR γ (25 ng/Well, Pioglitazon), Gal4-PPAR δ (25 ng/Well, L165041), Gal4-PXR (50 ng/Well, SR121813), Gal4-RAR α (12 ng/Well, Tretinoin), Gal4-RAR β (12 ng/Well, Tretinoin), Gal4-RAR γ (12 ng/Well, Tretinoin), Gal4-ROR α (6 ng/Well), Gal4-RXR α (12 ng/Well, Bexaroten), Gal4-RXR β (12 ng/Well, Bexaroten), Gal4-RXR γ (12 ng/Well, Bexaroten) und Gal4-VDR (25 ng/Well, Calcitriol).

6.1.4.3 Reporteragenassaydurchführung zur Untersuchung der VP16-RXR α /Gal4-TLX-Heterodimer-vermittelten Reportermodulation

Die Vorgehensweise in diesem Reporteragenassay war identisch zum Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporteragenassay (Kapitel 6.1.4.1). Zur Etablierung erfolgte die transiente Transfektion hierbei mit pFR-Luc (100 ng/Well), pRL-SV40 (1 ng/Well), zunehmenden Mengen an pFTI-CMV-VP16-RXR α -LBD (3, 6 und 12 ng/Well) und zunehmenden Mengen an pFA-CMV-TLX (0, 0,5, 1, 3 und 6 ng/Well). Der Einfluss von TLX-Modulatoren wurde mit folgenden

Plasmidmengen studiert: pFR-Luc (100 ng/Well), pRL-SV40 (1 ng/Well), pFTI-CMV-VP16-RXR α -LBD (3 ng/Well) und pFA-CMV-TLX (3 ng/Well).

6.1.4.4 Gal4-NR-Reporterassay-Durchführung zur Untersuchung des NR-Selektivitätsprofil

Die Vorgehensweise in diesem Reporterassay war identisch zum Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (Kapitel 6.1.4.1). Die transiente Transfektion erfolgte mit pFR-Luc (12 ng/Well (in Kombination mit pFA-CMV-HNF4 α , pFA-CMV-LRH-1, pFA-CMV-NOR-1, pFA-CMV-Nurr1 und pFA-CMV-Nurr77) oder 100 ng/Well (übrige Gal4-NR Konstrukte)), pRL-SV40 (1 ng/Well (in Kombination mit pFA-CMV-TR2 und pFA-CMV-TR4), 2 ng/Well (übrige Gal4-NR Konstrukte) oder 6 ng/Well (in Kombination mit pFA-CMV-HNF4 α , pFA-CMV-LRH-1, pFA-CMV-NOR-1, pFA-CMV-Nurr1 und pFA-CMV-Nurr77)) und dem entsprechenden pFA-CMV-NR. Folgende pFA-CMV-NR-Plasmidmengen und Referenzagonisten (1 μ M) wurden verwendet: pFA-CMV-CAR (25 ng/Well, CITCO), pFA-CMV-FXR (25 ng/Well, GW4064), pFA-CMV-HNF4 α (6 ng/Well), pFA-CMV-LRH-1 (6 ng/Well), pFA-CMV-LXR α (50 ng/Well, T0901317), pFA-CMV-LXR β (50 ng/Well, T0901317), pFA-CMV-NOR-1 (6 ng/Well), pFA-CMV-Nurr1 (6 ng/Well), pFA-CMV-Nurr77 (6 ng/Well), pFA-CMV-PPAR α (25 ng/Well, GW7647), pFA-CMV-PPAR γ (25 ng/Well, Pioglitazon), pFA-CMV-PPAR δ (25 ng/Well, L165041), pFA-CMV-RAR α (12 ng/Well, Tretinoin), pFA-CMV-ROR α (25 ng/Well), pFA-CMV-RXR α (12 ng/Well, Bexaroten), pFA-CMV-THR α (1 ng/Well, T3), pFA-CMV-TR2 (3 ng/Well), pFA-CMV-TR4 (3 ng/Well) (TR2 und TR4 wurden in Kombination mit pECE-SV40-Gal4-VP16 (6 ng/Well) studiert) und pFA-CMV-VDR (25 ng/Well, Calcitriol).

6.1.5 Reporterassay-Durchführung zur Untersuchung des TLX-Vollängenproteins

Die Vorgehensweise in diesem Reporterassay war identisch zum Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (Kapitel 6.1.4.1). Zur Etablierung erfolgte die transiente Transfektion hierbei mit zunehmenden Mengen an pFR-TAE-Luc (25, 50 und 100 ng/Well), pRL-SV40 (2 ng/Well) und zunehmenden Mengen an pFA-CMV-TLXfull (5, 10, 25 und 50 ng/Well). Der Einfluss von TLX-Modulatoren wurde mit folgenden Plasmidmengen studiert: pFR-TAE-Luc (100 ng/Well), pRL-SV40 (2 ng/Well) und pFA-CMV-TLXfull (5 ng/Well).

6.1.6 Durchführung der rekombinanten TLX-LBD-Proteinexpression

Rekombinante TLX-LBD wurde mit einem N-terminalen His₆-Tag in *E. coli* Rosetta exprimiert. Hierbei wurden die Zellen in TB-Medium (engl. *terrific broth medium*, TB-Medium) bei 37 °C bis zu einem OD₆₀₀ (engl. *optical density*, OD) von 2,8 kultiviert. Anschließend erfolgte die Geninduktion unter Verwendung von 0,5 mM *iso*-Propyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei 18 °C über Nacht. Die Zellen wurden danach geerntet und in einem Puffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 % Glycerol, 1 mM TCEP) resuspendiert und durch Ultraschall lysiert. Das Protein wurde über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der His₆-Tag wurde durch Behandlung mit einer TEV-Protease (engl. *tobacco etch virus*, TEV) abgespalten, sodass das His₆-Tag-freie TLX-LBD-Protein mittels Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt wurde. Das rekombinante TLX-LBD-Protein wurde in einem Puffer mit 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP und 5 % Glycerol gelagert.

Diese Arbeitsschritte wurden freundlicherweise von Dr. Apirat Chaikaud, Xiaomin Ni und Rezart Zhubi (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie) durchgeführt.

6.1.7 Expression der rekombinanten RXRα- und TLX-Fusionsproteine

Nach Kodon-Optimierung der kodierenden Sequenzen der RXRα-LBD (uniprot Eintrag: P19793-1, Aminosäuren: 226-462) und TLX-LBD (uniprot Eintrag: Q9Y466-1, Aminosäuren 150-385) wurden diese kommerziell erworben (Geneart, Regensburg, Deutschland). Um die N-terminalen sGFP (engl. *superfolder green fluorescent protein*, sGFP)-gelabelten NR-LBD Fusionsproteine zu exprimieren, wurde ein modifiziertes Expressionskonstrukt basierend auf pET29b hergestellt. Hierbei wurde der gesamte Sequenzabschnitt zwischen der ursprünglichen NdeI-Restriktionsstelle und der vierten Position nach der His-Tag-kodierenden Sequenz durch eine kodierende Sequenz ersetzt, die eine ORF für Met-Gly-[His₁₀-Tag]-Asp-Tyr-Asp-Ile-Pro-Thr-Thr-[TEV-Site]-superfolder GFP²¹⁶ gefolgt von einer Restriktionsstelle für BamHI und XhoI enthält. Anschließend konnten die entsprechenden NR-LBD-kodierenden Sequenzen zwischen den neu eingeführten Restriktionsstellen BamHI und XhoI inseriert werden.

Zur Generation der biotinylierten TLX-LBD wurde das pMal Vektorsystem (New England, Biolabs, Ipswich, MA, USA) verwendet. Hierbei wurde der Sequenzabschnitt zwischen der Asn₁₀-kodierenden Sequenz und der Sall Restriktionsstelle durch eine Sequenz ersetzt, die mit Leu-Gly-Ile-Glu-Leu-Val-[His₈-Tag]-Asp-Tyr-Asp-Ile-Pro-Gly-Thr-Leu-[TEV-Seite] gefolgt von

einem Avidin-Tag und den Restriktionsstellen BamHI und XhoI bestückt ist. Anschließend wurde die TLX-LBD-kodierende Sequenz zwischen BamHI und XhoI eingeführt. Dieses Konstrukt erlaubte die Expression des Fusionsproteins mit einer N-terminalen Maltose-Bindungsstelle (engl. *maltose binding pocket*, MBP) gefolgt von einem Asn₁₀-Linker, einem His₈-Tag, eine Restriktionsstelle für einen TEV-Proteasenverdau, ein Avidin-Tag und die TLX-LBD mit unmodifiziertem C-Terminus.

Zur Expression der vorher beschriebenen Fusionsproteine wurden *E. coli* T7-exprimierende Zellen (New England, Biolabs, Ipswich, MA, USA) mit pGro7 (TAKARA Bio Inc., Kusatsu, Japan) und den entwickelten Expressionskonstrukten cotransformiert und über Nacht bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte (engl. *lysogeny broth*, LB) mit 34 µg/mL Chloramphenicol und entweder 100 µg/mL Ampicillin (für pMal) oder 35 µg/mL (für pET) selektiert. Die selektierten Kolonien wurden im LB-Medium bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm bis zu einem OD₆₀₀ von 0,7 kultiviert. Anschließend erfolgte die Expression von GroEL/ES unter Verwendung von pGro7 nach Induktion mit 1 g/L L-(+)-Arabinose und die Temperatur wurde auf 20 °C reduziert. Nach Erreichen von einem OD₆₀₀ = 1 wurde die Zielproteinexpression durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach 12-16 Stunden wurden die Zellen geerntet und in einem geeigneten Puffer A (400 mM NaCl, 20 mM NaPi, pH 7,8, 10 % (m/V) Glycerol und 20 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis nach Behandlung mit 1 mM ATP, DNase I, RNase A, 20 mg MgSO₄ und einem EDTA-freiem cOmplete™ Proteaseinhibitor-Cocktail (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) durch Zugabe von Lysozymen und zehn Durchläufe durch einen Invensys APV-1000 Homogenisierer (APV Systems, Silkeborg, Dänemark) aufgeschlossen. Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 16.500 g für 20 Minuten bei 4 °C entfernt. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung eines ÄKTApurifier FPLC Systems (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Als stationäre Phase wurde Ni Sepharose 6 Fast Flow Harz (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) verwendet. Die Säule wurde mit Puffer, welcher mit 50 mM Imidazol supplementiert war, eingestellt. Anschließend wurde das Protein mit 300 mM Imidazol eluiert. Die His-Tag-Entfernung erfolgte durch Behandlung mit einer TEV-Protease, während der Imidazolgehalt auf 10 mM durch Dialyse gegen Puffer A reduziert wurde, um eine reverse IMAC-Auftrennung zu ermöglichen. Das Eluat wurde konzentriert und durch eine anschließende Größenausschluss-Chromatographie unter Verwendung einer 16/60 Superdex200™ Säule mit verwendeten Assaypuffer (25 mM HEPES,

pH 7,5, 150 mM KF, 10 % (m/V) Glycerol, 5 mM Dithiothreitol (DTT)). Danach erfolgte die MBP-Abspaltung durch TEV-Proteasenverdau während einer Dialyse gegen Puffer A. Ein weiterer Aufreinigungsschritt erfolgte unter Verwendung von Gravitationsfluss-Chromatographie, um unprozessiertes Fusionsprotein, freie MBP-Tags und überschüssige TEV-Protease zu entfernen. Hierbei wurde Amylose High Flow Harz (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) verwendet. Das Eluat wurde über Nacht bei 4 °C mit 0,5 mM Biotin, 0,5 mM ATP, 5 mM MgCl₂ und *E. coli* Biotin Ligase birA bei einem molaren Verhältnis von ca. 1:10, um die Biokonjugation zwischen Biotin und den Lysinresten des Avidin-Tags zu gewährleisten, inkubiert. Anschließend wurde unprozessiertes Protein und birA mittels säulenchromatographischer Aufreinigung unter Verwendung von 5 mL monomeren Avidin UltraLink™ Harz (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) durch zehnmaliges Waschen des verwendeten Säulenvolumens mit Puffer A abgetrennt, sodass folglich Biotin-gelabeltes TLX-LBD-Protein durch Eluierung mit Puffer A und 2 mM Biotin erhalten werden konnte. Ein letzter Aufreinigungsschritt erfolgte mittels Größenausschluss-Chromatographie unter Verwendung einer 10/30 Superdex75™ Säule mit dem entsprechenden Puffer (25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KF, 10 % (m/V) Glycerol, 5 mM DTT).

Die Planung und alle Arbeitsschritte wurden freundlicherweise von Dr. Whitney Kilu (AK Prof. Dr. Eugen Proschak, Institut für Pharmazeutische Chemie) und Dr. Jan Heering (Fraunhofer Institut für Translationale Medizin) übernommen.

6.1.8 Homogene zeitaufgelöste Fluoreszenzresonanz-Energietransferassays

6.1.8.1 TLX-Coregulatorscreening

Die Wechselwirkung von Coregulatorpeptiden mit rekombinanter TLX-LBD wurde in einem homogenen, zeitaufgelösten Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-Experiment studiert. Zu diesem Zweck diente biotinyliertes, rekombinantes TLX-LBD-Protein, welches über Streptavidin an einem Terbium-Kryptat Fluorophor gekoppelt war (Tb-SA; Cisbio assays, Frankreich) als Förster-Resonanz-Energietransfer-Donor (FRET-Donor). Fluorescein-gekoppelte Coregulatorpeptide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dienten als FRET-Akzeptoren. Alle verwendeten Lösungen wurden im gleichen Puffer (25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KF, 10 % (m/V) Glycerol, 5 mM DTT, 0,1 % (m/V) 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)) angesetzt und enthielten biotinylierte, rekombinante TLX-LBD (3 nM), Tb-SA (3 nM) und die entsprechenden

Fluorescein-gekoppelten Coregulatorpeptide (100 nM) mit einem Gehalt von 1 % DMSO und den entsprechenden Testsubstanzen oder nur DMSO als unbehandelte Kontrolle. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde das System bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm angeregt. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten (FI) der Fluorescein-Akzeptor-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 520$ nm, während die Detektion der Tb-SA-Donor-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von $\lambda = 620$ nm an einem Tecan SPARK Plattenauslesegerät (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) erfolgte. Um ein dimensionsloses HTRF-Signal zu erhalten, wurde FI_{520nm} durch FI_{620nm} dividiert und mit einem Faktor 10.000 multipliziert.

6.1.8.2 TLX-Coregulator-Affinitätsassay

Die TLX-Coregulator-Affinitätsmodulation wurde durch Titration von sGFP-TLX-LBD gegen Tb-SA-gekoppelten Coregulatorpeptiden untersucht. Alle verwendeten Lösungen wurden im vorher genannten HTRF-Assaypuffer angesetzt und mit 0,1 % (m/V) CHAPS, 1 % DMSO und entsprechenden Testsubstanzen (10 μ M) oder nur DMSO als unbehandelte Kontrolle versetzt. Die FRET-Donorkomplexe aus biotinylierten Wildtyp Atroboxpeptid (Biotin-PPYADTPALRQLSEYARPHVAFSP), die rekrutierungsunfähige Atroboxpeptid-Mutante (Biotin-PPYADTPAARQASEYARPHVAFSP), NCoR (ID1) (Biotin-GHSFADPASNLGLEDIIRKALMGSFDF), SMRT (ID2) (Biotin-SQAVQEHAHNMGLEAIRKALMGKYD QW) mit Tb-SA (12 nM) wurden konstant gehalten, während die sGFP-TLX-LBD Menge bis zu einer maximalen Konzentration von 4 μ M variiert wurde. Freies sGFP (4 μ M) wurde in jeder Messserie konstant gehalten, um diffusionsabhängige FRET-Effekte zu unterdrücken. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde das System bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm angeregt. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten der sGFP-Akzeptor-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 520$ nm, während die Detektion der Tb-SA-Donor-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von $\lambda = 620$ nm an einem SPARK Plattenauslesegerät (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) erfolgte. Um ein dimensionsloses HTRF-Signal zu erhalten, wurde FI_{520nm} durch FI_{620nm} dividiert und mit einem Faktor 10.000 multipliziert. Die veränderte SMRT-Rekrutierungsmodulation mit zunehmenden Konzentrationen von ccrp2 (**2**) und Istradefyllin (**116**) wurden mit 100 nM (für ccrp2 (**2**)) und 200 nM (für Istradefyllin (**116**)) sGFP-TLX-LBD-Konzentrationen studiert.

6.1.8.3 TLX-Dimerisierungsassays

Die Untersuchung von Dimerisierungseffekten basierend auf den LBDs von RXR α und TLX wurde durch Titration von sGFP-RXR α -LBD oder sGFP-TLX-LBD gegen eine konstante Menge an FRET-Donor-gelabelten TLX-LBD-Konzentrationen studiert. Alle verwendeten Lösungen wurden im vorher genannten HTRF-Assaypuffer angesetzt und mit 0,1 % (m/V) CHAPS, 1 % DMSO und entsprechenden Testsubstanzen (bis 100 μ M) oder nur DMSO als unbehandelte Kontrolle versetzt. Der FRET-Donorkomplex aus biotinylierter TLX-LBD (finale Konzentration 0,375 nM) und Tb-SA (0,75 nM) wurde konstant gehalten, während die Konzentration von sGFP-RXR α -LBD (maximale Konzentration 600 nM) oder sGFP-TLX-LBD (maximale Konzentration 1200 nM) variiert wurde. Freies sGFP wurde in jeder Messserie hinzugegeben und konstant gehalten (600 nM bzw. 1200 nM), um diffusionsabhängige FRET-Effekte zu unterdrücken. Zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve von **137h** bezüglich potentieller TLX-Homodimerisierungseffekte wurde Tb-SA (12 nM), Biotin-gelabeltes TLX (12 nM) mit sGFP-TLX (120 nM) mit verschiedenen Konzentrationen von **137h** inkubiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei 20 °C und zwei Stunden bei 37 °C erfolgte die Messung und Auswertung identisch zum TLX-Coregulator-Affinitätsassay (Kapitel 6.1.8.2). Im Falle der Xanthine wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Alle Experimente aus dem Kapitel 6.1.8 wurden freundlicherweise von Dr. Whitney Kilu (AK Prof. Dr. Eugen Proschak, Institut für Pharmazeutische Chemie) und Dr. Jan Heering (Fraunhofer Institut für Translationale Medizin) übernommen.

6.1.9 Differentielle Scanning Fluorimetrie Experimente

Alle Experimente wurden an einem Mx3005p Echtzeit-PCR Gerät (Stratagene, San Diego, CA, USA) basierend auf bekannten Literaturprotokollen durchgeführt^{109,217}.

Methode A: Wirkstofffragmentscreening

2 μ M rekombinantes TLX-LBD-Protein in Puffer (10 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl) wurde mit dem SYPRO-Orange-Farbstoff (Verdünnung 1:1000) versetzt und anschließend mit den Verbindungen **27-32**, **34-39** und **45-49** bei einer finalen Konzentration von 500 μ M (5 % DMSO) und einer unbehandelten Probe (5 % DMSO) inkubiert. Es wurde ein Temperaturgradient mit 71 Zyklen (1 °C/Zyklus) angelegt, in dem die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen wurde. Jedes Experiment wurde drei Mal als Einzelpunktbestimmung durchgeführt.

Experimenteller Teil

Die Proteinschmelzpunkte wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse (GraphPad Prism 7) der detektierten Fluoreszenzwerte unter Verwendung einer sigmoidalen Boltzmann-Gleichung bestimmt.

Methode B: Substanzen basierend auf Fragment 06A05 (**45**)

2 μM rekombinantes TLX-LBD-Protein in Puffer (10 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl) wurde mit dem SYPRO-Orange-Farbstoff (Verdünnung 1:1000) versetzt und anschließend mit den Verbindungen 06A05 (**45**), ccrp2 (**2**) und **137b** bei einer finalen Konzentration von 100 μM (2 % DMSO) und einer unbehandelten Probe (2 % DMSO) inkubiert. Es wurde ein Temperaturgradient mit 71 Zyklen (1 °C/Zyklus) angelegt, in dem die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen wurde. Jedes Experiment wurde zwei Mal als Einzelpunktbestimmung durchgeführt. Um Ligand-Farbstoff-Effekte auszuschließen, wurden die Experimente in identischer Weise nur mit dem Farbstoff in Puffer verdünnt wiederholt. Die Proteinschmelzpunkte wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse (GraphPad Prism 7) der detektierten Fluoreszenzwerte unter Verwendung einer sigmoidalen Boltzmann-Gleichung bestimmt.

Für alle DSF-Experimente wurde das rekombinant exprimierte TLX-LBD-Protein verwendet, welches bereits in Kapitel 6.1.6 und durch Dr. Apirat Chaikaud, Xiaomin Ni und Rezart Zhubi (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie) hergestellt wurde.

6.1.10 Isotherme Titrationskalorimetrie

Alle ITC-Messungen wurden an einem Affinity-ITC-Gerät (TA Instruments, New Castle, DE, USA) durchgeführt. Das Protein wurde nach jedem Auftauen für fünf Minuten bei 15.000 g bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde nur der Überstand für die finale Verdünnung verwendet. Alle Proben wurden mit einem Maximalgehalt von 1 % DMSO vorbereitet. Jede Probe, die während des Experiments in der Zelle vorlag, wurde 30 Minuten bei entsprechender Temperatur aus dem Experiment entgast.

40 μM TLX-LBD-Protein in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) wurde bei 25 °C mit Propranolol (**54**) (200 μM im gleichen Puffer verdünnt) titriert. Es wurden 31 Injektionen durchgeführt (1x1 μL und 30x3 μL). Das Injektionsintervall wurde auf 300 Sekunden mit einer Rührgeschwindigkeit von 75 rpm gesetzt.

Experimenteller Teil

10-40 μM TLX-LBD-Protein in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) wurde bei 37 °C mit Koffein (**55**), **104a** oder **115** (60-100 μM im gleichen Puffer verdünnt) titriert. Es wurden 31 Injektionen durchgeführt (1x1 μL und 30x3 μL). Das Injektionsintervall wurde auf 300 Sekunden mit einer Rührgeschwindigkeit von 75 rpm gesetzt.

40 μM TLX-LBD-Protein in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) wurde bei 37 °C mit **137h** oder **629** (100 μM im gleichen Puffer verdünnt) titriert. Es wurden 31 Injektionen durchgeführt (1x1 μL und 30x3 μL). Das Injektionsintervall wurde auf 300 Sekunden mit einer Rührgeschwindigkeit von 75 rpm gesetzt.

Zu allen Protein-Ligand-Experimenten wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt: Kontrollexperiment A: Puffer (1 % DMSO) gegen entsprechender Testsubstanz, Kontrollexperiment B: 10-40 μM TLX-LBD-Protein (1 % DMSO) gegen Puffer (1 % DMSO)) mit den identischen Bedingungen wie im Protein-Ligand-Experiment. Jedes Experiment wurde mindestens ein Mal durchgeführt. Die detektierten Wärmeraten des Protein-Ligand-Experiments wurden unter Verwendung eines unabhängigen Bindungsmodells (NanoAnalyze™ Software, TA Instruments, New Castle, DE, USA) analysiert. Sowohl die K_d -Wertbestimmung als auch die Ermittlung der thermodynamischen Parameter (Enthalpie und Entropie sowie der stöchiometrische Koeffizient n) erfolgte freundlicherweise durch Dr. Apirat Chaikud (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie) und Prof. PD. Dr. Daniel Merk (Institut für Pharmazeutische Chemie, LMU München).

Für alle ITC-Experimente wurde das rekombinant exprimierte TLX-LBD-Protein verwendet, welches bereits in Kapitel 6.1.6 und durch Dr. Apirat Chaikud, Xiaomin Ni und Rezart Zhubi (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie) hergestellt wurde.

6.1.11 Untersuchung der Protein-Ligand-Interaktion mittels ^1H -NMR-Spektroskopie

Die Spektrenaufnahme erfolgte an einem Bruker 600 MHz AVIIIHD Spektrometer, welches mit einem Probenwechsler und einstellbarer Temperatur zur Lagerung der Proben bestückt war. Alle Spektren wurden unter Verwendung von Topspin 3.6.2 und Topspin 4.0.9 prozessiert und analysiert. Zur Untersuchung der TLX-Ligand-Interaktionen (mit ccrp2 (**2**), Koffein (**54**), **100k**, Istradefyllin (**116**) und **115**) wurde ein Probenvolumen mit 200 μL TLX-LBD-Protein (50 μM) in

Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5 % Glycerol) mit 5 % D₂O und 100 µM TMSP-Na als interner Standard (für **115** wurde die chemische Verschiebung des DMSO-d₆-Signals verwendet) und den entsprechenden Testsubstanzen vorbereitet. Die finalen Konzentrationen des Proteins und der verwendeten Liganden betragen 50 µM (1:1 Verhältnis). ¹H-1D-Spektren wurden unter Anwendung der Wassersignalunterdrückung (zgesgpe²¹⁸, Wasserunterdrückung durch Anregungsmodellierung mit Gradienten unter Verwendung von perfektem Echo) gemessen. Zur Kontrolle wurde das Experiment in identischer Weise nur mit Puffer und Ligand aufgenommen.

Die Durchführung und Bewertung aller NMR-basierten TLX-Ligand-Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. Sridhar Sreeramulu (AK Prof. Dr. Harald Schwalbe, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie) übernommen. Das verwendete rekombinante Protein wurde bereits in Kapitel 6.1.6 beschrieben und von den Kollegen zur Verfügung gestellt.

6.1.12 Untersuchung der relativen mRNA-Level über qPCR in T98G-Zellen

T98G-Zellen (1 Million Zellen/Well) wurden in 6-Well-Platten in frischem Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch ein Minimalmedium (engl. *minimal essential medium*, MEM) ersetzt, welches zusätzlich mit 1 % Aktivkohle behandeltes FCS, Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL) und L-Glutamin (2 mM) supplementiert war. Nach weiteren 24 Stunden wurden die T98G-Zellen mit den Testsubstanzen ccrp2 (**2**) (10 µM), Koffein (**55**) (30 µM), Istradefyllin (**116**) (1 µM), **100k** (10 µM), **115** (1 µM), Propranolol (**54**) (50 µM), Atenolol (**118**) (50 µM), 06A05 (**45**) (30 µM) oder **137h** (3 µM) im selben Medium mit einem 0,1 % DMSO-Gehalt gelöst oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle für acht Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit einem kalten Phosphatpuffer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen. Die mRNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des E.Z.N.A.-total-RNA-Kit-I (R6834-02, Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA) nach Herstellerangaben. Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten mRNA wurde an einem NanoDrop 2000c UV-Spektrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ermittelt und jeweils die gleiche Menge in cDNA mit Hilfe des high-capacity-RNA-to-cDNA-Kits (#4387406, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben revers umgeschrieben. Die Detektion erfolgte unter Verwendung von Power-SYBR-Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) an einem StepOnePlus-System-

Gerät (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Jeder Messpunkt wurde in Doppelpunktbestimmungen in mindestens vier Experimenten gemessen. Die erhaltenen Daten wurden anhand der relativen Quantifizierungsmethode der vergleichenden $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen analysiert. Die TLX-Expression bzw. TLX-Zielgenexpression wurde mit Hilfe folgender Primersequenzen über qPCR erfasst: BTG2¹⁰²: Vorwärtsprimer 5' - CTC CAT CTG CGT CTT GTA CGA - 3', Rückwärtsprimer 5' - AGA CTG CCA TCA CGT AGT TCT - 3'; GAPDH²¹⁹: Vorwärtsprimer 5' - CCT GTT CGA CAG TCA GCC G - 3', Rückwärtsprimer 5' - CGA CCA AAT CCG TTG ACT CC - 3'; p21 (Origene, Rockville, MD, USA): Vorwärtsprimer 5' - AGG TGG ACC TGG AGA CTC TCA G - 3', Rückwärtsprimer 5' - TCC TCT TGG AGA AGA TCA GCC G - 3'; PTEN (Origene, Rockville, MD, USA): Vorwärtsprimer 5' - TGA GTT CCC TCA GCC GTT ACC T - 3', Rückwärtsprimer 5' - GAG GTT TCC TCT GGT CCT GGT A - 3'; SIRT1¹³⁶: Vorwärtsprimer 5' - GAA CCT TTG CCT CAT CTA CA - 3', Rückwärtsprimer 5' - AGC CGC TTA CTA ATC TGC TC - 3'; SLC1a1 (Origene, Rockville, MD, USA): Vorwärtsprimer 5' - CGA AAG AAC CCT TTC CGA TTT GC - 3', Rückwärtsprimer 5' - GAA GGT GAC AGG CAG TGT TGCT - 3'; TET3¹⁰²: Vorwärtsprimer 5' - CAG CAG CCG AGA AGA AGA AG - 3', Rückwärtsprimer 5' - GGA CAA TCC ACC CTT CAG AG - 3'; TLX¹³⁶: Vorwärtsprimer 5' - CTA AGA GTG TGC CAG CCT TC - 3', Rückwärtsprimer 5' - TGT TAG CAT CAA CCG GAA TGG - 3'; TUSC1¹⁰²: Vorwärtsprimer 5' - TGA AGA GGC CAG CAC GAA CC - 3', Rückwärtsprimer 5' - AGT CGG GTT CCT GTA GAG GC - 3'.

6.1.13 Proliferationsassay mittels Kristallviolett färbung in T98G-Zellen

T98G-Zellen (4.000 Zellen/Well) wurden in frischem Kulturmedium in 96-Well-Platten ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Inkubation mit Atenolol (**118**) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle. Zusätzlich wurden auf einer separaten 96-Well-Platte T98G-Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mit einer MeOH/EtOH-Mischung (2:1 V/V) über 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Diese Zellen dienten zur Bestimmung der Zellmasse an $t = 0$ (Kontrollplatte_{t=0}). Die unfixierten T98G-Zellen wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um Proliferationseffekte zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einer MeOH/EtOH-Mischung (2:1 V/V) über 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit einer methanolischen Kristallviolettlösung (20 % V/V, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt. Nach einem Waschvorgang mit H₂O wurde die Platte für zwei Stunden bei 37 °C getrocknet. Das DNA-gebundene Kristallviolett wurde mit einer 20 % wässrigen AcOH extrahiert und bei einer

Absorptionswellenlänge von 590 nm an einem Plattenauslesegerät (SPECTRAFluor Plus, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) vermessen. Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde die Absorption der Kontrollplatte_{t=0} von den Absorptionswerten der behandelten bzw. unbehandelten (0,1 % DMSO) Proben subtrahiert. Die prozentualen Proliferationseffekte [%] wurden durch Division der korrigierten Absorptionswerte der behandelten Proben durch den korrigierten Absorptionswert der unbehandelten 0,1 % DMSO-Probe erhalten. Jeder Messpunkt wurde in Dreipunktbestimmungen untersucht. Jedes Experiment wurde drei Mal durchgeführt.

Die Untersuchung und Auswertung von Propranolol (**54**), Sotalol (**120**) und **133** erfolgte durch Dr. Iris Bischoff-Kont (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie).

6.1.14 Viabilitätsassay mittels WST-Reagenzes in HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen (30.000 Zellen/Well) wurden in frischem Kulturmedium in 96-Well-Platten ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Inkubation mit ccrp2 (**2**), BMS453 (**7**), 06A05 (**45**), **137h** und einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des WST-Reagenzes (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) nach Herstellerangaben und die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte an einem Plattenauslesegerät (infinite M200, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Zur Normalisierung wurde $\Delta\lambda = \text{Absorption}(\lambda = 450 \text{ nm}) - \text{Absorption}(\lambda = 620 \text{ nm})$ ermittelt, welches zusätzlich durch Subtraktion einer Hintergrundabsorption (Absorptionsmessung des verwendeten Mediums) die korrigierten Absorptionen lieferte. Jeder Messpunkt wurde in Dreipunktbestimmungen untersucht. Jedes Experiment wurde drei Mal durchgeführt.

6.1.15 Viabilitätsassay mittels WST-Reagenzes in T98G-Zellen

T98G-Zellen (4.000 Zellen/Well) wurden in frischem Kulturmedium in 96-Well-Platten ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Inkubation mit Atenolol (**118**) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle. Die T98G-Zellen wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des WST-Reagenzes (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) nach Herstellerangaben und die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte an einem Plattenauslesegerät (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA oder infinite M200, Tecan

Group, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Zur Normalisierung wurde $\Delta\lambda = \text{Absorption}(\lambda = 450 \text{ nm}) - \text{Absorption}(\lambda = 620 \text{ nm})$ ermittelt, welches zusätzlich durch Subtraktion einer Hintergrundabsorption (Absorptionsmessung des verwendeten Mediums) die korrigierten Absorptionen lieferte. Die Zellviabilität [%] wurde durch Division der korrigierten Absorptionen der behandelten Proben durch die Absorptionen der unbehandelten 0,1 % DMSO-Proben erhalten. Jeder Messpunkt wurde in Dreipunktbestimmungen untersucht. Jedes Experiment wurde drei Mal durchgeführt.

Die Untersuchung und Auswertung von Propranolol (**54**), Sotalol (**120**) und **133** erfolgte durch Dr. Iris Bischoff-Kont (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie).

6.1.16 Viabilitätsassay mittels LDH in T98G-Zellen

T98G-Zellen (4.000 Zellen/Well) wurden in frischem Kulturmedium in 96-Well-Platten ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Inkubation mit Atenolol (**118**) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle. Die T98G-Zellen wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle wurden T98G-Zellen 45 Minuten vor Inkubationsende mit einer Lyse-Pufferlösung aus dem entsprechenden Herstellerkit (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Fitchburg, WI, USA) versetzt. Nach Inkubationsende wurde 50 µL des Zellüberstands in eine neue Platte überführt und die enzymatische Reaktion durch Substratzugabe nach Herstellerangaben gestartet. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten durch Zugabe einer entsprechenden Stopp-Pufferlösung und Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur gestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 490 nm an einem Plattenauslesegerät (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA oder infinite M200, Tecan Group, Männedorf, Schweiz). Die x-fache LDH-Ausschüttung wurde durch Division der Absorptionen der behandelten Proben durch die Absorptionen der unbehandelten 0,1 % DMSO-Proben erhalten. Jeder Messpunkt wurde in Dreipunktbestimmungen untersucht. Jedes Experiment wurde drei Mal durchgeführt.

Die Untersuchung und Auswertung von Propranolol (**54**), Sotalol (**120**) und **133** erfolgte durch Dr. Iris Bischoff-Kont (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie).

6.1.17 Direkter Migrationsassay mittels Boyden-Kammer in T98G-Zellen

T98G-Zellen (150.000 Zellen/Well) wurden in FCS-freiem Kulturmedium in Transwells (Membranfläche 0,33 cm², Porengröße 8 µM aus Polycarbonat, Corning, NY, USA) mit den Verbindungen Atenolol (**118**) (75 µM), Sotalol (**120**) (75 µM) und einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle in FCS-freiem Kulturmedium ausgesät. Um einen FCS-Gradienten anzulegen, wurde im unteren Teil der Boyden-Kammer Kulturmedium mit 10 % FCS für die behandelten Proben und für die Positivkontrolle verwendet. Für die Negativkontrolle wurde FCS-freies Kulturmedium im unteren Teil der Boyden-Kammer verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine gerichtete Migration in Richtung des FCS-Gradienten zu gewährleisten. Nicht-migrierte Zellen aus dem oberen Bereich des Transwells wurden mit Hilfe eines Wattestäbchens aufgenommen und entfernt. Anschließend wurden die Zellen auf der Membran mit Hilfe einer MeOH/EtOH-Mischung (2:1 V/V) für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierte Zellmasse wurde unter Verwendung einer methanolischen Kristallviolett-Lösung (20 % V/V, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt. Nach einem Waschvorgang der Transwells mit H₂O wurden die Transwells zwei Stunden bei 37 °C getrocknet. Das DNA-gebundene Kristallviolett wurde mit einer 20 % wässrigen AcOH-Lösung extrahiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm an einem Plattenauslesegerät (SPECTRAFluor Plus, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) vermessen. Die gerichtete Migration [% FCS-Gradienten] wurde durch Division der Absorptionswerte der behandelten Proben und der unbehandelten 0,1 % DMSO-Positivkontrolle mit angelegtem FCS-Gradient durch die Absorptionswerte der Negativkontrolle ohne FCS-Gradienten ermittelt. Jeder Messpunkt wurde in Zweipunktbestimmungen untersucht. Jedes Experiment wurde drei Mal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde über eine einseitige ANOVA (engl. *analysis of variance*, ANOVA) gefolgt von Tukey's *post hoc* Test analysiert und als statistisch signifikant bewertet, wenn $p \leq 0,05$ und über einen einseitigen *Student's* t-Test gegen die gerichtete Migration der FCS-haltigen Positivkontrolle mit $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,05 = *$, $p > 0,05 =$ nicht signifikant, analysiert.

Die Untersuchung und Auswertung von Propranolol (**54**) und **133** erfolgte durch Dr. Iris Bischoff-Kont (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie).

6.1.18 Apoptoseassay in T98G-Zellen

T98G-Zellen (24.000 Zellen/Well) wurden in frischem Kulturmedium in 24-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Atenolol (**118**) oder einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 24 Stunden vor Inkubationsende wurde als Positivkontrolle Apoptose durch Inkubation mit Staurosporin (1 µM) induziert. Nach Inkubationsende wurden die Zellen und die entsprechenden Waschlösungen vereint gesammelt und die Zellsuspension für 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 300 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und das Zellpellet wurde mit kaltem PBS gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Propidiumiodid (50 µg/mL, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) mit einem 0,1 % Natriumcitrat- und 0,1 % Triton-X 100-Gehalt über 24 Stunden bei 4 °C. Die Anzahl apoptischer Zellen wurde mit Hilfe von Zellflusszytometrie (FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) von Dr. Iris Bischoff-Kont (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie) analysiert.

Die Untersuchung und Auswertung von Propranolol (**54**), Sotalol (**120**) und **133** erfolgte durch Dr. Iris Bischoff-Kont und Isabelle Franz (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie).

6.1.19 Bestimmung der metabolischen Stabilität

Die Testsubstanzen (5 µL, finale Konzentration 10 µM) wurden bei 37 °C in 432 µL Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) mit 50 µL eines NADPH-regenerierendem System (30 mM Glucose-6-phosphat, 4 U/mL Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, 10 mM NADP und 30 mM MgCl₂) inkubiert. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 13 µL eines Mikrosomengemisches aus der Leber von Sprague-Dawley Ratten (20 mg Protein/mL in 0,1 M Phosphatpuffer, Invitrogen, Waltham, MA, USA) unter Schütteln in einem Wasserbad bei 37 °C gestartet. Anschließend wurde die Reaktion nach verschiedenen Zeitintervallen (0, 15, 30 und 60 Minuten) durch Zugabe von 500 µL eiskaltem MeOH gestoppt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Restgehalt der Testsubstanzen wurde aus dem Überstand über HPLC mittels externer Kalibrierung quantifiziert. Die mobile Phase wurde in Abhängigkeit der Testsubstanzen angepasst (MeOH 40-90 % und H₂O (0,1 % Ameisensäure) 10-60 %). Die Volumenflussrate betrug 1 mL/Minute. Als stationäre Phase wurde eine Säule Purospher® STAR, RP18, 5 µm, 125×4 mit einer vorgeschalteten Säule Purospher® STAR,

RP18, 5 μm , 4x4 verwendet. Das Probeninjektionsvolumen betrug 50 μL . Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei Wellenlängen von $\lambda = 254 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$. Folgende Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um die Stabilität der Testsubstanzen im verwendeten Puffer zu überprüfen. Kontrollexperiment A: ohne NADPH, Kontrollexperiment B: mit inaktivierten Mikrosomen (20 Minuten bei 90 °C inkubiert) und Kontrollexperiment C: ohne Testsubstanz. Die Quantifizierung erfolgte über externe Kalibrierung. Alle Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen wiederholt.

Die Durchführung aller Experimente wurde freundlicherweise von Astrid Kaiser (AK Prof. Dr. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie) übernommen.

6.1.20 Löslichkeitsabschätzung durch Absorptionsmessung

Alle Löslichkeitsabschätzungen wurden im selben Puffer, der für die DSF-Experimente verwendet wurde, durchgeführt (10 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl). Als Referenz wurde ein literaturbekanntes Protokoll verwendet²²⁰. Die Testsubstanzen wurden im DSF-Puffer mit einem Gehalt von 2 % DMSO verdünnt (10-500 μM). Als unbehandelte Negativkontrolle wurde der DSF-Puffer mit 2 % DMSO verwendet. Die Absorptionsmessungen der Proben (100 μL) erfolgte im 96-Well-Format bei einer Wellenlänge von $\lambda = 650 \text{ nm}$ unter Verwendung eines Plattenauslesegerätes (infinite M200, Tecan Group, Männedorf, Schweiz). Anschließend wurden die ermittelten Werte durch Division der Absorptionswerte einer behandelten Probe durch die Absorptionswerte der unbehandelten Probe normiert. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

6.1.21 Wasserlöslichkeitsbestimmung

Zur Wasserlöslichkeitsbestimmung von **137h** wurden 1-3 mg der Substanz in einem Whatman-Uniprep-Filter (PTFE, 0,45 μm (Cat No. UN113UORG)) mit 2 mL destilliertem H_2O versetzt. Die Probe wurde für 24 Stunden bei 37 °C geschüttelt und anschließend filtriert. Die Menge des Analyten im Filtrat wurde mittels externer Kalibriergerade ermittelt. Dazu wurde ein HPLC Waters 600 Kontroller Gerät (Waters, Milford, MA, USA), welches mit einem Waters 2487 dualen Absorptionsdetektor, einem Waters 717 Plus Autosampler und einer Säule Purospher® STAR, RP18, 5 μm , 125x4 mit einer vorgeschalteten Säule Purospher® STAR, RP18, 5 μm , 4x4 verwendet. Das Probeninjektionsvolumen betrug 50 μL . Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei Wellenlängen von $\lambda = 254 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$. Die Flussrate betrug 1 mL/Minute und die

mobile Phase wurde in Abhängigkeit der Testsubstanz angepasst (MeOH 40-90 % und H₂O (0,1 % Ameisensäure) 10-60 %).

Das Experiment hierzu wurde freundlicherweise von Astrid Kaiser (AK Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität) durchgeführt.

6.2 Design des Pharmakophormodells

Das ligandenbasierte Pharmakophormodell wurde anhand von **2a** und 06A05 (**45**) unter Verwendung der Molecular-Operating-Environment-Software (MOE2018.0101) generiert. Dazu wurden mit Hilfe des „flexible alignment“-Tools **2a** und **45** übereinander gelegt (Kraftfeld: MMFF94x, Standardeinstellungen). Es wurde die Pose mit der höchsten Spannungsenergie U [kcal/mol] ausgewählt, um eine größere Toleranz bzgl. der Pharmakophorpunktplatzierung zu gewähren. Nach manueller Inspektion der Bindungslängen und -winkel wurde die gewählte Überlagerungspose zur weiteren Analyse betrachtet. Mit Hilfe des „pharmacophor query editor“-Tools wurden Konsensus-Pharmakophorpunkte mit einem Toleranzradius von 1,0 Å gesetzt, die als Nachbarschaft-Entfernung-Schwellenwert definiert wurden. Pharmakophorpunkte innerhalb dieses Radius wurden als direkte Nachbarn betrachtet, in dem ein Konsensus-Score ermittelt wurde. Liegt dieser über 50 %, so wurden die Pharmakophorpunkte als ein Konsensus-Pharmakophorpunkt betrachtet. Die restlichen Parameter wurden mit Standardeinstellungen verwendet. Es wurden zwei hydrophobe (grün), ein aromatischer (orange), ein Wasserstoffbrückenakzeptor (cyan) und ein Wasserstoffbrückendonator (magenta)-Pharmakophorpunkt ausgewählt.

6.3 Chemisch-synthetischer Teil

Lösungsmittel und Chemikalien:

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden kommerziell erworben und ohne weitere Aufreinigung für die chemischen Synthesen verwendet. Bei Bedarf wurde Argon als Inertgas verwendet.

Dünnschichtchromatographie:

Alle Reaktionsverläufe wurden unter Verwendung von DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey Nagel, Düren, Deutschland), welche mit einer 20 mm Schicht Kieselgel 60 und einem Fluoreszenzindikator UV₂₅₄ beschichtet sind, verfolgt. Die Detektion erfolgte

Experimenteller Teil

entweder unter Lichteinstrahlung ($\lambda = 254 \text{ nm}$ oder $\lambda = 366 \text{ nm}$) oder mit Hilfe von Färbungsreagenzien. Hierbei wurden eine KMnO_4 -Lösung (Zusammensetzung: 1,5 g KMnO_4 , 10 g K_2CO_3 , 1,25 mL 10 % NaOH in 200 mL H_2O), eine Ninhydrin-Lösung (Zusammensetzung: 0,2 g Ninhydrin, 100 mL EtOH und 3 mL AcOH), eine Cersulfat-Lösung (Zusammensetzung: wässrige Lösung aus 10 % Cer(IV)sulfat und 15 % Schwefelsäure), eine Ammonium-Molybdat(VI)-Tetrahydrat/Ammonium-Cer(IV)-sulfat-Dihydrat-Lösung (Zusammensetzung: 10 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 g $\text{Ce}(\text{NH}_4)_4(\text{SO}_4)_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 410 mL H_2O und 40 mL konzentrierte Schwefelsäure) und eine Molybdatophosphorsäure-Lösung (Zusammensetzung: 10 g $\text{H}_3\text{Mo}_{12}\text{PO}_{40}\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ in 100 mL EtOH) verwendet.

Präparative Säulenchromatographie:

Um die Rohprodukte mit Hilfe von präparativer Säulenchromatographie aufzureinigen, wurde Kieselgel 60 mit einer Partikelgröße von 0,04-0,063 mm (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Als mobile Phase wurden Lösungsmittel technischen Grades verwendet. Bei Bedarf wurde ein Lösungsmittelgradient angelegt.

NMR-Spektroskopie:

Analysen mit Hilfe von NMR-Techniken (^1H , ^{13}C , ^{13}C -HSQC, ^{13}C -HMBC, ^{15}N -HSQC, ^1H -COSY, ^{19}F) wurden an folgenden Geräten der Firma Bruker (Billerica, MA, USA) durchgeführt: DPX 250 (250 MHz), Bruker AVANCE^{II} 300 (300 MHz), Bruker AVANCE 400er (400 MHz) und Bruker AVANCE 500 (500 MHz) durchgeführt. Tetramethylsilan (TMS) wurde als interner Standard zur Signalkalibrierung verwendet. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm mit den dazugehörigen Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Folgende Signalaufspaltungen wurden detektiert: Singulett (s), breites Singulett (bs), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), Pentett (p), Multiplett (m). Die Probenvorbereitung erfolgte in folgenden deuterierten Lösungsmittel (Eurisotop):

Tabelle 22: Chemische Verschiebungssignale verwendeter deuterierter Lösungsmittel zur Referenzierung der Spektren²²¹.

Lösungsmittel	^1H -Verschiebung [ppm]	^{13}C -Verschiebung [ppm]
Aceton- d_6	2,05	29,84
CDCl_3	7,26	77,16
DMSO- d_6	2,50	39,52

MeOH-d ₄	3,31	49,00
---------------------	------	-------

Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie (engl. *electrospray ionisation mass spectrometry*, ESI-MS):

Die Aufnahme von ESI-Spektren erfolgte unter Verwendung eines ThermoFisher Scientific Surveyor MSQ Gerätes. Hierbei wurde die Probe mit Hilfe einer Pumpe (Flussrate: 300 µL/Min, Lösungsmittel: MeOH/H₂O/HCOOH 50:50:0.1) injiziert. DC-MS Messungen wurden mit Hilfe eines zwischengeschalteten Camag TLC-MS Interface 2 durchgeführt. Alle ESI-MS Messungen wurden von der analytischen Massenspektrometrie Einheit der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

Hochaufgelöste-Massenspektrometrie (engl. *high resolution mass spectrometry*, HR-MS):

Zur Aufnahme von hochaufgelösten Massenspektren wurde ein ThermoFisher MALDI-LTQ Orbitrap XL (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI) Gerät verwendet. α -Cyano-4-hydroxymizsäure und 4-Chlor- α -cyanozimtsäure wurden als Matrixhilfsmittel verwendet. Alle HR-MS Messungen wurden von der analytischen Massenspektrometrie Einheit der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

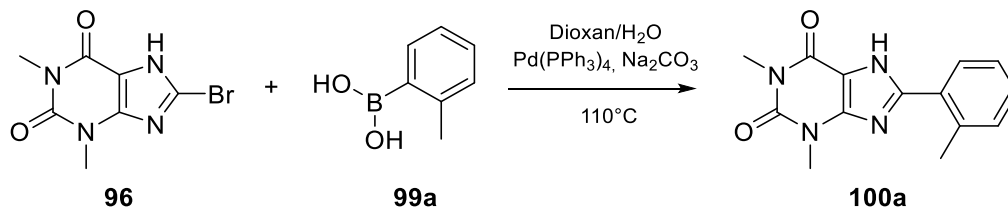
HPLC-Reinheitsbestimmung:

Alle synthetisierten Derivate wurden auf eine Reinheit ≥ 95 % mittels HPLC geprüft. Dazu wurde ein HPLC Waters 600 Kontroller Gerät (Waters, Milford, MA, USA) verwendet, welches mit einem Waters 2487 dualen Absorptionsdetektor, einem Waters 717 Plus Autosampler und einer MultoHigh 100 RP18-5 µM, 240x4 mm Säule (Phenomenex, Torrance, CA, USA) ausgestattet ist, verwendet. Als mobile Phase wurde ein Gradient (Lösungsmittel A: MeOH mit 0,1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: H₂O mit 0,1 % Ameisensäure, beginnend bei A/B mit dem Verhältnis 40 %/60 % für 5 Minuten, dann innerhalb der nächsten 20 Minuten bis zu 100 % MeOH mit 0,1 % Ameisensäure und die letzten 20 Minuten konstant mit 100 % MeOH mit 0,1 % Ameisensäure) mit einer Volumenflussrate von 1 mL/Minute verwendet. Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei Wellenlängen von $\lambda = 254$ nm und $\lambda = 280$ nm.

Die Durchführung aller Reinheitsbestimmungen wurde freundlicherweise von Astrid Kaiser (AK Prof. Dr. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie) übernommen.

Synthesevorschriften:

1,3-Dimethyl-8-(*o*-tolyl)-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100a**=GFS015)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), *o*-Toluolboronsäure (**99a**, 126 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für vier Stunden bei 110 °C gerührt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fiel ein farbloser Niederschlag aus. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Der gelbe Niederschlag wurde in Aceton umkristallisiert und der erhaltene farblose Niederschlag im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 47 mg (0,17 mmol, 22 %).

R_f = 0,7 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

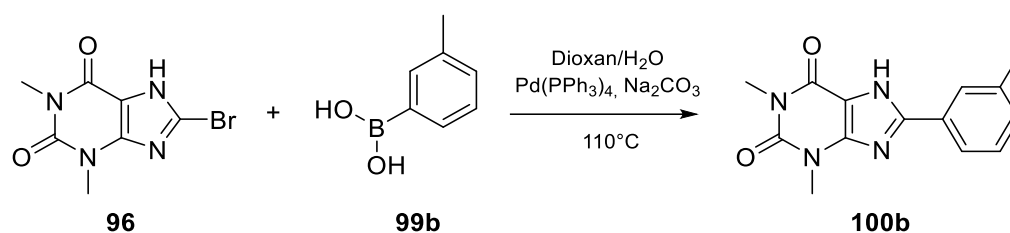
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,58 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 7,8, 0,8 Hz, 1H), 7,41-7,30 (m, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,27 (s, 3H), 2,54 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,27, 151,19, 150,59, 148,14, 137,02, 131,23, 129,81, 129,44, 128,58, 125,95, 107,09, 29,76, 27,80, 20,76 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 271,11 für C₁₄H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 271,12.

HR-MS: *m/z* berechnet 271,11895 für C₁₄H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 271,11913.

1,3-Dimethyl-8-(*m*-tolyl)-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100b**=GFS014)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 300 mg, 1,16 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (368 mg, 3,47 mmol, 3,00 Äq), *m*-Toluolboronsäure (**99b**, 189 mg, 1,39 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (67 mg, 0,058 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für vier Stunden bei 110 °C gerührt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fiel ein farbloser Niederschlag aus. Die Suspension wurde mit 50 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Der gelbe Niederschlag wurde mit Aceton gewaschen und der farblose Rückstand im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 115 mg (0,425 mmol, 37 %).

R_f = 0,5 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,78 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,93 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,39 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,29 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,50 (s, 3H), 3,26 (s, 3H), 2,37 (s, 3H) ppm.

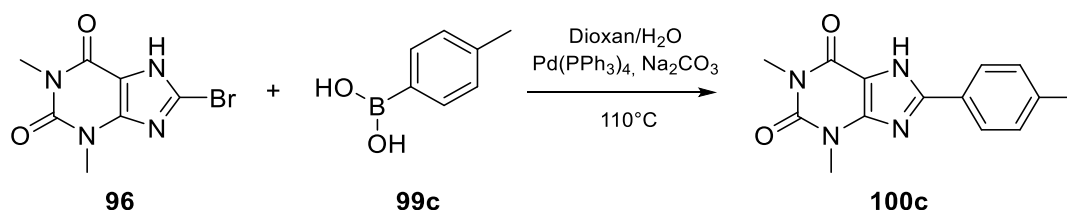
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,17, 151,17, 149,77, 148,44, 138,20, 130,83, 128,83, 128,59, 126,89, 123,47, 107,59, 29,76, 27,79, 20,99 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 271,11 für C₁₄H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 271,12.

HR-MS: *m/z* berechnet 271,11895 für C₁₄H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 271,11931.

Experimenteller Teil

1,3-Dimethyl-8-(*p*-tolyl)-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100c**=GFS017_NW01)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), *p*-Toluolboronsäure (**99c**, 126 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für fünf Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (1 x 40 mL) extrahiert, danach wurde die wässrige Phase mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (1 x 40 mL) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereint und restliches Rohprodukt mit CHCl₃ (2 x 40 mL) extrahiert. In der organischen Phase fiel ein farbloser Niederschlag aus, welcher abfiltriert und getrocknet wurde. Das Filtrat wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton umkristallisiert und der erhaltene farblose Feststoff im Vakuum getrocknet. Über ¹H-NMR Analysen beider Niederschläge konnte das Produkt identifiziert werden. Die Ausbeute betrug 92 mg (0,34 mmol, 44 %).

R_f = 0,7 (1:1 EtOAc/*n*-Hexan)

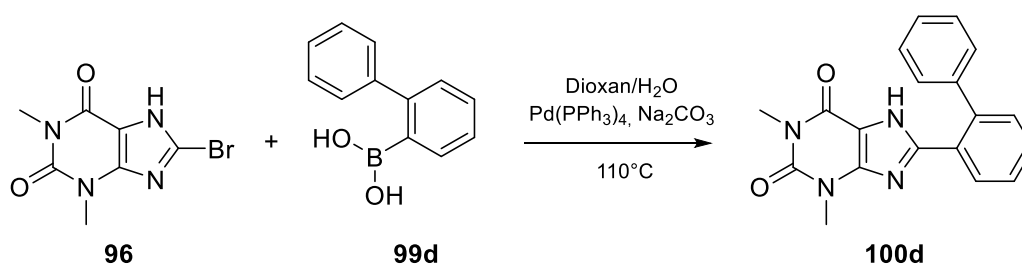
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,75 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,32 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 3,50 (s, 3H), 3,27 (s, 3H), 2,36 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,19, 151,23, 149,95, 148,55, 140,11, 129,55, 126,36, 126,02, 107,47, 29,79, 27,82, 21,01 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 271,11 für C₁₄H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 271,08.

HR-MS: *m/z* berechnet 271,11895 für C₁₄H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 271,11942.

8-([1,1'-Biphenyl]-2-yl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100d**=GFS021_NW05)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), [1,1'-Biphenyl]-2-yl-boronsäure (**99d**, 184 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für sechs Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton umkristallisiert. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 100 mg (0,301 mmol, 39 %).

R_f = 0,5 (1:1 EtOAc/*n*-Hexan)

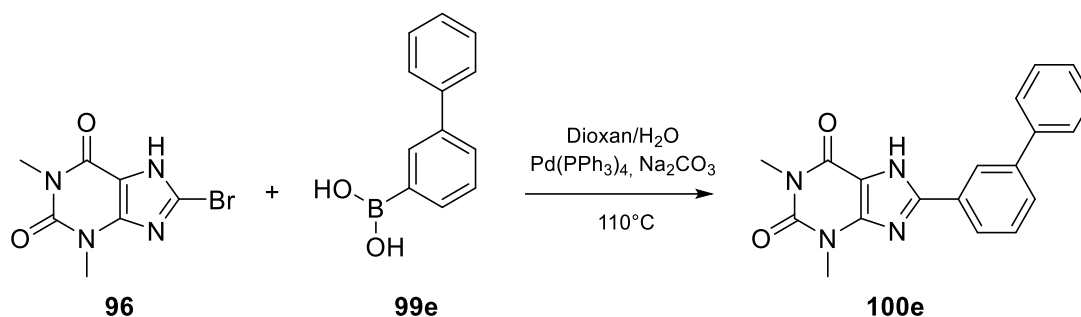
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,29 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 7,6, 1,0 Hz, 1H), 7,61 (td, *J* = 7,6, 1,4 Hz, 1H), 7,54-7,47 (m, 2H), 7,36-7,25 (m, 3H), 7,18-7,14 (m, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,21 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,17, 151,11, 150,64, 148,04, 141,30, 140,10, 130,69, 130,59, 130,31, 128,87, 128,36, 128,07, 127,45, 127,09, 107,08, 29,66, 27,77 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 333,13 für C₁₉H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 333,06.

HR-MS: *m/z* berechnet 333,13460 für C₁₉H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 333,13478.

8-([1,1'-Biphenyl]-3-yl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100e**=GFS019_NW03)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), [1,1'-Biphenyl]-3-yl-boronsäure (**99e**, 184 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für sechs Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (3 x 40 mL) extrahiert. In der organischen Phase fiel ein farbloser Niederschlag aus, welcher abfiltriert und getrocknet wurde. Mit Hilfe einer ¹H-NMR Analyse konnte das Produkt identifiziert werden. Die Ausbeute betrug 117 mg (0,352 mmol, 46 %).

R_f = 0,4 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

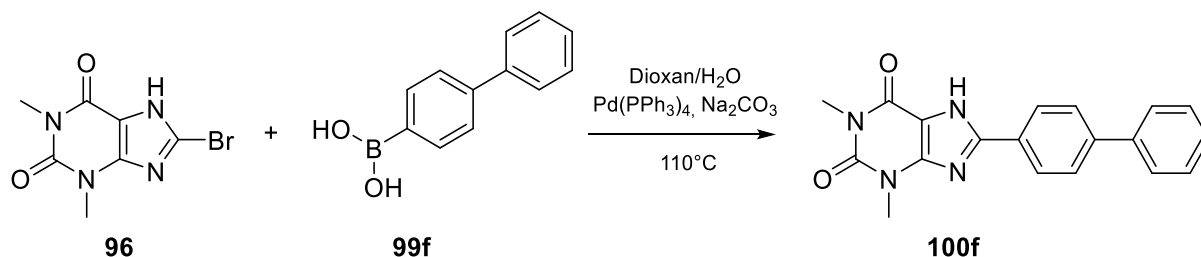
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,99 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,80 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,61 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,52 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 7,42 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 3,53 (s, 3H), 3,28 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,29, 151,25, 149,57, 148,51, 140,76, 139,28, 129,75, 129,31, 129,04, 128,32, 127,97, 126,79, 125,55, 124,35, 107,83, 29,86, 27,86 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 333,13 für C₁₉H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 333,11.

HR-MS: *m/z* berechnet 355,11655 für C₁₉H₁₆N₄O₂Na [M+Na]⁺, gefunden 355,11682.

8-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100f**=GFS020_NW04)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), [1,1'-Biphenyl]-4-yl-boronsäure (**99f**, 184 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für sechs Stunden bei 110 °C und anschließend 65 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt mit CHCl₃ (3 x 40 mL) extrahiert. In der organischen Phase fiel ein farbloser Niederschlag aus, welcher abfiltriert und getrocknet wurde. Mit Hilfe einer ¹H-NMR Analyse konnte das Produkt identifiziert werden. Die Ausbeute betrug 88 mg (0,26 mmol, 34 %).

R_f = 0,5 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

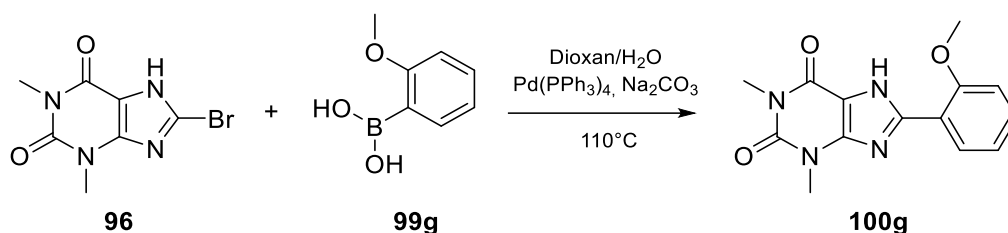
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,92 (s, 1H), 8,24 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,84 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,78-7,68 (m, 2H), 7,50 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,53 (s, 3H), 3,28 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,25, 151,24, 149,42, 148,61, 141,63, 139,07, 129,08, 128,05, 127,68, 127,16, 126,99, 126,74, 107,80, 29,83, 27,87 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 333,13 für C₁₉H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 333,05.

HR-MS: *m/z* berechnet 333,13460 für C₁₉H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 333,13541.

8-(2-Methoxyphenyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100g**=GFS024_NW08)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), (2-Methoxyphenyl)boronsäure (**99g**, 141 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für sieben Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton umkristallisiert. Der farblose Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 129 mg (0,451 mmol, 58 %).

R_f = 0,4 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

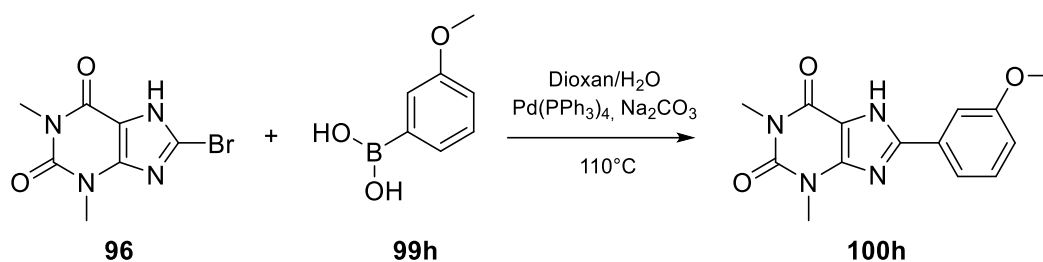
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 10,97 (s, 1H), 8,39 (dd, *J* = 7,8, 1,7 Hz, 1H), 7,45-7,43 (m, 1H), 7,15-7,12 (m, 1H), 7,07 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,08 (s, 3H), 3,67 (s, 3H), 3,45 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 157,04, 155,06, 152,05, 148,59, 148,52, 132,02, 130,09, 121,81, 116,45, 111,53, 106,95, 56,17, 30,23, 28,39 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 287,11 für C₁₄H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 287,06.

HR-MS: *m/z* berechnet 287,11387 für C₁₄H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 287,11429.

8-(3-Methoxyphenyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100h**=GFS022_NW06)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), (3-Methoxyphenyl)boronsäure (**99h**, 141 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für sieben Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (3 x 40 mL) extrahiert. In der organischen Phase fiel ein farbloser Feststoff aus, welcher abfiltriert und im Vakuum getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 22 mg (0,077 mmol, 10 %).

R_f = 0,6 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

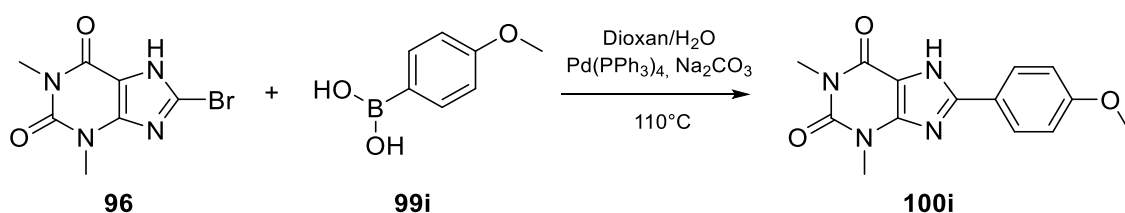
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,83 (s, 1H), 7,74-7,71 (m, 2H), 7,41 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,05-7,03 (m, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,50 (s, 3H), 3,26 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 159,61, 154,25, 151,22, 149,54, 148,43, 130,14, 129,93, 118,83, 116,46, 111,01, 107,70, 55,34, 29,81, 27,84 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 287,11 für C₁₄H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 287,12.

HR-MS: *m/z* berechnet 287,11387 für C₁₄H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 287,11433.

8-(4-Methoxyphenyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100i**=GFS023_NW07)



Versuchsdurchführung:

8-Bromotheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), (4-Methoxyphenyl)boronsäure (**99i**, 141 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für sechs Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (3 x 40 mL) extrahiert. In der organischen Phase fiel ein farbloser Feststoff aus, welcher abfiltriert und mit Aceton gewaschen wurde. Der Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 106 mg (0,370 mmol, 48 %).

R_f = 0,4 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

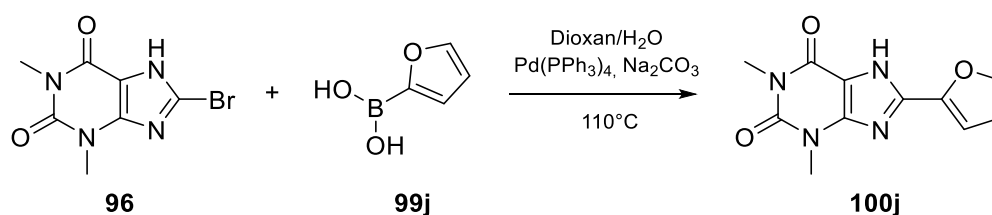
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,63 (s, 1H), 8,09 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,07 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,50 (s, 3H), 3,26 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 160,90, 154,13, 151,26, 150,00, 148,64, 128,12, 121,24, 114,43, 107,23, 55,41, 29,79, 27,81 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 287,11 für C₁₄H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 287,10.

HR-MS: *m/z* berechnet 287,11387 für C₁₄H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 287,11407.

8-(Furan-2-yl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100j**=GFS026_NW10)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), (2-Furyl)boronsäure (**99j**, 104 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für fünf Stunden bei 110 °C gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (6 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton umkristallisiert. Der farblose Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 72 mg (0,29 mmol, 38 %).

R_f = 0,5 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,91 (s, 1H), 7,90 (dd, *J* = 1,6, 0,6 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,70 (dd, *J* = 3,5, 1,8 Hz, 1H), 3,47 (s, 3H), 3,25 (s, 3H) ppm.

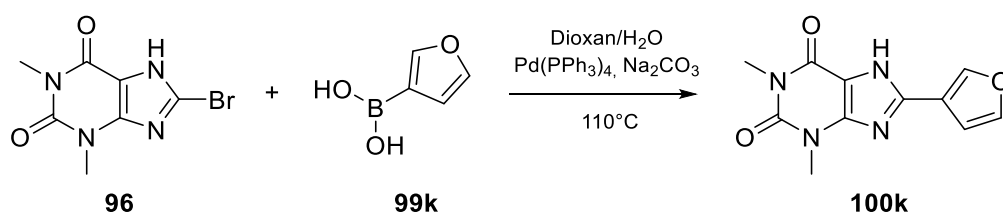
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,14, 151,19, 148,51, 145,18, 144,04, 142,04, 112,38, 111,48, 106,99, 29,83, 27,85 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 247,08 für C₁₁H₁₁N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 247,03.

HR-MS: *m/z* berechnet 247,08257 für C₁₁H₁₁N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 247,08285.

Experimenteller Teil

8-(Furan-3-yl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**100k**=GFS025_NW09)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), (3-Furyl)boronsäure (**99k**, 104 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenyl)phosphin palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für sechs Stunden bei 110 °C gerührt. Die Suspension wurde mit 40 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton umkristallisiert. Der farblose Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 26 mg (0,011 mmol, 14 %).

R_f = 0,6 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,67 (s, 1H), 8,36 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H), 7,83 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,09-7,05 (m, 1H), 3,46 (s, 3H), 3,25 (s, 3H) ppm.

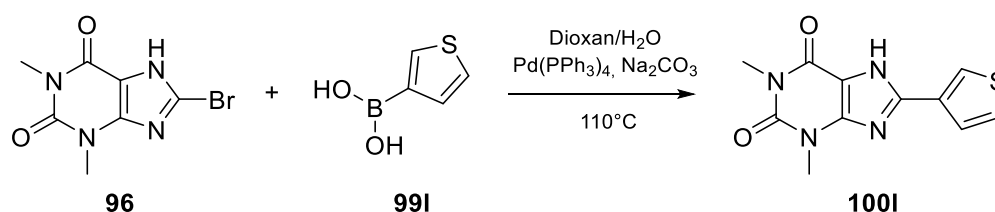
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,10, 151,21, 148,53, 144,81, 144,52, 143,02, 116,77, 108,52, 106,73, 29,85, 27,80 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 247,08 für C₁₁H₁₁N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 247,03.

HR-MS: *m/z* berechnet 247,08257 für C₁₁H₁₁N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 247,08276.

Experimenteller Teil

1,3-Dimethyl-8-(thiophen-3-yl)-3,7-dihydro-1*H*-purine-2,6-dion (**100I**=GFS055)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), (3-Thiophen)boronsäure (**99I**, 119 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für zehn Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 20 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (5 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton umkristallisiert. Der dunkelbraune Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 22 mg (0,085 mmol, 11 %).

R_f = 0,4 (1:1 EtOAc/*n*-Hexan)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,71 (s, 1H), 8,25 (dd, *J* = 2,9, 1,3 Hz, 1H), 7,75 (dd, *J* = 5,1, 1,2 Hz, 1H), 7,70 (dd, *J* = 5,1, 2,9 Hz, 1H), 3,48 (s, 3H), 3,26 (s, 3H).

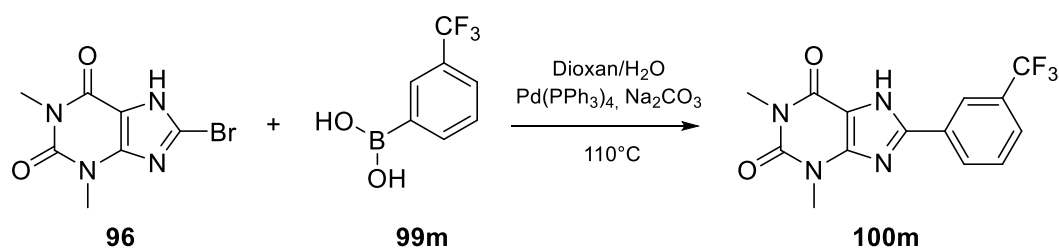
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,16, 151,18, 148,43, 146,46, 130,85, 127,83, 125,97, 125,92, 106,81, 29,77, 27,76 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 263,05 für C₁₁H₁₀N₄O₂S [M+H]⁺, gefunden 263,05.

HR-MS: *m/z* berechnet 263,05972 für C₁₁H₁₀N₄O₂S [M+H]⁺, gefunden 263,05991.

Experimenteller Teil

1,3-Dimethyl-8-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion (**100m**=GFS063)



Versuchsdurchführung:

8-Bromtheophyllin (**96**, 200 mg, 0,772 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (246 mg, 2,32 mmol, 3,00 Äq), (3-(Trifluoromethyl)phenyl)boronsäure (**99m**, 176 mg, 0,926 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (45 mg, 0,039 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in einem Zweihalskolben eingewogen und die Apparatur wurde drei Mal mit Argon gespült. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für 7,5 Stunden bei 110 °C und anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Suspension wurde mit 30 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und es fiel ein farbloser Niederschlag aus, der abfiltriert, mit heißem H₂O gewaschen und getrocknet wurde. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 58 mg (0,18 mmol, 23 %) erhalten werden.

R_f = 0,6 (1:1 EtOAc/*n*-Hexan)

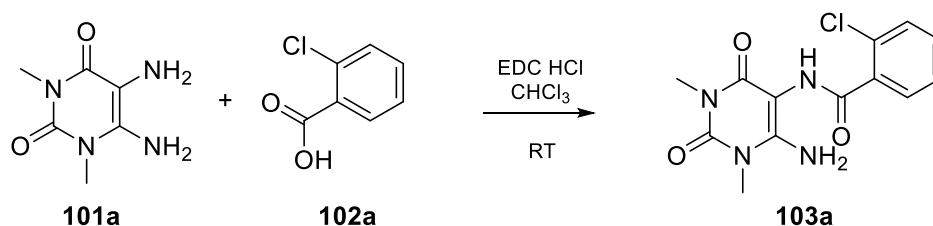
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 14,13 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,41 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,84 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,76 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,51 (s, 3H), 3,27 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,25, 151,14, 148,32, 147,86, 130,26, 130,08, 129,94, 129,69, 129,64, 129,43, 127,18, 126,51, 126,48, 125,02, 122,85, 122,70, 122,67, 108,18, 66,34, 29,80, 27,82 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 325,08 für C₁₄H₁₂F₃N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 325,20.

HR-MS: *m/z* berechnet 325,09069 für C₁₄H₁₂F₃N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 325,09078 *m/z*.

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-2-chlorbenzamid
(**103a**=**GFS077**+**103**)



Versuchsdurchführung:

5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**101a**, 100 mg, 0,588 mmol, 1,00 Äq), 2-Chlorbenzoesäure (**102a**, 101 mg, 0,646 mmol, 1,10 Äq) und EDC·HCl (135 mg, 0,705 mmol, 1,20 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die Suspension wurde für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Während der Reaktion fiel ein farbloser Niederschlag aus. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit CHCl₃ und heißem H₂O gewaschen. Der farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 123 mg (0,399 mmol, 68 %).

R_f = 0,4 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

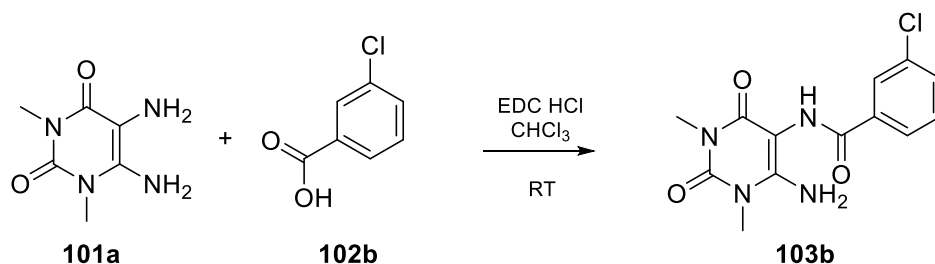
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8,95 (s, 1H), 7,80 (dd, *J* = 7,2, 1,7 Hz, 1H), 7,58-7,32 (m, 3H), 6,54 (s, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,15 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 166,67, 159,00, 151,91, 150,55, 136,41, 130,89, 130,35, 129,90, 129,58, 126,70, 87,16, 30,06, 27,55 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 331,06 für C₁₃H₁₃ClN₄O₃Na [M+Na]⁺, gefunden 330,97.

Experimenteller Teil

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3-chlorbenzamid (**103b**=GFS078)



Versuchsdurchführung:

5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**101a**, 100 mg, 0,588 mmol, 1,00 Äq), 3-Chlorbenzoesäure (**102b**, 101 mg, 0,646 mmol, 1,10 Äq) und EDC·HCl (135 mg, 0,705 mmol, 1,20 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die Suspension wurde für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Während der Reaktion fiel ein farbloser Niederschlag aus. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit CHCl₃ und heißem H₂O gewaschen. Der farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 146 mg (0,472 mmol, 80 %).

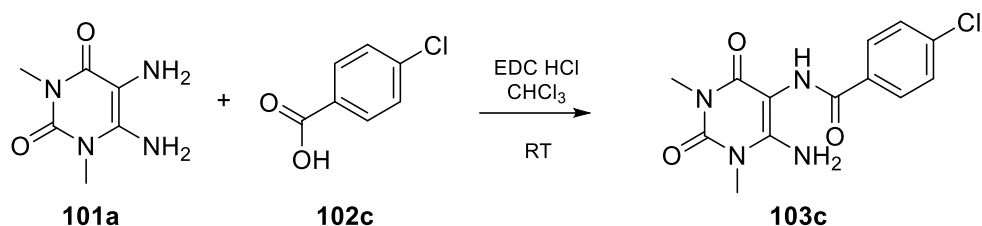
R_f = 0,4 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 9,04 (s, 1H), 8,04 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,91 (ddd, *J* = 7,7, 1,3, 1,3 Hz, 1H), 7,61 (ddd, *J* = 8,0, 2,1, 1,1 Hz, 1H), 7,51 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,78 (s, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,13 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 165,32, 159,22, 152,31, 150,59, 136,65, 132,81, 130,88, 129,94, 127,85, 126,66, 87,08, 30,00, 27,52 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 331,06 für C₁₃H₁₃ClN₄O₃Na [M+Na]⁺, gefunden 330,97.

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-4-chlorbenzamid
(**103c**=GFS087_LR12)



Versuchsdurchführung:

5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**101a**, 100 mg, 0,588 mmol, 1,00 Äq), 4-Chlorbenzoesäure (**102c**, 101 mg, 0,646 mmol, 1,10 Äq) und EDC·HCl (135 mg, 0,705 mmol, 1,20 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die Suspension wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Während der Reaktion fiel ein farbloser Niederschlag aus. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit heißem H₂O gewaschen. Der farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 151 mg (0,488 mmol, 83 %).

R_f = 0,4 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

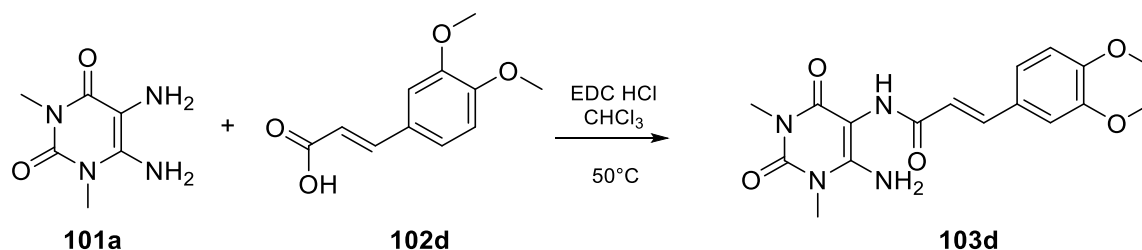
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 9,00 (s, 1H), 8,04-7,96 (m, 2H), 7,60-7,52 (m, 2H), 6,75 (s, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,13 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 165,64, 159,24, 152,31, 150,61, 135,90, 133,42, 129,93, 128,00, 87,21, 30,02, 27,53 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 331,06 für C₁₃H₁₃ClN₄O₃Na [M+Na]⁺, gefunden 331,17.

Experimenteller Teil

(*E*)-*N*-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylamid (**103d**=GFS038)



Versuchsdurchführung:

5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**101a**, 50 mg, 0,29 mmol, 1,0 Äq), (*E*)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylsäure (**102d**, 67 mg, 0,32 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (68 mg, 0,35 mmol, 1,2 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die Suspension wurde für 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Während der Reaktion entstand eine Lösung, aus der nach 15 Minuten ein farbloser Niederschlag ausfiel. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der farblose Niederschlag abfiltriert und mit heißem H₂O gewaschen. Der farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 57 mg (0,16 mmol, 53 %).

R_f = 0,6 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

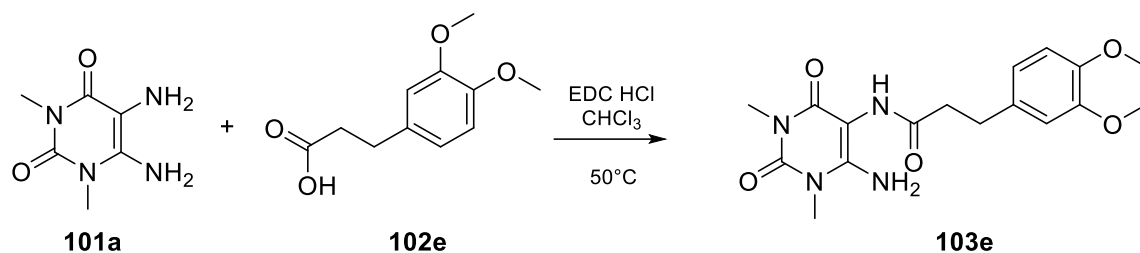
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8,51 (s, 1H), 7,40 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 7,20-7,13 (m, 2H), 7,01 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 6,64 (bs, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,13 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 165,57, 159,25, 151,86, 150,54, 150,09, 148,90, 138,76, 127,83, 121,14, 120,41, 111,85, 110,10, 87,61, 55,54, 55,42, 29,99, 27,54 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 421,16 für C₁₉H₂₅N₄O₇ [M+COOH]⁺, gefunden 421,06.

Experimenteller Teil

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propanamid (**103e**=**GFS037**)



Versuchsdurchführung:

5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil (**101a**, 50 mg, 0,29 mmol, 1,0 Äq), 3,4-Dimethoxyphenylpropionsäure (**102e**, 68 mg, 0,32 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (68 mg, 0,35 mmol, 1,2 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die farblose Lösung wurde für 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 20 mL einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung versetzt. Das Rohprodukt wurde mit CHCl₃ (5 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der gelbe Rückstand wurde mit heißem H₂O gewaschen und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Der farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 56 mg (0,15 mmol, 52 %).

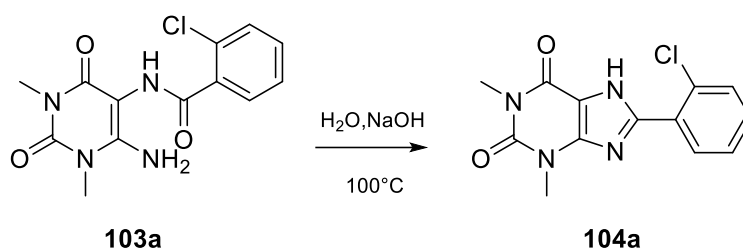
R_f = 0,5 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8,38 (s, 1H), 6,88-6,82 (m, 2H), 6,74 (dd, *J* = 8,2, 1,9 Hz, 1H), 6,44 (bs, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 3,11 (s, 3H), 2,84-2,76 (m, 2H), 2,55-2,52 (m, 2H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 172,18, 159,30, 151,98, 150,55, 148,64, 147,00, 134,08, 119,83, 112,17, 111,91, 87,51, 55,54, 55,34, 30,52, 30,00, 27,49 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 385,15 für C₁₇H₂₂N₄O₅Na [M+Na]⁺, gefunden 385,06.

8-(2-Chlorphenyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**104a**=GFS082_LR07)



Versuchsdurchführung:

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-2-chlorbenzamid (**103a**, 116 mg, 0,376 mmol, 1,00 Äq) wurde in 15 mL H₂O suspendiert. NaOH (150 mg, 3,76 mmol, 10,0 Äq) wurden zur vorherigen Suspension gegeben. Die Suspension wurde 2,5 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 30 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt. Dabei fiel ein Niederschlag aus. Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und mit heißem H₂O gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet und konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 47 mg (0,16 mmol, 43 %) erhalten werden.

R_f = 0,8 (3:1 EtOAc/*n*-Hexan)

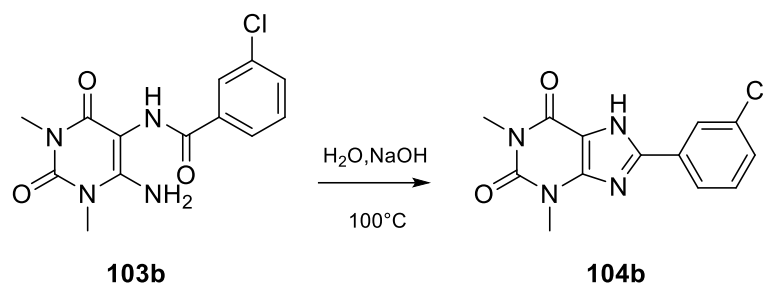
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,80 (s, 1H), 7,72 (dd, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 8,0, 1,3 Hz, 1H), 7,55 (td, *J* = 7,7, 1,8 Hz, 1H), 7,49 (td, *J* = 7,5, 1,3 Hz, 1H), 3,48 (s, 3H), 3,27 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,31, 151,15, 148,01, 147,66, 132,00, 131,92, 131,63, 130,30, 128,65, 127,36, 107,63, 29,82, 27,82 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 291,06 für C₁₃H₁₂ClN₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 291,11.

HR-MS: *m/z* berechnet 291,06433 für C₁₃H₁₂ClN₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 291,06444.

8-(3-Chlorphenyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion (**104b**=GFS084_LR09)



Versuchsdurchführung:

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3-chlorbenzamid (**103b**, 139 mg, 0,450 mmol, 1,00 Äq) wurde in 20 mL H₂O suspendiert. NaOH (180 mg, 4,50 mmol, 10,0 Äq) wurden zur vorherigen Suspension gegeben. Die Suspension wurde 2 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 30 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt. Dabei fiel ein Niederschlag aus. Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und mit heißem H₂O gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet und konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 78 mg (0,27 mmol, 59 %) erhalten werden.

R_f = 0,7 (3:1 EtOAc/*n*-Hexan)

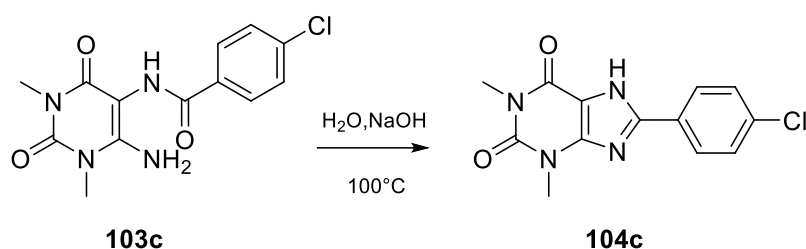
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 14,00 (s, 1H), 8,21-8,17 (m, 1H), 8,12-8,07 (m, 1H), 7,58-7,52 (m, 2H), 3,50 (s, 3H), 3,27 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,26, 151,15, 148,33, 147,95, 133,78, 130,96, 130,66, 129,88, 125,87, 124,88, 108,13, 29,78, 27,83 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 289,03 für C₁₃H₁₀ClN₄O₂ [M-H]⁻, gefunden 289,03.

HR-MS: *m/z* berechnet 291,06433 für C₁₃H₁₂ClN₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 291,06419.

8-(4-Chlorphenyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**104c**=GFS091_LR15)



Versuchsdurchführung:

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-4-chlorbenzamid (**103c**, 148 mg, 0,478 mmol, 1,00 Äq) wurde in 20 mL H₂O suspendiert. NaOH (191 mg, 4,78 mmol, 10,0 Äq) wurden zur vorherigen Suspension gegeben. Die Suspension wurde 3 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 30 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt. Dabei fiel ein Niederschlag aus. Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und mit heißem H₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde in CH₂Cl₂/MeOH umkristallisiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 53 mg (0,18 mmol, 38 %) erhalten werden.

R_f = 0,6 (3:1 EtOAc/*n*-Hexan)

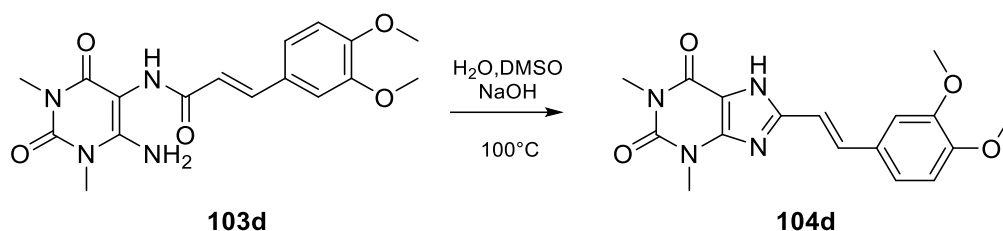
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,95 (s, 1H), 8,18-8,12 (m, 2H), 7,63-7,57 (m, 2H), 3,51 (s, 3H), 3,27 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,27, 151,18, 148,55, 148,46, 134,83, 129,09, 128,06, 127,65, 108,00, 29,78, 27,82 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 291,06 für C₁₃H₁₂ClN₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 291,14.

HR-MS: *m/z* berechnet 291,06433 für C₁₃H₁₂ClN₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 291,06451.

(*E*)-8-(3,4-Dimethoxystyryl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**104d**=GFS044)



Versuchsdurchführung:

(*E*)-*N*-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylamid (**103d**, 32 mg, 0,090 mmol, 1,0 Äq) wurde in 1,5 mL DMSO suspendiert. NaOH (36 mg, 0,90 mmol, 10 Äq) wurden in 1,5 mL H₂O gelöst und zur vorherigen Suspension gegeben. Die Suspension färbte sich grün und wurde 3 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 10 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt. Dabei fiel ein Niederschlag aus. Die Suspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und mit heißem H₂O gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet und konnte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 8 mg (0,02 mmol, 25 %) erhalten werden.

R_f = 0,5 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

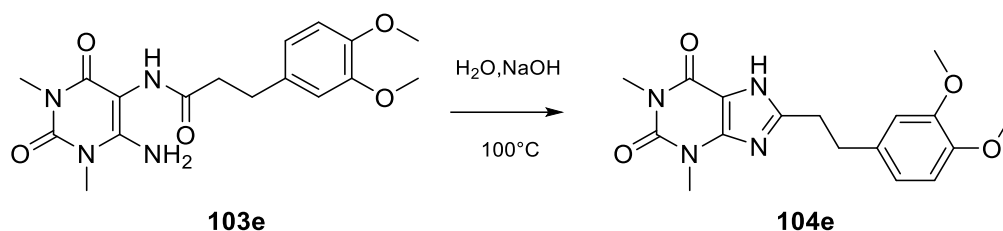
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7,60 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,13 (dd, *J* = 8,3, 1,5 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,94 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,25 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 153,94, 151,19, 149,94, 149,88, 149,04, 148,58, 135,43, 128,27, 121,03, 113,48, 111,79, 109,58, 106,84, 55,56, 55,53, 29,73, 27,74 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 343,13 für C₁₇H₁₉N₄O₄ [M+H]⁺, gefunden 343,00.

HR-MS: *m/z* berechnet 343,14008 für C₁₇H₁₉N₄O₄ [M+H]⁺, gefunden 343,14009.

8-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**104e**=**GFS040**)



Versuchsdurchführung:

N-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propanamid (**103e**, 52 mg, 0,14 mmol, 1,0 Äq) wurde in 5 mL H₂O suspendiert. Es wurde NaOH (57 mg, 1,4 mmol, 10 Äq) hinzugegeben und 2 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 20 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt. Das Rohprodukt wurde mit EtOAc (5 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Die Ausbeute des farblosen Festoffs betrug 40 mg (0,12 mmol, 81 %).

R_f = 0,7 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

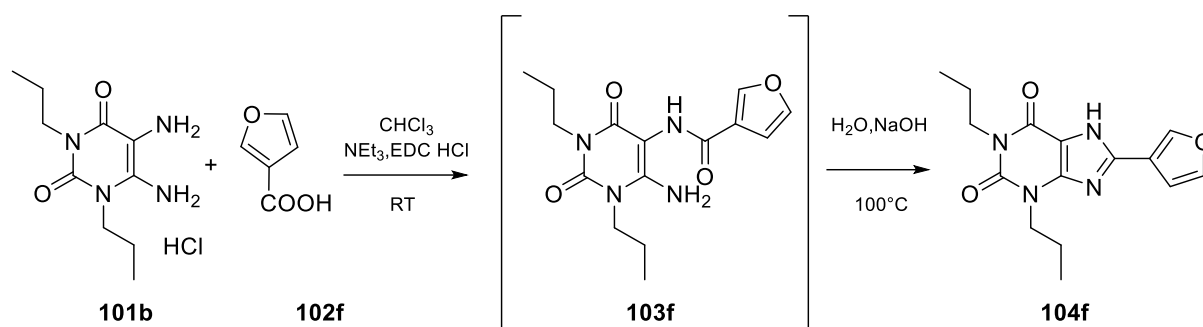
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,19 (s, 1H), 6,86-6,81 (m, 2H), 6,70 (dd, *J* = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 3,43 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 2,99-2,93 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 153,98, 153,52, 151,18, 148,59, 148,02, 147,20, 132,94, 120,00, 112,20, 111,85, 105,98, 55,49, 55,34, 32,87, 30,34, 29,72, 27,66 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 345,15 für C₁₇H₂₁N₄O₄ [M+H]⁺, gefunden 345,02.

HR-MS: *m/z* berechnet 345,15573 für C₁₇H₂₁N₄O₄ [M+H]⁺, gefunden 345,15608.

8-(Furan-3-yl)-1,3-dipropyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**104f**=**GFS136**)



Versuchsdurchführung:

5,6-Diamino-1,3-dipropylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion Hydrochlorid (**101b**, 25 mg, 0,095 mmol, 1,0 Äq) wurde mit NEt₃ (13 µL, 0,095 mmol, 1,0 Äq) in 0,5 mL CHCl₃ gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe der 3-Furancarbonsäure (**102f**, 12 mg, 0,10 mmol, 1,1 Äq) und EDC-HCl (22 mg, 0,11 mmol, 1,2 Äq). Die gelbe Lösung wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden 30 mL einer gesättigten wässrigen K₂CO₃-Lösung hinzugegeben und das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (5 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL einer 2 M NaOH-Lösung gelöst und 2 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 10 mL einer 5 % (V/V) HCl-Lösung hinzugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit heißem Aceton gewaschen. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 8 mg (0,02 mmol, 24 %) isoliert werden.

R_f = 0,3 (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

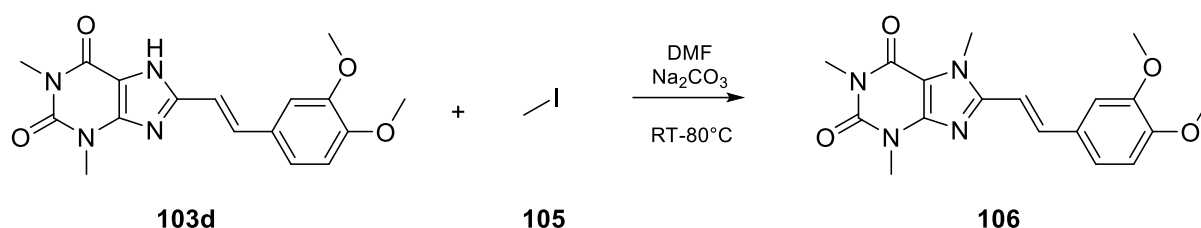
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13,65 (s, 1H), 8,36 (dd, *J* = 1,4, 0,7 Hz, 1H), 7,83 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,08 (dd, *J* = 1,8, 0,7 Hz, 1H), 4,01-3,96 (m, 2H), 3,88-3,84 (m, 2H), 1,77-1,68 (m, 2H), 1,62-1,52 (m, 2H), 0,88 (q, *J* = 7,6 Hz, 6H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 153,90, 150,63, 148,29, 144,73, 144,63, 143,02, 116,73, 108,54, 106,75, 44,36, 42,09, 20,83, 20,79, 11,15, 10,97 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 303,14 für C₁₅H₁₉N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 303,21.

HR-MS: *m/z* berechnet 303,14517 für C₁₅H₁₉N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 303,14549.

(*E*)-8-(3,4-Dimethoxystyryl)-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**106**=GFS079)



Versuchsdurchführung:

(*E*)-8-(3,4-Dimethoxystyryl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**103d**, 104 mg, 0,305 mmol, 1,00 Äq) wurde in 10 mL DMF suspendiert. Dann wurde Na₂CO₃ (39 mg, 0,37 mmol, 1,2 Äq) und Methyljodid (**105**, 190 µL, 3,05 mmol, 10,0 Äq) hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 80 °C bis zur vollständigen Auflösung erhitzt und wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und weitere 71 Stunden gerührt. Die Lösung wurde mit 30 mL einer 10 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der gelbe Feststoff wurde abfiltriert und in CHCl₃/MeOH umkristallisiert. Der grüne Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 21 mg (0,059 mmol, 20 %).

R_f = 0,7 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

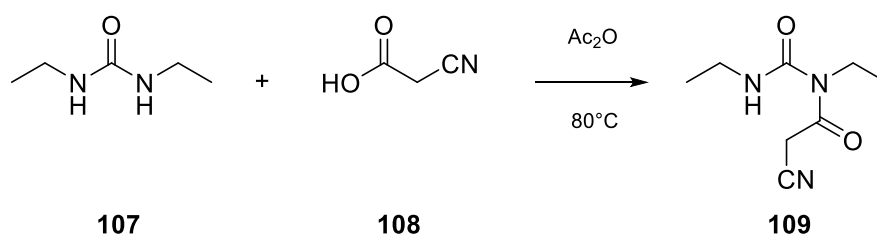
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7,63 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H), 7,42 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,28 (dd, *J* = 8,4, 1,9 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,03 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,23 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 154,29, 151,00, 150,11, 150,09, 149,01, 148,08, 136,99, 128,44, 121,82, 111,66, 110,33, 110,06, 107,03, 55,69, 55,55, 31,42, 29,39, 27,50 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 357,15 für C₁₈H₂₁N₄O₄ [M+H]⁺, gefunden 357,14.

HR-MS: *m/z* berechnet 357,15573 für C₁₈H₂₁N₄O₄ [M+H]⁺, gefunden 357,15573.

2-Cyano-*N*-ethyl-*N*-(ethylcarbamoyl)acetamid (**109**=GFS081_LR06)



Versuchsdurchführung:

Diethylharnstoff (**107**, 1000 mg, 8,609 mmol, 1,000 Äq) wurde mit Essigsäureanhydrid (10,2 mL, 108 mmol, 12,5 Äq) versetzt. Dann wurde Cyanoessigsäure (**108**, 806 mg, 9,47 mmol, 1,10 Äq) hinzugegeben. Die entstandene Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei 80°C gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 30 mL H_2O versetzt. Das Rohprodukt wurde mit CH_2Cl_2 (4 x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt konnte als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 834 mg (4,55 mmol, 53 %) erhalten werden.

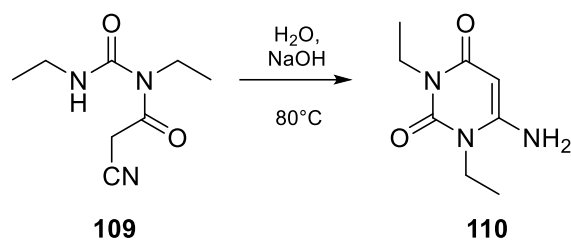
$R_f = 0,4$ (2:1 EtOAc/*n*-Hexan + 2 % NEt_3)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 8,57$ (bs, 1H), 3,83-3,69 (m, 4H), 3,34 (qd, $J = 7,3, 5,4$ Hz, 2H), 1,27 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,19 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 165,29, 153,24, 40,36, 35,83, 28,27, 22,31, 14,86, 14,79$ ppm.

ESI-MS: m/z berechnet 206,09 für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gefunden 205,97.

6-Amino-1,3-diethylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**110**=GFS083_LR08)



Versuchsdurchführung:

2-Cyano-*N*-ethyl-*N*-(ethylcarbamoyl)acetamid (**109**, 834 mg, 4,55 mmol, 1,00 Äq) wurde in 20 mL H₂O suspendiert. NaOH (182 mg, 4,55 mmol, 1,00 Äq) wurden zur vorherigen Suspension gegeben. Die Suspension wurde 2 Stunden bei 80 °C gerührt. Bereits nach 10 Minuten fiel ein farbloser Feststoff aus. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und eine weitere Stunde gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 415 mg (2,27 mmol, 50 %) erhalten werden.

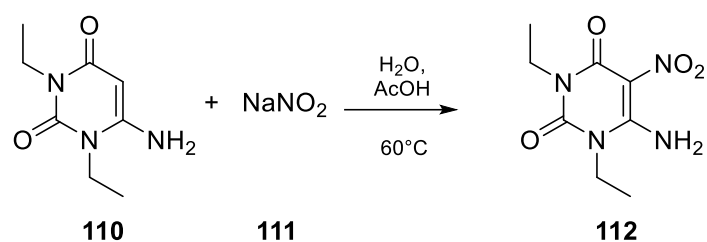
R_f = 0,0 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 6,78 (s, 1H), 4,65 (s, 1H), 3,82 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,74 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,10 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H), 1,02 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 160,98, 154,06, 150,85, 75,11, 36,92, 34,71, 13,22, 13,16 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 184,10 für C₈H₁₄N₃O₂ [M+H]⁺, gefunden 184,22.

6-Amino-1,3-diethyl-5-nitropyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**112**=GFS085_LR10)



Versuchsdurchführung:

6-Amino-1,3-diethylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**110**, 415 mg, 2,27 mmol, 1,00 Äq) wurde in 10 mL H₂O und 10 mL AcOH gelöst. NaNO₂ (**111**, 188 mg, 2,72 mmol, 1,20 Äq) wurde portionsweise hinzugegeben. Die pinke Lösung wurde 2 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung in einem Eisbad über 24 Stunden stehen gelassen. Dabei fiel ein violetter Niederschlag aus, welcher abfiltriert und getrocknet wurde. Das Filtrat wurde mit einer 1 M NaOH-Lösung neutralisiert und das Rohprodukt wurde mit EtOAc (4 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet und konnte als violetter Feststoff mit einer Ausbeute von 267 mg (1,17 mmol, 52 %) erhalten werden.

R_f = 0,6 (99:1 CH₂Cl₂/MeOH)

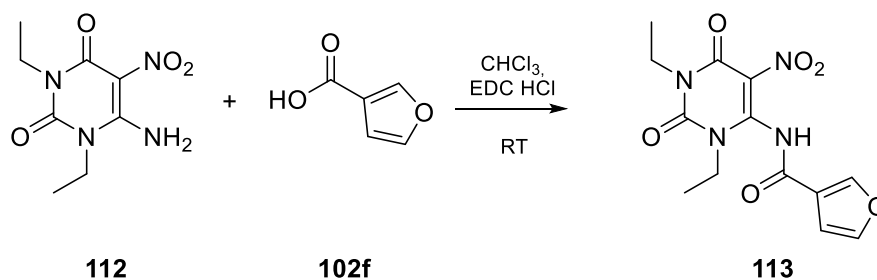
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,17 (s, 1H), 9,12 (s, 1H), 4,00-3,82 (m, 4H), 1,24-0,97 (m, 6H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 159,71, 148,60, 145,25, 139,06, 36,62, 36,03, 12,94, 12,00 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 235,11 für C₈H₁₂N₄O₄Li [M+Li]⁺, gefunden 235,16.

Experimenteller Teil

N-(1,3-Diethyl-5-nitro-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)furan-3-carboxamid
(**113**=GFS108, GFS111)



Versuchsdurchführung:

6-Amino-1,3-diethyl-5-nitropyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**112**, 200 mg, 0,876 mmol, 1,00 Äq), 3-Furancarbonsäure (**102f**, 108 mg, 0,964 mmol, 1,10 Äq) und EDC-HCl (202 mg, 1,05 mmol, 1,20 Äq) wurden in 5 mL trockenem CHCl_3 gelöst. Die braune Lösung wurde 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (48:2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). Der erhaltene braune Feststoff wurde im Vakuum getrocknet und das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 140 mg (0,433 mmol, 49 %) erhalten werden.

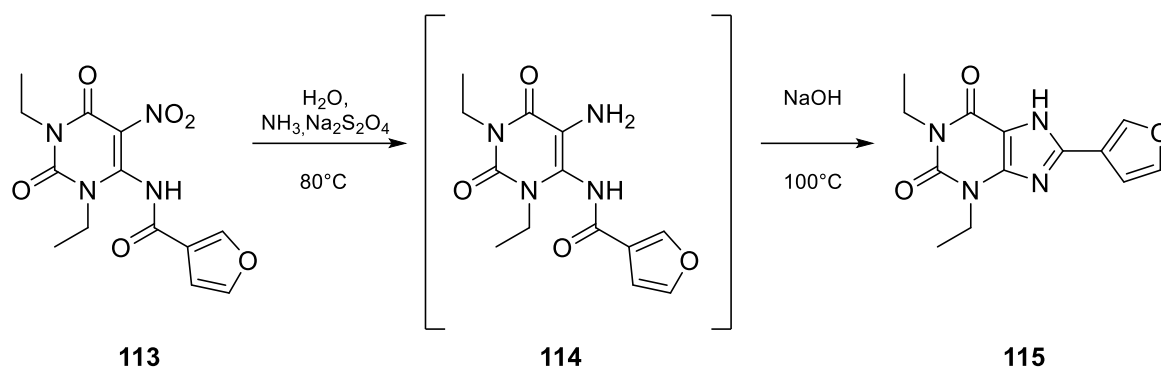
$R_f = 0,9$ (48:2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 8,38$ (dd, $J = 1,5, 0,7$ Hz, 1H), 8,26 (dd, $J = 1,5, 0,7$ Hz, 0,5H), 7,94 (dd, $J = 1,5, 0,8$ Hz, 0,5H), 7,54-7,53 (m, 1H), 7,49-7,48 (m, 0,5H), 7,47-7,46 (m, 0,5H), 6,96 (dd, $J = 1,9, 0,7$ Hz, 1H), 6,85 (dd, $J = 1,9, 0,7$ Hz, 0,5H), 6,78 (dd, $J = 1,9, 0,8$ Hz, 0,5H), 4,19 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H), 4,12-3,95 (m, 7H), 1,36 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,31-1,25 (m, 10H) ppm. Aufgrund von Rotationsisomerie wurde eine Signalaufspaltung und größere Integrale (1 : 0,5 : 0,5) detektiert.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 172,20, 158,00, 157,22, 156,00, 152,03, 151,62, 150,67, 150,41, 149,02, 148,98, 147,29, 144,79, 144,70, 143,97, 141,26, 138,64, 134,73, 123,62, 115,80, 115,63, 110,05, 109,89, 40,18, 38,49, 38,04, 37,90, 13,28, 13,25, 13,23, 12,71$ ppm.

MALDI-MS: m/z berechnet 346,08 für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gefunden 345,98.

1,3-Diethyl-8-(furan-3-yl)-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (**115**=**GFS110**, **GFS113**)



Versuchsdurchführung:

N-(1,3-Diethyl-5-nitro-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)furan-3-carboxamid (**113**, 140 mg, 0,433 mmol, 1,00 Äq) wurde mit 3 mL 12,5 % (V/V) wässriger Ammoniak-Lösung versetzt. Die entstandene violette Lösung wurde auf 80 °C erhitzt und Natriumdithionit (249 mg, 1,43 mmol, 3,30 Äq) hinzugegeben, woraufhin ein Farbwechsel nach gelb stattfand. Nach 4 Stunden wurde Natriumhydroxid (173 mg, 4,33 mmol, 10,0 Äq) hinzugegeben und die klare Lösung 3 Stunden bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden 20 mL einer 5 % (V/V) HCl-Lösung hinzugefügt und es wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 9 mg (0,03 mmol, 7 %) isoliert werden.

$R_f = 0,4$ (2:1 EtOAc/*n*-Hexan)

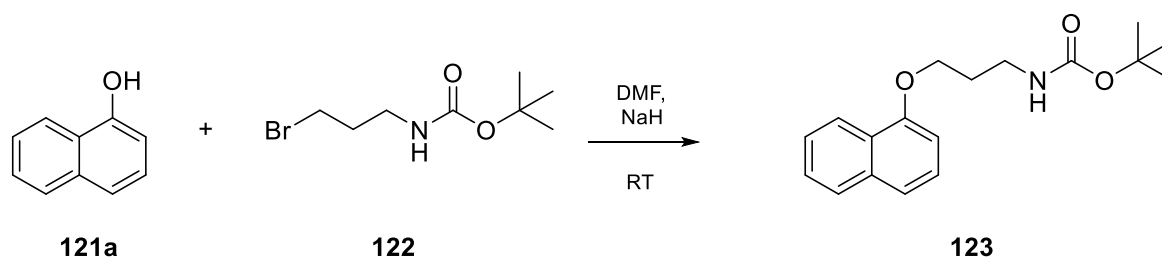
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 13,67$ (s, 1H), 8,39-8,33 (m, 1H), 7,83 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H), 7,09 (dd, $J = 1,8, 0,6$ Hz, 1H), 4,06 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,94 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,25 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 153,70, 150,19, 147,99, 144,76, 144,70, 143,05, 116,74, 108,54, 106,91, 38,05, 35,70, 13,21$ ppm.

ESI-MS: m/z berechnet 275,11 für C₁₃H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 275,14.

HR-MS: m/z berechnet 275,11387 für C₁₃H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺, gefunden 275,11417.

tert-Butyl-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)carbamat (**123**=GFS121)



Versuchsdurchführung:

1-Naphthol (**121a**, 100 mg, 0,693 mmol, 1,00 Äq) wurde unter einer Argon-Atmosphäre in 1 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von Natriumhydrid in Paraffinöl (60 % m/m, 33 mg, 0,83 mmol, 1,2 Äq). Die Lösung färbte sich grün und es trat eine lebhaft Gasentwicklung auf. Die Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt bis die Gasentwicklung abgeklungen war. Dann wurde *tert*-Butyl-(3-bromopropyl)carbamat (**122**, 198 mg, 0,832 mmol, 1,20 Äq) in 2 mL trockenem DMF hinzugegeben. Dabei färbte sich die Lösung braun, welche 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Anschließend wurden 40 mL EtOAc hinzugegeben und die organische Phase wurde mit H₂O (5 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und säulenchromatographisch aufgereinigt (9:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt₃). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 185 mg (0,613 mmol, 88 %) erhalten werden.

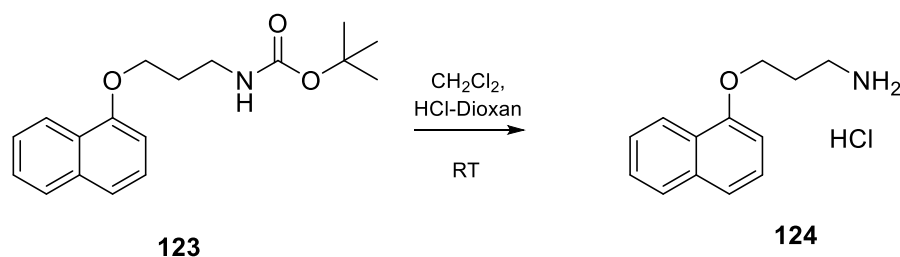
R_f = 0,3 (9:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt₃)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 8,30-8,21 (m, 1H), 7,85-7,75 (m, 1H), 7,54-7,32 (m, 4H), 6,81 (dd, *J* = 7,4, 1,0 Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,22 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,44 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,13 (p, *J* = 6,3 Hz, 2H), 1,45 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 156,19, 154,62, 134,65, 127,65, 126,55, 125,98, 125,72, 125,38, 122,02, 120,53, 104,73, 66,26, 38,62, 29,79, 28,56 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 324,16 für C₁₈H₂₃NO₃Na [M+Na]⁺, gefunden 324,10.

3-(Naphthalen-1-yloxy)propan-1-amin Hydrochlorid (**124**=GFS126)



Versuchsdurchführung:

tert-Butyl-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)carbamate (**123**, 178 mg, 0,592 mmol, 1,00 Äq) wurde in 3 mL CH_2Cl_2 gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe einer HCl-Dioxan-Lösung (4 M, 590 μl , 2,37 mmol, 4,00 Äq). Die Lösung wurde 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum konnte das Produkt als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 113 mg (0,474 mmol, 80 %) erhalten werden.

$R_f = 0,4$ (4:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt_3)

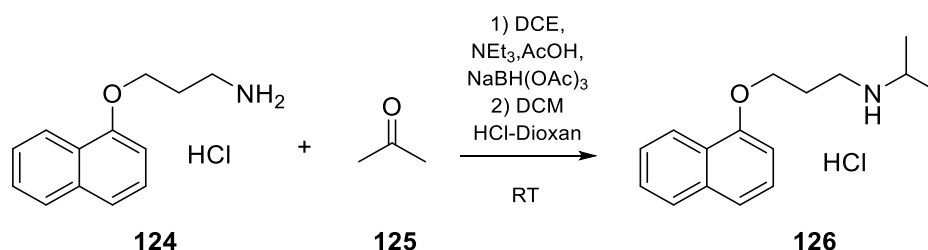
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 8,29-8,08$ (m, 4H), 7,91-7,84 (m, 1H), 7,56-7,46 (m, 3H), 7,42 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,97 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 4,26 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 3,07 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,23-2,15 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 153,75, 134,00, 127,47, 126,45, 126,18, 125,27, 124,86, 121,48, 120,03, 105,22, 64,85, 36,31, 26,91$ ppm.

ESI-MS: m/z berechnet 202,12 für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 201,90.

HR-MS: m/z berechnet 202,12264 für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 202,12281.

N-iso-Propyl-3-(naphthalen-1-yloxy)propan-1-amin Hydrochlorid (**126**=**GFS130**)



Versuchsdurchführung:

3-(Naphthalen-1-yloxy)propan-1-amin Hydrochlorid (**124**, 88 mg, 0,37 mmol, 1,0 Äq) wurde unter einer Argon-Atmosphäre mit 2 mL 1,2-Dichlorethan (DCE) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von NEt₃ (100 µL, 0,743 mmol, 2,00 Äq), Aceton (**125**, 36 µL, 0,48 mmol, 1,3 Äq) und AcOH (28 µL, 0,48 mmol, 1,3 Äq). Die Suspension wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von NaBH(OAc)₃ (236 mg, 1,11 mmol, 3,00 Äq). Die Lösung wurde 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 20 mL einer NaOH-Lösung (2 M) hinzugegeben und das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (1 x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit H₂O (3 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde eine HCl-Dioxan-Lösung (4 M) (371 µL, 1,49 mmol, 4,00 Äq) und 1 mL CH₂Cl₂ hinzugegeben und die Suspension 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene farblose Feststoff wurde abfiltriert und mit CH₂Cl₂ gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum konnte das Produkt mit einer Ausbeute von 48 mg (0,17 mmol, 46 %) isoliert werden.

R_f = 0,5 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

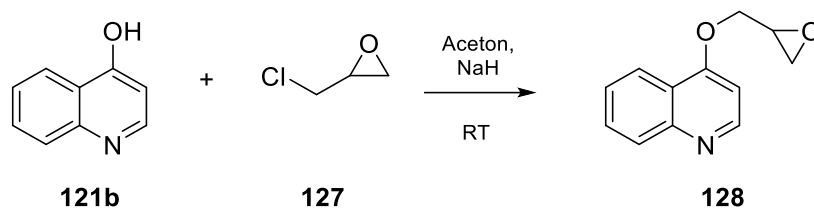
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 9,04 (s, 2H), 8,23-8,17 (m, 1H), 7,87 (dd, *J* = 7,3, 1,9 Hz, 1H), 7,56-7,46 (m, 3H), 7,45-7,39 (m, 1H), 7,01-6,95 (m, 1H), 4,27 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,38-3,27 (m, 1H), 3,18-3,12 (m, 2H), 2,30-2,24 (m, 2H), 1,28 (d, *J* = 6,5 Hz, 6H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 153,74, 134,00, 127,47, 126,45, 126,18, 125,28, 124,84, 121,48, 120,07, 105,23, 65,04, 49,42, 41,36, 25,80, 18,57 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 244,17 für C₁₆H₂₂NO [M+H]⁺, gefunden 244,05.

HR-MS: *m/z* berechnet 244,16959 für C₁₆H₂₂NO [M+H]⁺, gefunden 244,17072.

4-(Oxiran-2-ylmethoxy)chinolin (**128**=GFS139_AH7, GFS140_AH8)



Versuchsdurchführung:

Chinolin-4-ol (**121b**, 1,50 g, 10,3 mmol, 1,00 Äq) wurde mit 10 mL Aceton versetzt. Dann wurde Natriumhydrid in Paraffinöl (60 % m/m, 455 mg, 11,4 mmol, 1,10 Äq) hinzugegeben. Es trat eine lebhafte Gasentwicklung auf. Die orangene Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt bis die Gasentwicklung beendet war. Dann erfolgte die Zugabe von *rac*-Epichlorhydrin (**127**, 2,64 mL, 34,1 mmol, 3,30 Äq) und es wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Allmählich entstand ein farbloser Niederschlag. Aceton wurde entfernt und der Rückstand wurde in 15 mL CH₂Cl₂ aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H₂O (3 x 15 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) aus der wässrigen Phase extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (19:1 CH₂Cl₂/MeOH). Das Produkt konnte als braunes Öl mit einer Ausbeute von 571 mg (2,84 mmol, 27 %) erhalten werden.

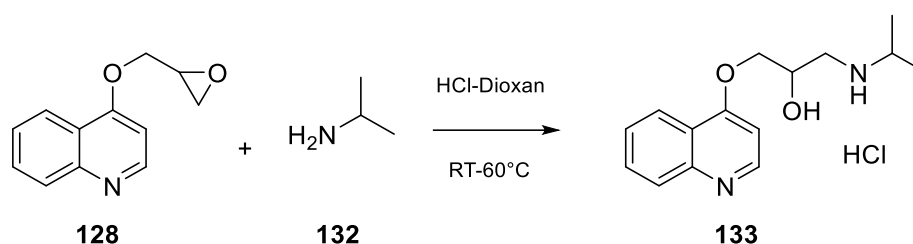
R_f = 0,6 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 8,40 (dd, *J* = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 7,63 (ddd, *J* = 8,6, 7,0, 1,6 Hz, 1H), 7,51-7,44 (m, 2H), 7,39-7,29 (m, 1H), 6,21 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,47 (dd, *J* = 15,8, 2,3 Hz, 1H), 4,10 (dd, *J* = 15,8, 5,5 Hz, 1H), 3,35-3,28 (m, 1H), 2,84 (t, *J* = 4,2 Hz, 1H), 2,51 (dd, *J* = 4,4, 2,6 Hz, 1H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 178,21, 143,59, 140,29, 132,42, 127,16, 127,10, 123,91, 115,36, 110,41, 53,75, 49,89, 45,25 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 202,09 für C₁₂H₁₂NO₂ [M+H]⁺, gefunden 202,16.

1-(*iso*-Propylamino)-3-(chinolin-4-yloxy)propan-2-ol Hydrochlorid (**133**=GFS143)



Versuchsdurchführung:

4-(Oxiran-2-ylmethoxy)chinolin (**128**, 571 mg, 2,84 mmol, 1,00 Äq) wurde in *iso*-Propylamin (**132**, 9,73 mL, 114 mmol, 40,0 Äq) gelöst und für 7 Stunden bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion 24 Stunden bei Raumtemperatur und danach erneut 3 Stunden bei 60 °C gerührt. Das überschüssige *iso*-Propylamin wurde entfernt und der Rückstand wurde in 5 mL CH₂Cl₂ gelöst. Von der homogenen Lösung wurden 2,5 mL entnommen und diese mit einer HCl-Dioxan-Lösung (4 M, 2,84 mL, 11,4 mmol, 8,00 Äq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und nach Waschen mit MeOH konnte die Zielverbindung als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 366 mg (1,23 mmol, 87 % berechnet anhand der halben Ansatzmenge) erhalten werden.

R_f = 0,5 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

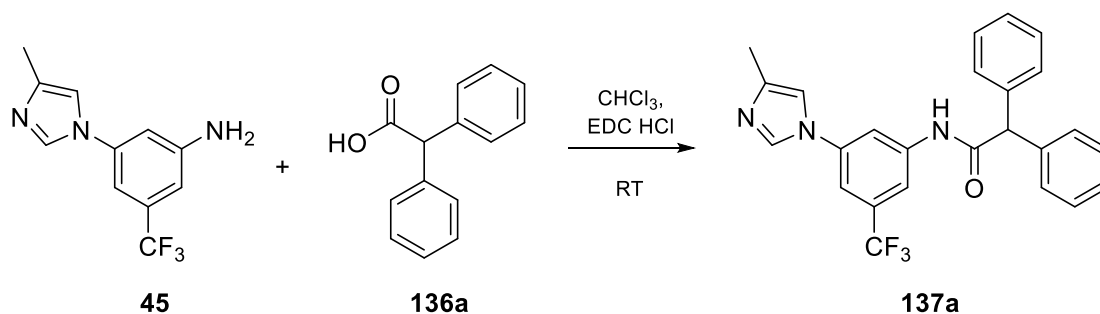
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 9,26 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,56 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,36 (dd, J = 8,2, 1,4 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,98 (ddd, J = 8,7, 7,0, 1,5 Hz, 1H), 7,69 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 4,94 (dd, J = 14,1, 2,6 Hz, 1H), 4,40 (dd, J = 14,2, 9,5 Hz, 1H), 4,36-4,28 (m, 1H), 3,37-3,26 (m, 2H), 3,06-2,96 (m, 1H), 1,29 (d, J = 4,1 Hz, 3H), 1,28 (d, J = 4,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 172,49, 148,74, 139,65, 133,70, 126,05, 124,94, 123,37, 118,09, 106,46, 64,77, 56,93, 49,93, 46,76, 18,59, 18,24 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 261,16 für C₁₅H₂₁N₂O₂ [M+H]⁺, gefunden 261,14.

HR-MS: *m/z* berechnet 261,15975 für C₁₅H₂₁N₂O₂ [M+H]⁺, gefunden 261,16004.

N-(3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)-2,2-diphenylacetamid
(**137a**=GFS093)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 100 mg, 0,415 mmol, 1,00 Äq), 2,2-Diphenylelessigsäure (**136a**, 97 mg, 0,46 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (95 mg, 0,50 mmol, 1,2 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (2:1 *n*-Hexan/Aceton). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 152 mg (0,361 mmol, 87 %) erhalten werden.

R_f = 0,3 (2:1 *n*-Hexan/Aceton)

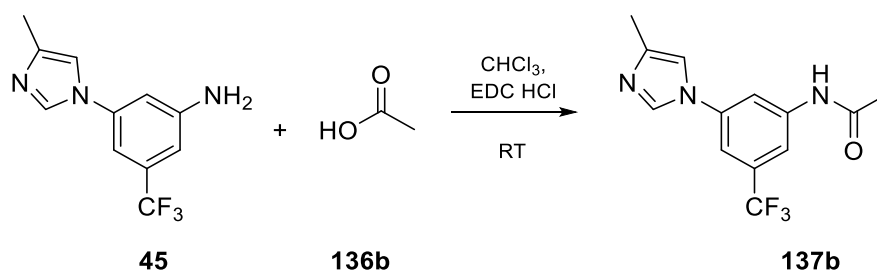
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8,57 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,41-7,28 (m, 11H), 7,04 (s, 1H), 5,14 (s, 1H), 2,25 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 171,14, 140,48, 139,92, 138,60, 138,42, 134,54, 133,14, 132,87, 129,15, 128,97, 127,87, 126,51, 124,34, 122,17, 120,00 (q, ¹J = 273 Hz, C-F), 114,98, 114,75, 114,61, 114,58, 114,55, 112,86, 59,87, 13,55 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 436,16 für C₂₅H₂₁F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 436,22.

HR-MS: *m/z* berechnet 436,16312 für C₂₅H₂₁F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 436,16281.

N-(3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)acetamid (**137b**=GFS066)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 100 mg, 0,415 mmol, 1,00 Äq) und EDC·HCl (95 mg, 0,50 mmol, 1,2 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Dann wurde AcOH (**136b**, 26 µL, 0,46 mmol, 1,1 Äq) hinzugegeben. Die braune Lösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL H₂O versetzt und das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (5 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt konnte als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 97 mg (0,34 mmol, 82 %) erhalten werden.

R_f = 0,5 (9:1 CH₂Cl₂/MeOH)

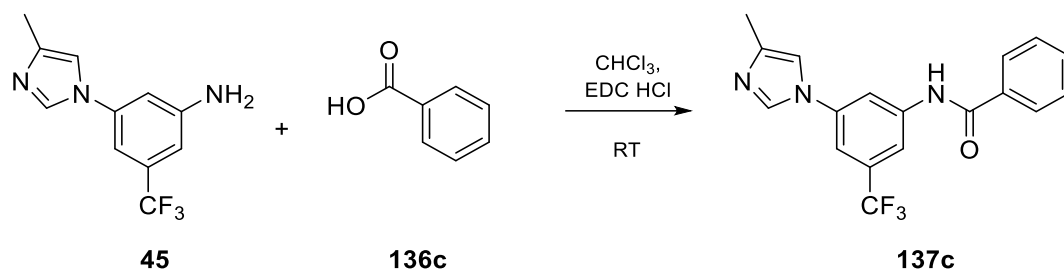
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8,61 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 2,28 (s, 3H), 2,24 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 169,22, 140,73, 138,58, 133,42, 133,16, 132,89, 132,62, 126,58, 124,41, 122,24, 120,07 (q, ¹J = 273 Hz, C-F), 115,04, 114,64, 114,61, 112,83, 112,79, 24,69 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 284,09 für C₁₃H₁₃F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 284,16.

HR-MS: *m/z* berechnet 284,10052 für C₁₃H₁₃F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 284,10126.

N-(3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)benzamid (**137c**=**GFS095**)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 100 mg, 0,415 mmol, 1,00 Äq), Benzoesäure (**136c**, 56 mg, 0,46 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (95 mg, 0,50 mmol, 1,2 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (2:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % AcOH, 1:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % AcOH). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 62 mg (0,18 mmol, 43 %) erhalten werden.

R_f = 0,3 (2:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % AcOH)

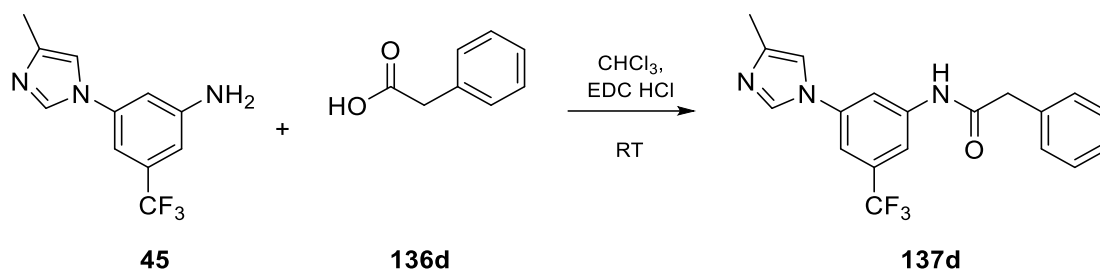
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8,76 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,92 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,79 (s, 2H), 7,58 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,49 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,33 (s, 1H), 7,08 (s, 1H), 2,25 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 166,42, 140,64, 138,63, 134,08, 133,51, 133,22, 132,96 (Signal nicht vollständig aufgelöst, q, ²*J* = 32,8 Hz, C-F), 132,65, 129,06, 127,40, 126,59, 124,42, 122,25, 120,08 (q, ¹*J* = 273 Hz, C-F), 115,53, 115,16, 115,12, 113,08, 113,06, 13,68 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 346,11 für C₁₈H₁₅F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 346,06.

HR-MS: *m/z* berechnet 346,11617 für C₁₈H₁₅F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 346,11733.

N-(3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)-2-phenylacetamid
(**137d**=**GFS096**)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 100 mg, 0,415 mmol, 1,00 Äq), Phenyllessigsäure (**136d**, 62 mg, 0,46 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (95 mg, 0,50 mmol, 1,2 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 39 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (2:1 *n*-Hexan/Aceton, 1:1 *n*-Hexan/Aceton). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 140 mg (0,390 mmol, 94 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (2:1 *n*-Hexan/Aceton)

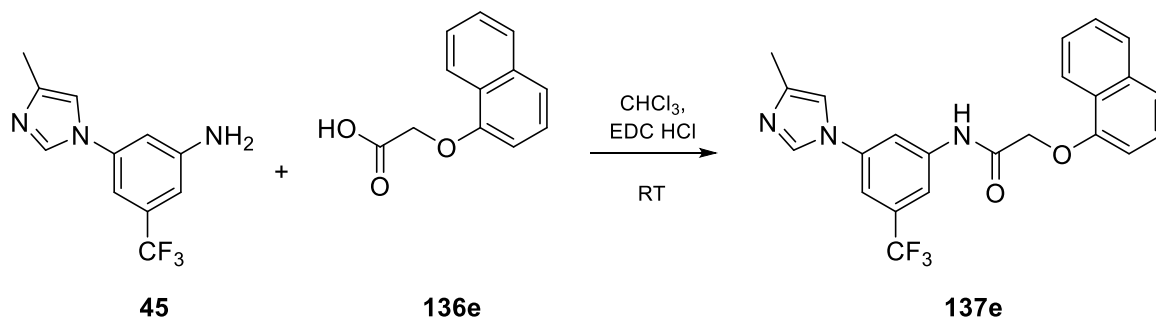
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 10,68 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,03 (t, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,37-7,31 (m, 4H), 7,29-7,24 (m, 1H), 3,70 (s, 2H), 2,16 (s, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 170,03, 141,26, 138,92, 138,07, 135,30, 134,99, 131,36, 131,10, 130,84, 130,58 (q, ²*J* = 32,8 Hz, C-F), 129,24, 128,37, 126,73, 124,65, 122,48, 114,23, 113,72, 113,10, 113,07, 113,03, 113,00 (q, ³*J* = 3,8 Hz, C-F), 111,37, 111,34, 111,31, 111,28 (q, ³*J* = 3,8 Hz, C-F), 43,32, 13,55 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 360,12 für C₁₉H₁₇F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 360,08.

HR-MS: *m/z* berechnet 360,13182 für C₁₉H₁₇F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 360,13276.

N-(3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)-2-(naphthalen-1-yloxy)acetamid
(**137e**=GFS099)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 100 mg, 0,415 mmol, 1,00 Äq), 2-(Naphthalen-1-yloxy)essigsäure (**136e**, 92 mg, 0,46 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (95 mg, 0,50 mmol, 1,2 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 70 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei ist ein farbloser Feststoff ausgefallen, der abfiltriert und mit CH₂Cl₂ gewaschen wurde. Der farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet und das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 72 mg (0,39 mmol, 41 %) erhalten werden.

R_f = 0,7 (1:1 *n*-Hexan/Aceton)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,76 (s, 1H), 8,36-8,33 (m, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,14 (m, 1H), 8,03 (m, 1H), 7,91-7,89 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,58-7,52 (m, 3H), 7,47 (m, 1H), 7,43 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,98 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 5,00 (s, 2H), 2,17 (s, 3H) ppm.

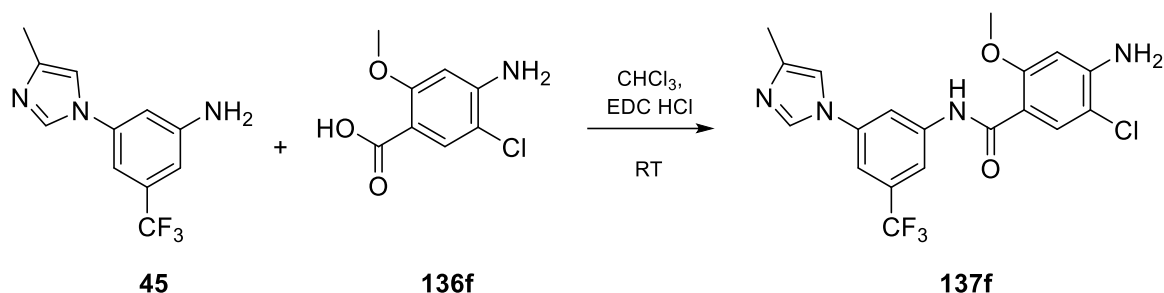
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 167,43, 153,32, 140,55, 138,92, 138,03, 134,97, 134,10, 131,35, 131,09, 130,83, 130,57 (q, ²*J* = 32,4 Hz, C-F), 127,42, 126,60, 126,04, 125,42, 124,86, 124,63, 122,46, 121,93, 120,82, 114,45, 114,16, 113,74, 113,71, 113,67 (Signal nicht vollständig aufgelöst, ³*J* = 4,10 Hz, C-F), 111,78, 111,76, 111,72, 111,69 (Signal nicht vollständig aufgelöst, ³*J* = 4,10 Hz, C-F), 105,73, 67,52, 13,53 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 426,14 für C₂₃H₁₉F₃N₃O₂ [M+H]⁺, gefunden 426,14.

HR-MS: *m/z* berechnet 426,14239 für C₂₃H₁₉F₃N₃O₂ [M+H]⁺, gefunden 426,14230.

Experimenteller Teil

4-Amino-5-chlor-2-methoxy-*N*-(3-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)benzamid (**137f**=**GFS160_FC10** + **GFS163_FC13**)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 108 mg, 0,448 mmol, 1,00 Äq), 4-Amino-5-chlor-2-methoxybenzoesäure (**136f**, 99 mg, 0,49 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (103 mg, 537 mmol, 1,20 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl_3 für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte eine unvollständige Umsetzung, daher wurden erneut 4-Amino-5-chlor-2-methoxybenzoesäure (**136f**, 99 mg, 0,49 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (103 mg, 537 mmol, 1,20 Äq) hinzugegeben und die Reaktionslösung erneut für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1. Aufreinigung: 1:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt_3 ; 2. Aufreinigung: 49:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 14 mg (0,033 mmol, 7 %) erhalten werden.

$R_f = 0,3$ (49:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

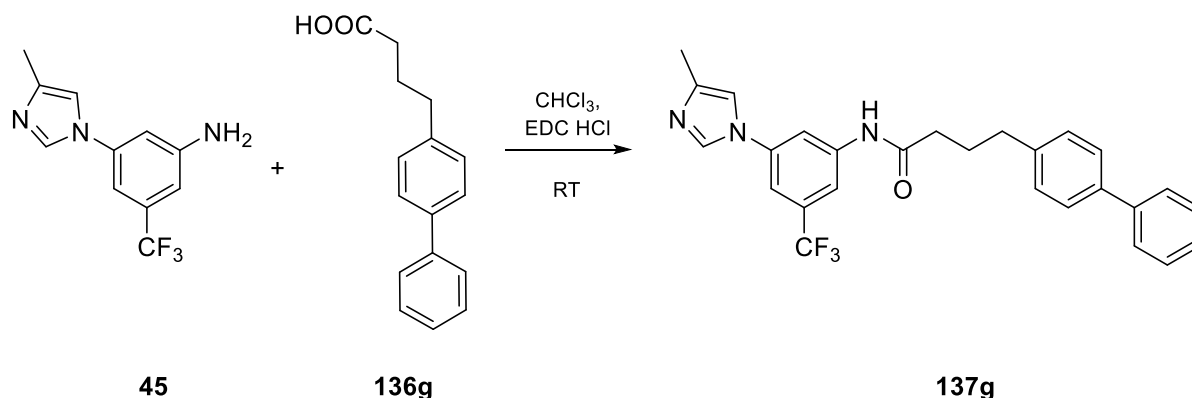
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 10,12$ (s, 1H), 8,23 (d, $J = 1,5$ Hz, 2H), 8,12 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,69-7,65 (m, 1H), 7,53 (t, $J = 1,3$ Hz, 1H), 6,55 (s, 1H), 6,18 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 2,18 (d, $J = 1,0$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 163,10, 157,53, 149,52, 141,07, 138,75, 137,90, 135,03, 131,68, 130,98, 130,73, 124,75, 122,58, 114,63, 114,23, 114,00, 113,97, 113,93, 113,90$ (q, $^3J = 4,0$ Hz, C-F), 111,16, 111,13, 111,09, 111,07 (q, $^3J = 3,3$ Hz, C-F), 109,78, 109,19, 97,30, 56,20, 13,56 ppm.

ESI-MS: m/z berechnet 425,09 für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 425,27.

HR-MS: m/z berechnet 425,09866 für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 425,09761.

4-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-*N*-(3-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)butanamid
(**137g**=**GFS106**)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 50 mg, 0,21 mmol, 1,0 Äq), 4-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)butansäure (**136g**, 55 mg, 0,23 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (48 mg, 0,25 mmol, 1,2 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1:1 *n*-Hexan/Aceton). Der erhaltene farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet und das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 46 mg (0,099 mmol, 48 %) erhalten werden.

R_f = 0,3 (2:1 *n*-Hexan/Aceton)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,40 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,02 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,94-7,92 (m, 1H), 7,65-7,61 (m, 3H), 7,60-7,57 (m, 2H), 7,47-7,42 (m, 3H), 7,36-7,30 (m, 3H), 2,69 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,17 (s, 3H), 1,96 (p, *J* = 7,5 Hz, 2H) ppm.

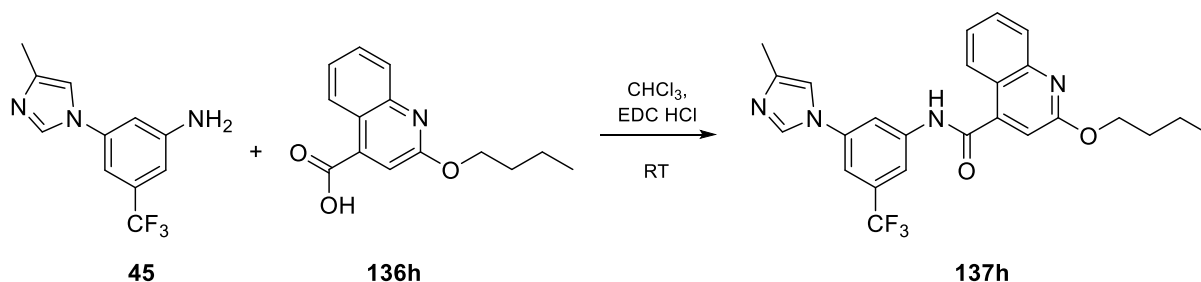
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 171,82, 141,33, 140,80, 140,05, 138,94, 138,01, 137,80, 135,02, 131,28, 131,02, 130,76, 130,51 (q, ²*J* = 32,2 Hz, C-F), 128,98, 128,87, 127,15, 126,84, 126,61, 126,45, 124,67, 122,50, 114,27, 113,66, 113,05, 113,02, 112,98, 112,95 (q, ³*J* = 4,3 Hz, C-F), 111,10, 111,07, 111,04, 111,01 (q, ³*J* = 3,8 Hz, C-F), 35,77, 34,09, 26,28, 13,54 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 464,19 für C₂₇H₂₅F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 464,26.

HR-MS: *m/z* berechnet 464,19442 für C₂₇H₂₅F₃N₃O [M+H]⁺, gefunden 464,19401.

Experimenteller Teil

2-Butoxy-*N*-(3-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)chinolin-4-carboxamid (**137h**=**GFS105**)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 50 mg, 0,21 mmol, 1,0 Äq), 2-Butoxychinolin-4-carbonsäure (**136h**, 56 mg, 0,23 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (48 mg, 0,25 mmol, 1,2 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (2:1 *n*-Hexan/Aceton). Der erhaltene farblose Feststoff wurde im Vakuum getrocknet und das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 73 mg (0,16 mmol, 76 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (2:1 *n*-Hexan/Aceton)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 11,18 (s, 1H), 8,24-8,21 (m, 2H), 8,12 (s, 1H), 8,10 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,86 (dd, *J* = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,74 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,5 Hz, 1H), 7,53-7,47 (m, 2H), 7,31 (s, 1H), 4,49 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,18 (d, *J* = 1,0 Hz, 3H), 1,83-1,75 (m, 2H), 1,54-1,44 (m, 2H), 0,97 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H) ppm.

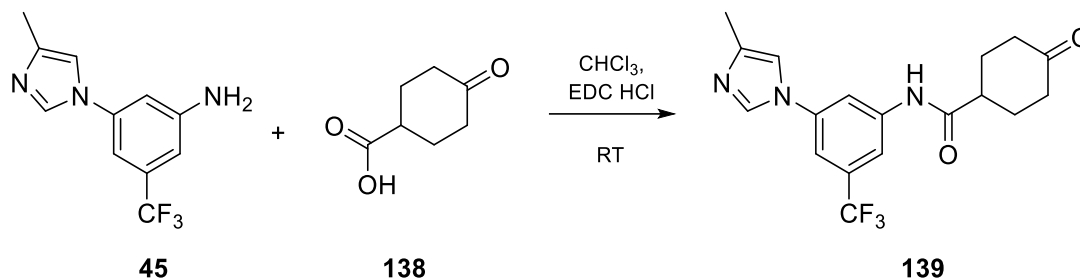
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 165,26, 161,05, 146,48, 144,21, 140,73, 138,99, 138,07, 135,00, 131,43, 131,16, 130,90, 130,64 (q, ²*J* = 32,4 Hz, C-F), 130,36, 127,28, 125,19, 124,94, 124,63, 122,47, 120,98, 114,82, 114,18, 114,12, 114,09, 114,05 (Signal nicht aufgelöst, q, ³*J* = 4,3 Hz, C-F), 112,27, 112,24, 112,21, 112,18 (q, ³*J* = 3,8 Hz, C-F), 111,67, 65,58, 30,46, 18,78, 13,70, 13,54 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 469,19 für C₂₅H₂₄F₃N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 469,24.

HR-MS: *m/z* berechnet 469,18459 für C₂₅H₂₄F₃N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden 469,18362.

Experimenteller Teil

N-(3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)-4-oxocyclohexan-1-carboxamid (**139**=GFS118)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 200 mg, 0,829 mmol, 1,00 Äq), 4-Oxocyclohexancarbonsäure (**138**, 130 mg, 0,912 mmol, 1,10 Äq) und EDC·HCl (191 mg, 0,995 mmol, 1,20 Äq) wurden in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die Lösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gelöst. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1:1 *n*-Hexan/Aceton). Das Produkt konnte nach dem Trocknen im Vakuum als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 182 mg (0,497 mmol, 60 %) erhalten werden.

R_f = 0,3 (1:1 *n*-Hexan/Aceton)

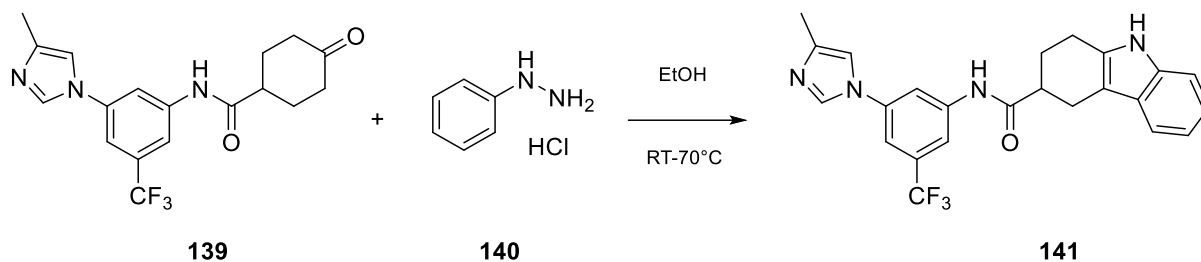
¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆) δ = 9,82 (s, 1H), 8,18 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,05-7,99 (m, 2H), 7,60 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,36 (s, 1H), 2,97 (tt, *J* = 10,7, 3,8 Hz, 1H), 2,49-2,36 (m, 4H), 2,31-2,24 (m, 2H), 2,20 (d, *J* = 0,9 Hz, 3H), 2,03-1,98 (m, 1H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, Aceton-d₆) δ = 209,12, 174,60, 142,57, 142,47, 140,70, 139,59, 135,65, 133,22, 132,96, 132,70, 132,44 (q, ²*J* = 32,8 Hz, C-F), 125,77, 123,61 (Signal nicht komplett aufgelöst, q, ¹*J* = 271,9 Hz, C-F), 115,10, 114,98, 114,89, 114,48, 114,45, 114,41, 114,38 (q, ³*J* = 4,3 Hz, C-F), 112,44, 112,41, 112,38, 112,34 (q, ³*J* = 4,3 Hz, C-F), 44,08, 40,28, 29,84, 13,81 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 366,14 für C₁₈H₁₉F₃N₃O₂ [M+H]⁺, gefunden 366,09.

Experimenteller Teil

N-(3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazol-3-carboxamid (**141**=**GFS150**)



Versuchsdurchführung:

139 (0,182 mg, 0,497 mmol, 1,00 Äq) wurde in 5 mL EtOH gelöst. Dann wurde Phenylhydrazin Hydrochlorid (**140**, 0,108 mg, 0,746 mmol, 1,50 Äq) hinzugegeben und die orangene Lösung wurde acht Stunden bei 70 °C und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das EtOH entfernt und der Rückstand mit 40 mL EtOAc versetzt und mit einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung (5 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1. Säulenchromatographie: 1:1 *n*-Hexan/Aceton; 2. Säulenchromatographie: 1:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt₃). Das Produkt konnte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 29 mg (0,066 mmol, 13 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (1:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt₃)

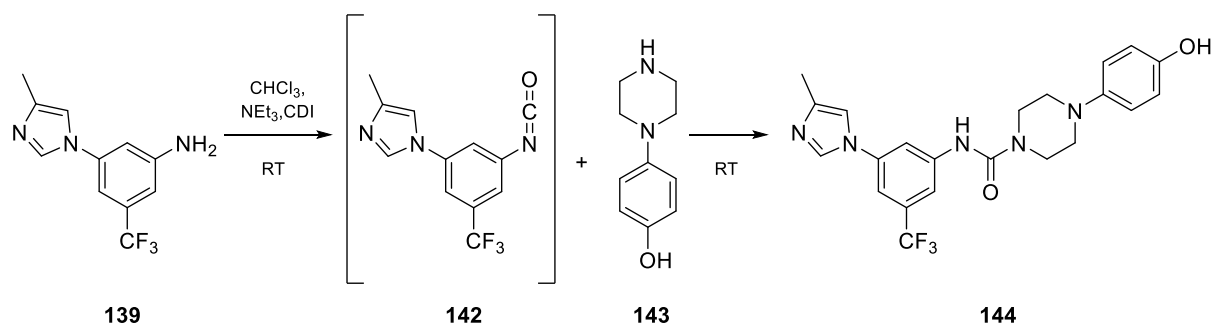
¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆) δ = 9,84 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 8,27-8,21 (m, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,05 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 7,64-7,58 (m, 1H), 7,40 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,37-7,36 (m, 1H), 7,31-7,28 (m, 1H), 7,05-7,01 (m, 1H), 6,99-6,95 (m, 1H), 2,99-2,86 (m, 6H), 2,35-2,31 (m, 1H), 2,21 (d, *J* = 0,9 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, Aceton-d₆) δ = 175,67, 142,79, 140,67, 139,61, 137,48, 135,59, 134,35, 132,96, 132,71 (Signal nicht vollständig aufgelöst, *q*, ²*J* = 32,7 Hz, C-F), 130,21, 128,53, 121,48, 119,40, 119,07, 118,11, 115,04, 115,00, 114,93, 114,44, 114,40, 114,37, 114,34 (*q*, ³*J* = 4,3 Hz, C-F), 112,29, 112,25, 112,22, 112,19 (*q*, ³*J* = 4,2 Hz, C-F), 111,47, 111,42, 108,27, 43,91, 27,33, 25,16, 23,16, 13,84 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 439,17 für C₂₄H₂₂F₃N₄O [M+H]⁺, gefunden 439,10. **HR-MS:** *m/z* berechnet 439,17402 für C₂₄H₂₂F₃N₄O [M+H]⁺, gefunden 439,17374.

Experimenteller Teil

4-(4-Hydroxyphenyl)-*N*-(3-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)phenyl)piperazin-1-carboxamid (**144**=GFS156_FC05)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-5-(trifluormethyl)anilin (**45**, 334 mg, 1,38 mmol, 1,00 Äq) und *N,N'*-Carbonyldiimidazol (539 mg, 3,32 mmol, 2,40 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Dann wurde NEt₃ (192 µL, 1,38 mmol, 1,00 Äq) hinzugegeben und die braune Lösung wurde 120 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 4-(Piperazin-1-yl)phenol (**143**, 247 mg, 1,38 mmol, 1,00 Äq) hinzugegeben und die Lösung 168 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % AcOH). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 529 mg (1,19 mmol, 86 %) erhalten werden.

R_f = 0,3 (1:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt₃)

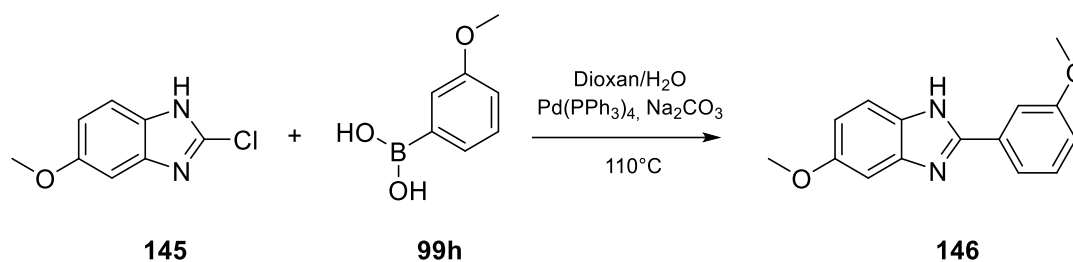
¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆) δ = 8,11 (t, *J* = 1,9 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,93-7,91 (m, 1H), 7,49-7,46 (m, 1H), 7,35-7,32 (m, 1H), 6,91-6,86 (m, 2H), 6,78-6,73 (m, 2H), 3,73-3,70 (m, 4H), 3,08-3,05 (m, 4H), 2,21 (d, *J* = 0,9 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, Aceton-d₆) δ = 172,05, 155,21, 152,62, 145,79, 144,03, 140,34, 139,31, 135,57, 132,66, 132,40, 125,95, 123,79 (Signal nicht vollständig aufgelöst, *q*, ¹*J* = 271,5 Hz, C-F), 119,98, 119,83, 116,43, 116,39, 115,11, 114,80, 114,35, 114,31, 114,28, 114,24 (*q*, ³*J* = 4,3 Hz, C-F), 110,88, 110,85, 110,82, 110,78 (*q*, ³*J* = 4,3 Hz, C-F), 51,78, 45,08, 29,84, 13,70 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 446,17 für C₂₂H₂₃F₃N₅O₂ [M+H]⁺, gefunden 446,18.

HR-MS: *m/z* berechnet 446,17984 für C₂₂H₂₃F₃N₅O₂ [M+H]⁺, gefunden 446,17812.

5-Methoxy-2-(3-methoxyphenyl)-1*H*-benzimidazol (**146**=GFS048)



Versuchsdurchführung:

Na₂CO₃ (174 mg, 1,64 mmol, 3,00 Äq), 2-Chlor-5-methoxy-1*H*-benzimidazol (**145**, 100 mg, 0,548 mmol, 1,00 Äq), 3-Methoxyphenylboronsäure (**99h**, 100 mg, 0,657 mmol, 1,20 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (32 mg, 0,027 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre abgewogen. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für 6,5 Stunden bei 110 °C gerührt. Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurde weiteres Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (32 mg, 0,027 mmol, 0,050 Äq) hinzugegeben und die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht 15 Stunden gerührt. Eine DC-Analyse zeigte eine unvollständige Umsetzung, deswegen wurde weiteres Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (32 mg, 0,027 mmol, 0,050 Äq) hinzugegeben und 7 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und es wurden 40 mL destilliertes H₂O und 40 mL CH₂Cl₂ hinzugegeben. Es war ein Niederschlag bemerkbar, der sich nicht löste. Dieser wurde abfiltriert und mit H₂O und CH₂Cl₂ gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum konnte das Produkt als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 122 mg (0,478 mmol, 87 %) isoliert werden.

R_f = 0,2 (1:1 EtOAc/*n*-Hexan)

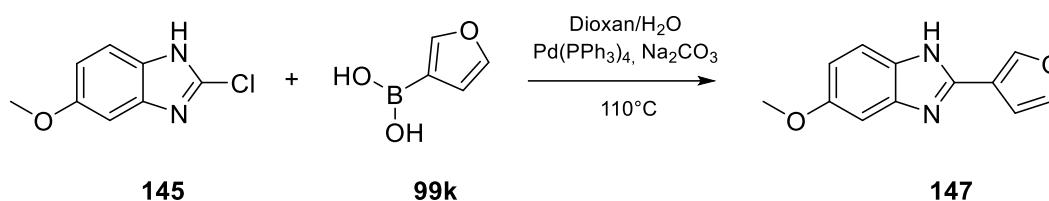
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8,06 (m, 1H), 7,93 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,73 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,61 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,27 (dd, *J* = 8,1, 2,0 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,16 (dd, *J* = 9,0, 2,3 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,88 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 159,82, 157,97, 147,92, 133,26, 130,79, 128,80, 126,66, 124,85, 119,85, 119,01, 115,69, 114,93, 112,69, 96,11, 55,82 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 255,11 für C₁₅H₁₅N₂O₂ [M+H]⁺, gefunden 255,05.

HR-MS: *m/z* berechnet 255,11280 für C₁₅H₁₅N₂O₂ [M+H]⁺, gefunden 255,11302.

2-(Furan-3-yl)-5-methoxy-1*H*-benzimidazol (**147**=**GFS045**)



Versuchsdurchführung:

Na₂CO₃ (174 mg, 1,64 mmol, 3,00 Äq), 2-Chlor-5-methoxy-1*H*-benzimidazol (**145**, 100 mg, 0,548 mmol, 1,00 Äq) 3-Furylboronsäure (**99k**, 74 mg, 0,66 mmol, 1,2 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (32 mg, 0,027 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre abgewogen. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für 7 Stunden bei 110 °C und 16 Stunden über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde weiteres Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (32 mg, 0,027 mmol, 0,050 Äq) hinzugegeben und weitere 6 Stunden bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die braune Suspension mit 40 mL H₂O versetzt und das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1:1 EtOAc/*n*-Hexan). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 71 mg (0,33 mmol, 60 %) isoliert werden.

R_f = 0,3 (1:1 EtOAc/*n*-Hexan)

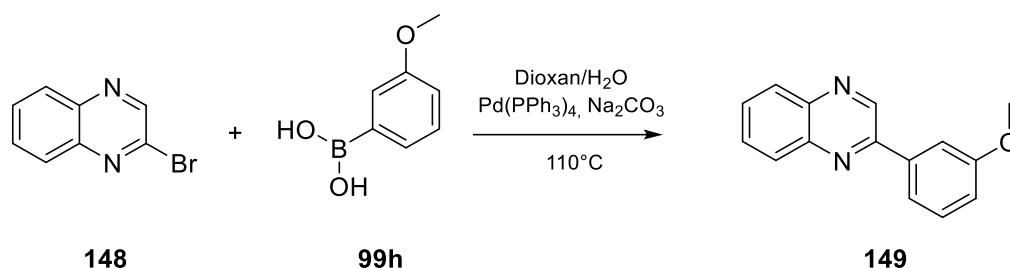
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8,10 (s, 1H), 7,48 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,45 (t, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,04 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 6,97 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 6,89 (dd, *J* = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 156,83, 146,27, 144,41, 142,02, 139,22, 133,99, 117,88, 115,93, 112,42, 108,86, 97,64, 55,98 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 215,07 für C₁₂H₁₁N₂O₂ [M+H]⁺, gefunden 214,99.

HR-MS: *m/z* berechnet 215,08150 für C₁₂H₁₁N₂O₂ [M+H]⁺, gefunden 215,08105.

2-(3-Methoxyphenyl)chinoxalin (**149=GFS046**)



Versuchsdurchführung:

2-Bromochinoxalin (**148**, 82 mg, 0,39 mmol, 1,0 Äq), Na₂CO₃ (125 mg, 1,18 mmol, 3,00 Äq), 3-Methoxyphenylboronsäure (**99h**, 72 mg, 0,47 mmol, 1,2 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (23 mg, 0,020 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre abgewogen. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für zwei Stunden bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Suspension mit 40 mL H₂O versetzt. Das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (5 x 40 mL) aus der wässrigen Phase extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (4:1 EtOAc/*n*-Hexan). Das Produkt konnte als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 66 mg (0,28 mmol, 71 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (4:1 EtOAc/*n*-Hexan)

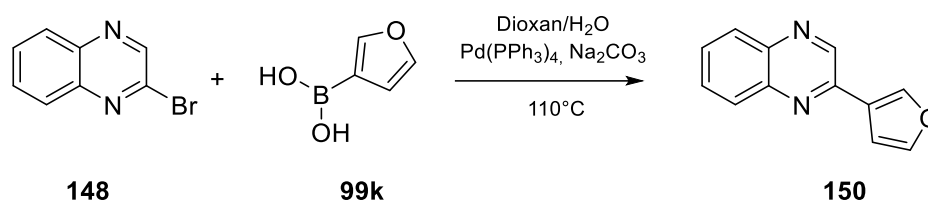
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 9,32 (s, 1H), 8,20-8,15 (m, 1H), 8,13 (dd, *J* = 8,2, 1,4 Hz, 1H), 7,81-7,73 (m, 4H), 7,48 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,08 (ddd, *J* = 8,2, 2,6, 0,8 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 160,49, 151,81, 143,59, 142,41, 141,82, 138,35, 130,44, 130,32, 129,79, 129,74, 129,27, 120,07, 116,39, 112,84, 55,63 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 237,09 für C₁₅H₁₃N₂O [M+H]⁺, gefunden 237,00.

HR-MS: *m/z* berechnet 238,1006 für C₁₅H₁₄N₂O [M+2H]⁺, gefunden 238,10991.

2-(Furan-3-yl)chinoxalin (**150**=GFS043)



Versuchsdurchführung:

2-Bromchinoxalin (**148**, 100 mg, 0,478 mmol, 1,00 Äq), Na₂CO₃ (152 mg, 1,44 mmol, 3,00 Äq), 3-Furylboronsäure (**99k**, 64 mg, 0,57 mmol, 1,2 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (28 mg, 0,024 mmol, 0,050 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre abgewogen. Parallel wurden 10 mL (Dioxan/H₂O 4:1 V/V) unter Argon-Atmosphäre für 15 Minuten entgast. Das Lösungsmittel wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde für zwei Stunden bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Suspension mit 20 mL CH₂Cl₂ und 20 mL H₂O versetzt. Das Rohprodukt wurde aus der wässrigen Phase mit CH₂Cl₂ (5 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (4:1 EtOAc/*n*-Hexan). Das Produkt konnte als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 65 mg (0,33 mmol, 69 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (4:1 EtOAc/*n*-Hexan)

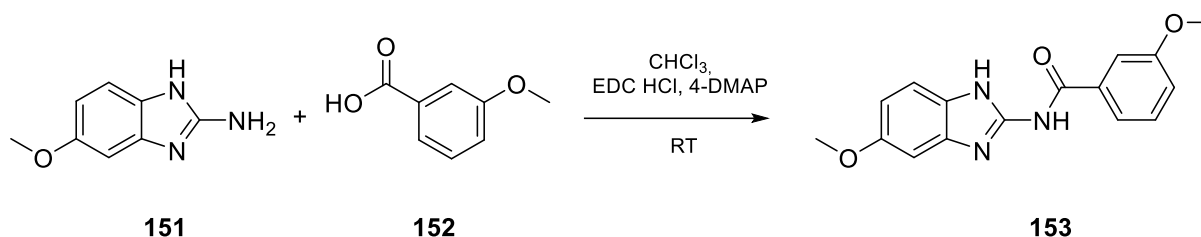
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 9,05 (s, 1H), 8,25-8,23 (m, 1H), 8,09-8,06 (m, 2H), 7,76 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,5 Hz, 1H), 7,71 (ddd, *J* = 8,3, 6,9, 1,5 Hz, 1H), 7,59 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,15 (dd, *J* = 1,8, 0,7 Hz, 1H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 146,98, 144,62, 143,40, 142,71, 142,60, 141,52, 130,42, 129,34, 129,32, 129,29, 125,18, 108,86 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 197,06 für C₁₂H₉N₂O [M+H]⁺, gefunden 197,01.

HR-MS: *m/z* berechnet 198,07876 für C₁₂H₁₀N₂O [M+2H]⁺, gefunden 198,07880.

3-Methoxy-*N*-(5-methoxy-1*H*-benzimidazol-2-yl)benzamid (**153**=GFS069_LR02)



Versuchsdurchführung:

5-Methoxy-1*H*-benzimidazol-2-amin (**151**, 100 mg, 0,613 mmol, 1,00 Äq), EDC·HCl (235 mg, 1,23 mmol, 2,00 Äq), 3-Methoxybenzoesäure (**152**, 140 mg, 0,919 mmol, 1,50 Äq) und 4-DMAP (15 mg, 0,12 mmol, 0,20 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 35 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (9:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % AcOH, 4:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % AcOH). Das Produkt konnte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 126 mg (0,424 mmol, 69 %) erhalten werden.

R_f = 0,6 (4:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % AcOH)

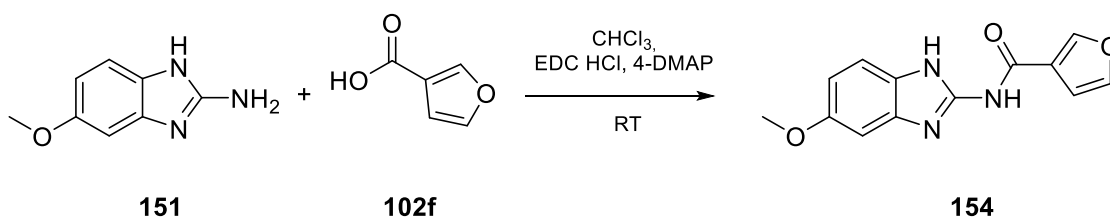
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,09 (bs, 1H), 7,76-7,63 (m, 2H), 7,43 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,01 (s, 1H), 6,76 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,77 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 172,03, 167,71, 159,16, 155,32, 148,60, 135,74, 135,24, 129,48, 128,67, 120,60, 118,07, 113,83, 113,02, 109,96, 97,49, 55,45, 55,31 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 298,11 für C₁₆H₁₆N₃O₃ [M+H]⁺, gefunden 298,13.

HR-MS: *m/z* berechnet 298,11862 für C₁₆H₁₆N₃O₃ [M+H]⁺, gefunden 298,11978.

N-(5-Methoxy-1*H*-benzimidazol-2-yl)furan-3-carboxamid (**154**=GFS067)



Versuchsdurchführung:

5-Methoxy-1*H*-benzimidazol-2-amin (**151**, 100 mg, 0,613 mmol, 1,00 Äq), EDC-HCl (235 mg, 1,23 mmol, 2,00 Äq) und 3-Furancarbonsäure (**102f**, 103 mg, 0,919 mmol, 1,50 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die braune Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da die Reaktion nicht vollständig ablief, wurde 4-DMAP (17 mg, 0,12 mmol, 0,20 Äq) hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL einer 5 % (V/V) wässrigen HCl-Lösung versetzt und mit CHCl₃ (5 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1. Aufreinigung mit 1:1 Toluol/EtOAc + 2 % AcOH, 2. Aufreinigung mit 1:1 *n*-Hexan/Aceton + 2 % NEt₃). Das Produkt konnte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 28 mg (0,11 mmol, 18 %) erhalten werden.

R_f = 0,6 (1:1 Toluol/EtOAc + 2 % AcOH)

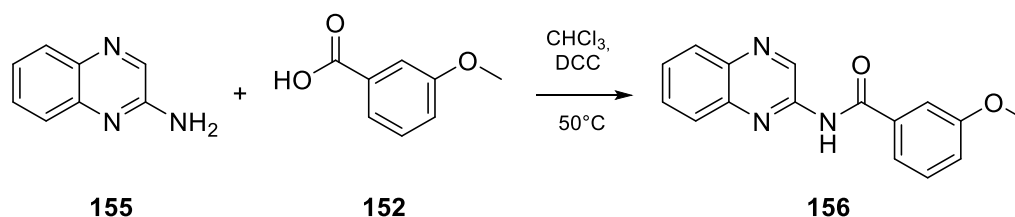
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 11,92 (bs, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,04-6,98 (m, 1H), 6,74 (dd, *J* = 8,6, 2,3 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 161,89, 155,22, 146,97, 144,47, 122,14, 109,87, 109,39, 55,42 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 258,08 für C₁₃H₁₂N₃O₃ [M+H]⁺, gefunden 258,29.

HR-MS: *m/z* berechnet 258,08732 für C₁₃H₁₂N₃O₃ [M+H]⁺, gefunden 258,08671.

3-Methoxy-*N*-(chinoxalin-2-yl)benzamid (**156**=GFS057)



Versuchsdurchführung:

Chinoxalin-2-amin (**155**, 100 mg, 0,689 mmol, 1,00 Äq), 3-Methoxybenzoesäure (**152**, 115 mg, 0,758 mmol, 1,10 Äq) und DCC (171 mg, 0,827 mmol, 1,20 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die orangene Lösung wurde 23 Stunden bei 50 °C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (4:1 *n*-Hexan/EtOAc). Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im Vakuum konnte das Produkt als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 43 mg (0,16 mmol, 22 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (4:1 *n*-Hexan/EtOAc)

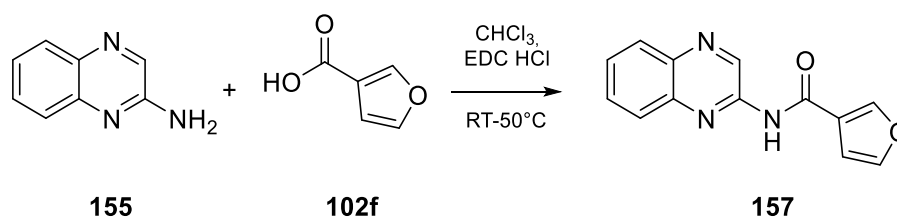
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 9,98 (s, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,10-8,07 (m, 1H), 7,85-7,79 (m, 1H), 7,74-7,68 (m, 1H), 7,67-7,62 (m, 1H), 7,55-7,46 (m, 2H), 7,40 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,12 (dd, *J* = 8,3, 2,5 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 165,80, 160,23, 146,73, 140,76, 140,64, 139,78, 134,80, 130,70, 130,08, 129,36, 128,37, 127,53, 119,32, 119,26, 112,82, 55,65 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 280,10 für C₁₆H₁₄N₃O₂ [M+H]⁺, gefunden 280,16.

HR-MS: *m/z* berechnet 281,11588 für C₁₆H₁₅N₃O₂ [M+2H]⁺, gefunden 281,11585.

N-(Chinoxalin-2-yl)furan-3-carboxamid (**157**=GFS052)



Versuchsdurchführung:

Chinoxalin-2-amin (**155**, 100 mg, 0,689 mmol, 1,00 Äq), 3-Furylboronsäure (**102f**, 85 mg, 0,76 mmol, 1,1 Äq) und EDC·HCl (159 mg, 0,827 mmol, 1,20 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die orangene Lösung wurde 6,5 Stunden bei 50 °C und weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (4:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % NEt₃). Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im Vakuum konnte das Produkt als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 16 mg (0,066 mmol, 10 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (4:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % NEt₃)

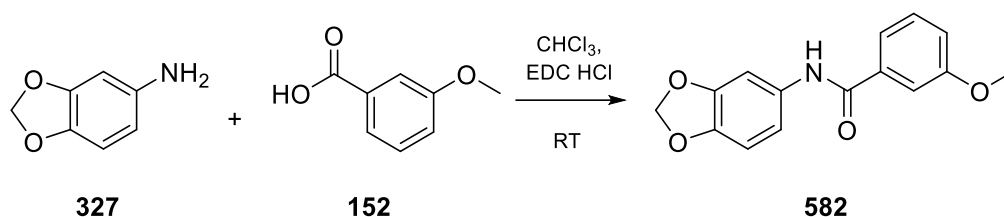
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 9,95 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,20-8,15 (m, 1H), 8,11 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,86-7,82 (m, 1H), 7,76-7,71 (m, 1H), 7,68 (ddd, *J* = 8,3, 7,0, 1,4 Hz, 1H), 7,55 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H), 6,84-6,83 (m, 1H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 160,92, 146,52, 146,31, 144,72, 140,76, 140,73, 139,79, 130,83, 129,47, 128,45, 127,50, 122,28, 108,55 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 262,06 für C₁₃H₉N₃O₂Na [M+Na]⁺, gefunden 262,07.

HR-MS: *m/z* berechnet 241,08458 für C₁₃H₁₁N₃O₂ [M+2H]⁺, gefunden 241,08453.

N-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-methoxybenzamid (**582**=**GFS167**)



Versuchsdurchführung:

1,3-Benzodioxol-5-amin (**327**, 565 mg, 4,12 mmol, 1,00 Äq), 3-Methoxybenzoesäure (**152**, 689 mg, 4,53 mmol, 1,10 Äq) und EDC·HCl (948 mg, 4,94 mmol, 1,20 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (3:1 *n*-Hexan/EtOAc). Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im Vakuum konnte das Produkt als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 417 mg (1,54 mmol, 37 %) erhalten werden.

R_f = 0,4 (3:1 *n*-Hexan/EtOAc)

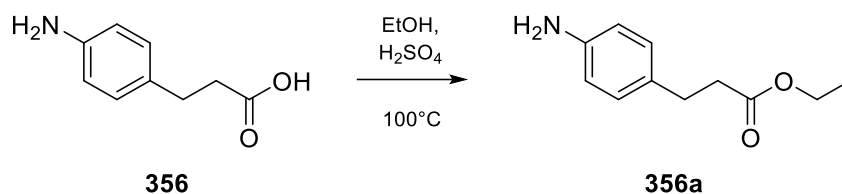
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,11 (s, 1H), 7,51 (dt, *J* = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 7,47-7,41 (m, 3H), 7,19 (dd, *J* = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,14 (ddd, *J* = 8,2, 2,6, 1,0 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,01 (s, 2H), 3,83 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 164,94, 159,17, 146,95, 143,27, 136,34, 133,38, 129,51, 119,75, 117,20, 113,43, 112,82, 107,89, 102,56, 100,99, 55,32 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 272,08 für C₁₅H₁₄NO₄ [M+H]⁺, gefunden 272,14.

HR-MS: *m/z* berechnet 272,09173 für C₁₅H₁₄NO₄ [M+H]⁺, gefunden 272,09160.

3-(4-Aminophenyl)propionsäureethylester (**356a**=GFS168)



Versuchsdurchführung:

3-(4-Aminophenyl)propionsäure (**356**, 963 mg, 5,83 mmol, 1,00 Äq) wurde in 20 mL EtOH gelöst und mit 0,5 mL konzentrierter H₂SO₄ versetzt. Die Lösung wurde 8 Stunden bei 100 °C und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit NaHCO₃ neutralisiert und mit 100 mL H₂O versetzt. Das Rohprodukt wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde entfernt. Nach Trocknen im Vakuum konnte das Produkt als braunes Öl mit einer Ausbeute von 998 mg (5,16 mmol, 89 %) erhalten werden.

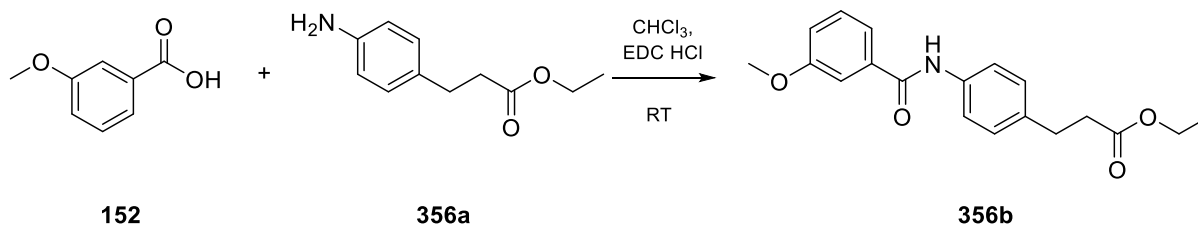
R_f = 0,5 (2:1 *n*-Hexan/EtOAc)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 6,99 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,62 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 4,12 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,56 (bs, 2H), 2,84 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 2,55 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 1,23 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 173,27, 144,73, 130,77, 129,25, 115,42, 60,44, 36,53, 30,34, 14,36 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 194,11 für C₁₁H₁₆NO₂ [M+H]⁺, gefunden 194,24.

3-(4-(3-Methoxybenzamido)phenyl)propionsäureethylester (**356b**=GFS169)



Versuchsdurchführung:

356a (998 mg, 5,16 mmol, 1,00 Äq), 3-Methoxybenzoesäure (**152**, 864 mg, 5,68 mmol, 1,10 Äq) und EDC-HCl (1188 mg, 6,198 mmol, 1,200 Äq) wurden unter einer Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl₃ gelöst. Die Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (3:1 *n*-Hexan/EtOAc). Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im Vakuum konnte das Produkt als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 1361 mg (4,156 mmol, 80 %) erhalten werden.

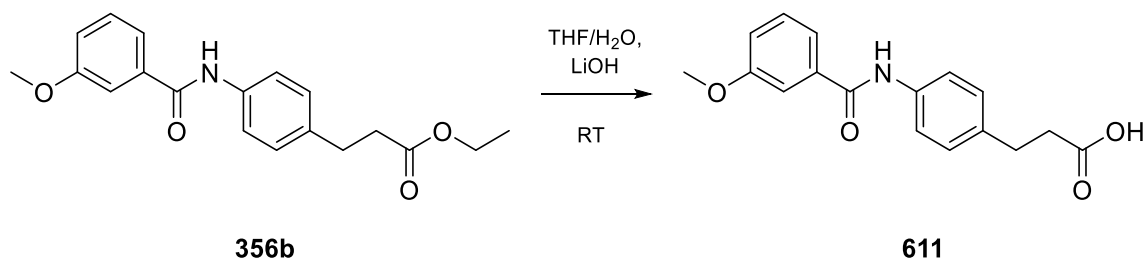
R_f = 0,4 (3:1 *n*-Hexan/EtOAc)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 7,88 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,44-7,32 (m, 3H), 7,19 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,11-7,02 (m, 1H), 4,12 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,93 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 2,60 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 172,99, 165,65, 160,10, 137,04, 136,63, 136,27, 129,86, 129,05, 120,52, 118,81, 118,09, 112,62, 60,58, 55,60, 36,09, 30,55, 14,35 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet 326,15 für C₁₉H₂₀NO₄ [M-H]⁻, gefunden 326,36.

3-(4-(3-Methoxybenzamido)phenyl)propionsäure (**611**=GFS170)



Versuchsdurchführung:

356b (1361 mg, 4,156 mmol, 1,000 Äq) wurde in 10 mL THF gelöst. Dann wurde LiOH (597 mg, 24,9 mmol, 6,00 Äq) in 20 mL H₂O hinzugegeben. Die Suspension wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt mit EtOAc (5 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde entfernt. Nach Trocknen im Vakuum konnte das Produkt mit einer Ausbeute von 1147 mg (3,831 mmol, 92 %) erhalten werden.

R_f = 0,5 (1:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % AcOH)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,11 (s, 1H), 10,14 (s, 1H), 7,68-7,64 (m, 2H), 7,54-7,51 (m, 1H), 7,47 (dd, *J* = 2,4, 1,7 Hz, 1H), 7,44 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,22-7,18 (m, 2H), 7,15 (ddd, *J* = 8,2, 2,6, 0,9 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 2,80 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,53 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 173,77, 165,07, 159,18, 137,09, 136,41, 136,21, 129,53, 128,33, 120,48, 119,81, 117,23, 112,86, 55,33, 35,34, 29,85 ppm.

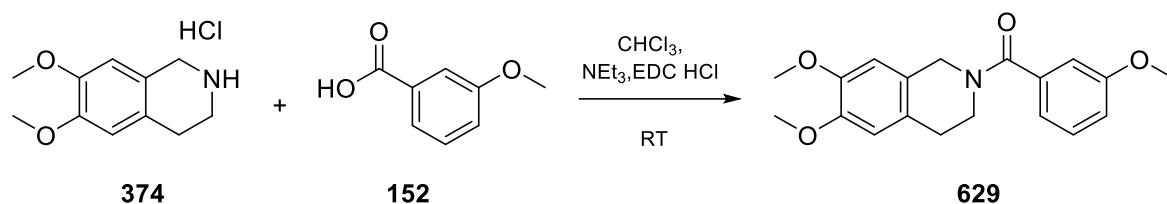
ESI-MS: *m/z* berechnet 300,12 für C₁₇H₁₈NO₄ [M+H]⁺, gefunden 300,17.

HR-MS: *m/z* berechnet 300,12303 für C₁₇H₁₈NO₄ [M+H]⁺, gefunden 300,12295.

Experimenteller Teil

(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydroisochinolin-2-(1*H*)-yl)-(3-methoxyphenyl)methanon

(**629**=GFS166)



Versuchsdurchführung:

6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin Hydrochlorid (**374**, 1000 mg, 4,354 mmol, 1,000 Äq), 3-Methoxybenzoesäure (**152**, 729 mg, 4,79 mmol, 1,10 Äq), EDC-HCl (1002 mg, 5,224 mmol, 1,200 Äq) und NEt_3 (603 μL , 4,35 mmol, 1,00 Äq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 10 mL trockenem CHCl_3 gelöst. Die Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 30 mL H_2O und 30 mL EtOAc hinzugegeben und die organische Phase wurde mit H_2O (3 x 30 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus den vereinten wässrigen Phasen mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (1:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % AcOH). Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im Vakuum konnte das Produkt als farbloser amorpher Feststoff mit einer Ausbeute von 992 mg (3,03 mmol, 70 %) erhalten werden.

$R_f = 0,4$ (1:1 *n*-Hexan/EtOAc + 2 % AcOH)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 7,45\text{-}7,31$ (m, 1H), 7,03 (ddd, $J = 8,3, 2,6, 0,9$ Hz, 1H), 7,00-6,94 (m, 2H)*, 6,89-6,59 (m, 2H), 4,74-4,39 (m, 2H)*, 3,85-3,68 (m, 9H), 3,66-3,46 (m, 2H)*, 2,80-2,68 (m, 2H)* ppm. * Signalaufspaltung aufgrund von Konformationsisomerie

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 169,24, 168,73, 159,13, 147,42, 137,66, 129,70, 125,98, 125,81, 124,69, 119,05, 118,62, 118,59, 115,42, 115,30, 112,22, 111,97, 110,06, 109,44, 55,50, 55,22, 54,90, 48,80, 44,77, 43,75, 28,35, 27,16$ (Konformationsisomerie des Piperidinrings) ppm.

ESI-MS: m/z berechnet 328,15 für $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 328,21.

HR-MS: m/z berechnet 328,15433 für $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 328,15525.

6.3.1 Kombinatorische Chemie

Chemisch-synthetischer Teil

Ausgehend von 3-Methoxybenzoesäure (**152**) wurde mit 255 verschiedenen primären und sekundären Aminen (siehe Anhang 2) mit Hilfe von EDC·HCl als Kupplungsreagenz eine Bibliothek von Amiden im miniaturisierten Format hergestellt. Die Amine (**40, 47, 83, 101a, 132, 158-407**) (je 0,05 mmol, 1 Äq) wurden in 1,5 mL Eppendorfgefäße vorgelegt. Von 3-Methoxybenzoesäure (**152**) und von EDC·HCl wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 0,263 mol/L in CHCl_3 angesetzt und jeweils 250 μL 3-Methoxybenzoesäure-Stammlösung (0,066 mmol, 1,3 Äq) und der EDC·HCl-Stammlösung (0,066 mmol, 1,3 Äq) zu den vorgelegten Aminen gegeben, sodass die Reaktionsansätze jeweils ein Gesamtvolumen von 500 μL CHCl_3 aufwiesen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze bei 900 rpm und 40 °C für 24 Stunden im Thermoschüttler inkubiert. Dann wurde zu jedem Ansatz 400 μL CHCl_3 und 500 μL H_2O hinzugegeben, geschüttelt und die wässrige Phase nach Abtrennung verworfen. Die so gewaschene organische Phase wurde für 48 Stunden offen bei Raumtemperatur im Abzug stehen gelassen, um das Lösungsmittel abzdampfen.

Präparation der Substanzbibliothek

Der Rückstand der gewaschenen organischen Phasen wurde in 500 μL CHCl_3 gelöst. Ein Fünftel der Lösung (100 μL) wurde in ein separates 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und das Lösungsmittel wiederum über 48 Stunden bei Raumtemperatur abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 mL DMSO gelöst, sodass unter der Annahme vollständiger Umsetzung (100 % Ausbeute) eine 10 mM DMSO-Stammlösung hergestellt wurde. Jeweils 100 μL dieser DMSO Stammlösungen wurden in 96-Well-Platten überführt und anschließend unter 400-facher Verdünnung in Assaymedium (Opti-MEM mit Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) für die Charakterisierung im zellulären Reporterassay vorbereitet. Die finalen Testlösungen enthielten 0,25 % DMSO und unter Annahme einer 100 %-igen Ausbeute 25 μM der Testverbindungen (0,5 μL DMSO-Stammlösung auf 200 μL Medium). Als Negativkontrolle wurde entsprechend 0,25 % DMSO im Assaymedium verwendet.

Aktivitätstestung im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay

Die Aktivitätstestungen erfolgten analog wie in Kapitel 6.1.4.1 (Gal4-TLX/Gal4-VP16) und 6.1.5 (TLXfull/TAE) beschrieben. Alle Messungen wurden als Einpunktbestimmungen in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Zur Identifikation von Testverbindungen, die TLX in beiden Systemen aktivierten, wurden die Aktivitätsdaten wie folgt gefiltert: x-fache Reporteraktivierung (Gal4-TLX/Gal4-VP16) ≤ 1 und x-fache Reporteraktivierung (TLXfull/TAE) ≥ 2 .

7 Anhang

Anhang 1: Übersicht der verwendeten Fluorescein-gelabelten Coregulatorpeptide für das TLX-Coregulatorscreening.

#	Peptid	Artikelnummer	Chargennummer	Molekulargewicht	Peptidsequenz	Puffer
1	SRC1-1	PV4576	1874701F	2777 Da	Fluorescein-KYSQTSCHKLVQLLTTTAEQQL	99,9 % DMSO, 0,1 % TFA
2	SRC1-2	PV4578	1777705E	2531 Da	Fluorescein-LTARHKILHRLLEQEGSPSD	50 mM HEPES (pH 7,5)
3	SRC1-3	PV4580	2098547A	2718 Da	Fluorescein-ESKDHQLLRYLLDKDEKDL	25 mM HEPES (pH 7,5), 50 % DMSO
4	SRC1-4	PV4582	1788573H	2466 Da	Fluorescein-GPQTPQAQQKSLQQLLE	25 mM HEPES (pH 7,5), 50 % DMSO
5	SRC2-1	PV4584	950381R	2495 Da	Fluorescein-DSKGQTKLLQLLTTKSDQM	25 mM HEPES (pH 7,5), 50 % DMSO, 5 mM DTT
6	SRC2-2	PV4586	2106294A	2585 Da	Fluorescein-LKEKHKILHRLLEQDSSSPV	50 mM HEPES (pH 7,5)
7	SRC2-3	PV4588	799816B	2666 Da	Fluorescein-KKKENALLRYLLDKDDTKD	50 mM HEPES (pH 7,5)
8	SRC3-1	PV4590	1899812E	2518 Da	Fluorescein-ESKGGHKKLLQLLTCSSDDR	99,9 % DMSO, 0,1 % TFA
9	SRC3-2	PV4592	1823651D	2556 Da	Fluorescein-LQEKHRILHKLQNGNSPA	50 mM HEPES (pH 7,5)
10	SRC3-3	PV4594	1823657C	2635 Da	Fluorescein-KKENALLRYLLDRDDPSD	50 mM HEPES (pH 7,5)
11	NCOR ID1	PV4622	1899234C	3095 Da	Fluorescein-RTHRLITLADHICQITQDFARN	99,9 % DMSO, 0,1 % TFA
12	NCOR ID2	PV4624	1693738G	2865 Da	Fluorescein-DPASNLGLEIIRKALMGSFDDK	25 mM HEPES (pH 7,5), 50 % DMSO
13	SMRT ID1	PV4620	1939504B	3048 Da	Fluorescein-GHQRVVTLAQHISEVITQDYTRH	99,9 % DMSO, 0,1 % TFA
14	SMRT ID2	PV4423	2115534B	2993 Da	Fluorescein - HASTNMGLEAIIRKALMGKYDQW	50 % DMSO, 25 mM HEPES (pH 7,5)
15	CBP-1	PV4596	1823653H	2272 Da	Fluorescein-AASKHKQLSELLRGGSGS	50 mM HEPES (pH 7,5)

Anhang

16	C33	PV4606	2004254A	2539 Da	Fluorescein- HVEMHPLLMLLMESQ WGA	25 mM HEPES (pH 7,5), 50 % DMSO
17	D11FX XLF	PV4382	1975302A	2506 Da	Fluorescein- VESGSSRFMQLFMANDL LT	50 mM HEPES (pH 7,5)
18	D22	PV4386	1752162K	2499 Da	Fluorescein- LPYEGSLLLKLLRAPVEEV	10 mM Natriumcarbo nat (pH 11,0)
19	EAB1	PV4608	1904859D	2086 Da	Fluorescein- SSNHQSSRLIELLSR	50 mM HEPES (pH 7,5)
20	EA2	PV4610	1823646C	2175 Da	Fluorescein- SSKGVLRWMLAEPVSR	50 mM HEPES (pH 7,5)
21	ARA70	PV4618	1820506C	2665 Da	Fluorescein- SRETSEKFKLLFQSYNVND	25 mM HEPES (pH 7,5), 50 % DMSO
22	AR N- term	PV4616	1906471C	2602 Da	Fluorescein- SKTYRGAFQNLQSVREVI	99,9 % DMSO, 0,1 % Ameisensäure
23	PGC1A	PV4421	1975307C	2424 Da	Fluorescein- EAEEPSSLKLLAPANTQ	50 mM HEPES (pH 7,5)
24	PRIPR AP250	PV4604	2081640C	2300 Da	Fluorescein- VTLTSPLLVNLQSDISAG	10 mM Natrium- carbonat (pH 11)
25	RIP140 L6	PV4600	1838754B	2561 Da	Fluorescein- SHQKVTLQLLLGHKNEE N	50 mM HEPES (pH 7,5)
26	RIP140 L8	PV4602	1844139E	2586 Da	Fluorescein- SFSKNGLLSRLRQNDQSY	25 mM HEPES (pH 7,5), 50 % DMSO
27	TB3	PV4614	2041483B	2207 Da	Fluorescein- SSVASREWVRELSR	50 mM HEPES (pH 7,5)
28	TRAP2 20/DRI P1	PV4598	1899811D	2299 Da	Fluorescein- KVSQNPILTSLLQITGNGG	100 % DMSO
29	TRAP2 20/DR IP2	PV4549	1910338E	2554 Da	Fluorescein- NTKNHPMLMNLKDNPA QD	50 mM HEPES (pH 7,5)

Anhang 2: Übersicht der verwendeten Aminatedukte inklusive entsprechender CAS-Nummern und SMILES für den kombinatorischen, chemischen Ansatz (siehe Kapitel 4.8). Bei den Aminen **404-407** handelte es sich um Syntheseintermediate arbeitskreisinterner Doktoranden oder aus der eigenen Masterarbeit (**404** = SSPH04, Simone Schierle, Pascal Heitel; **405** = PH445, Pascal Heitel; **406** = PH495, Pascal Heitel und **407** = GF56, Giuseppe Faudone)

Amin	CAS-Nr	SMILES
158	13362-28-2	<chem>[H]OC(=O)c1c([H])c([H])nc(N([H])[H])c1[H]</chem>
159	1820-80-0	<chem>[H]c1nn([H])c(N([H])[H])c1[H]</chem>

160	615-43-0	[H]c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c(l)c1[H]
161	89-57-6	[H]OC(=O)c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1O[H]
162	107-10-8	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
163	402-13-1	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(C(F)(F)F)c([H])c1N([H])[H]
164	1197-55-3	[H]OC(=O)C([H])([H])c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
165	101-54-2	[H]c1c([H])c([H])c(N([H])c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
166	10444-89-0	[H]N([H])c1nnc(C(F)(F)F)s1
167	106-47-8	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1Cl
168	1072-97-5	[H]c1nc(N([H])[H])c([H])c([H])c1Br
169	1120-99-6	[H]c1nnc(N([H])[H])nc1[H]
170	1125-60-6	[H]c1nc([H])c2c([H])c([H])c([H])c(N([H])[H])c2c1[H]
171	1137-41-3	[H]c1c([H])c([H])c(C(=O)c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
172	123-30-8	[H]Oc1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
173	13258-63-4	[H]c1nc([H])c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c1[H]
174	14068-53-2	[H]N([H])c1nnc(C([H])([H])C([H])([H])[H])s1
175	153-78-6	[H]c1c([H])c([H])c2c(c1[H])-c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1C2([H])[H]
176	1603-40-3	[H]c1nc(N([H])[H])c(C([H])([H])[H])c([H])c1[H]
177	1603-41-4	[H]c1nc(N([H])[H])c([H])c([H])c1C([H])([H])[H]
178	1603-91-4	[H]c1sc(N([H])[H])nc1C([H])([H])[H]
179	17625-83-1	[H]c1c([H])c([H])c(C(=O)N([H])c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
180	2103-91-5	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c(C([H])([H])[H])c([H])c1[H]
181	2103-94-8	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c(Br)c([H])c1[H]
182	2103-99-3	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c(Cl)c([H])c1[H]
183	2104-09-8	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c([N+](=O)[O-])c([H])c1[H]
184	2243-47-2	[H]c1c([H])c([H])c(-c2c([H])c([H])c([H])c(N([H])[H])c2[H])c([H])c1[H]
185	24425-40-9	[H]c1c([H])c2c(c([H])c1N([H])[H])C([H])([H])C([H])([H])C2([H])[H]
186	25475-67-6	[H]c1c([H])c([H])c2c([H])c(N([H])[H])nc([H])c2c1[H]
187	2818-66-8	[H]c1c(N([H])[H])c([H])c2c(c1[H])n([H])c(=S)n2[H]
188	2835-68-9	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1C(=O)N([H])[H]
189	30709-67-2	[H]c1c([H])c([H])c(-c2nc(N([H])[H])sc2C([H])([H])[H])c([H])c1[H]
190	3096-69-3	[H]Oc1c([H])c([H])c(N([H])[H])c(C([H])([H])[H])c1C([H])([H])[H]
191	3218-02-8	[H]N([H])C([H])([H])C1([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C1([H])[H]
192	32202-61-2	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c2c(c1[H])C([H])([H])C([H])([H])C2([H])[H]
193	33252-32-3	[H]c1c(C([H])([H])C([H])([H])[H])c([H])c(N([H])[H])[n+]([H])c1[H]
194	3671-66-7	[H]c1c(N([H])[H])c([H])c2c(nc(C(F)(F)F)n2[H])c1[H]
195	4005-51-0	[H]c1nnc(N([H])[H])s1
196	4152-90-3	[H]c1c([H])c(Cl)c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c1[H]
197	4214-74-8	[H]c1nc(N([H])[H])c(Cl)c([H])c1Cl
198	4418-61-5	[H]N([H])c1nnn([H])n1
199	462-08-8	[H]c1nc([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
200	4714-67-4	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1C(=S)N([H])[H]
201	4854-84-6	[H]c1c([H])c(-c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c([H])c1C#N
202	5049-61-6	[H]c1nc([H])c(N([H])[H])nc1[H]
203	5350-57-2	[H]c1c([H])c([H])c(C(=NN([H])[H])c2c([H])c([H])c([H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
204	5469-70-5	[H]c1nnc(N([H])[H])c([H])c1[H]
205	56-09-7	[H]Oc1nc(N([H])[H])n([H])c(=O)c1[H]
206	56503-96-9	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c([H])c2c([H])c([H])c([H])c([H])c12

207	578-66-5	[H]c1nc2c(N([H])[H])c([H])c([H])c([H])c2c([H])c1[H]
208	580-15-4	[H]c1nc2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2c([H])c1[H]
209	580-17-6	[H]c1nc2c([H])c([H])c([H])c([H])c2c([H])c1N([H])[H]
210	60531-36-4	[Cl-].[H+].[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
211	61-82-5	[H]c1nc(N([H])[H])n([H])n1
212	611-34-7	[H]c1nc2c([H])c([H])c([H])c(N([H])[H])c2c([H])c1[H]
213	6318-74-7	[H]c1c([H])c([H])c(-c2nc(N([H])[H])sc2-c2c([H])c([H])c([H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
214	6344-63-4	[H]c1c([H])c([H])c2c(c1[H])-c1c([H])c([H])c([H])c(N([H])[H])c1C2([H])[H]
215	65705-44-4	[H]c1c([H])c(-c2nc(N([H])[H])sc2C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1Br
216	65802-56-4	[H]O[H].[H]c1c(N([H])[H])n([H])c(=S)n([H])c1=O
217	683-57-8	[H]N([H])C(=O)C([H])([H])Br
218	695-34-1	[H]c1nc(N([H])[H])c([H])c(C([H])([H])[H])c1[H]
219	7305-71-7	[H]c1nc(N([H])[H])sc1C([H])([H])[H]
220	74784-70-6	[H]c1nc(N([H])[H])c([H])c([H])c1C(F)(F)F
221	92-67-1	[H]c1c([H])c([H])c(-c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
222	95-23-8	[H]c1c(N([H])[H])c([H])c2c(c1[H])n([H])c(=O)n2[H]
223	96-93-5	[H]Oc1c(N([H])[H])c([H])c(S(=O)(=O)O[H])c([H])c1[N+](=O)[O-]
224	109-12-6	[H]c1nc(N([H])[H])nc([H])c1[H]
225	1198-40-9	[H]c1nc2c([H])c(Cl)c([H])c([H])c2c(N([H])[H])c1[H]
226	19735-74-1	[H]c1sc(N([H])[H])nc1C12C([H])([H])C3([H])C([H])([H])C([H])(C([H])([H])C([H])(C3([H])[H])C1([H])[H])C2([H])[H]
227	21717-96-4	[H]c1nc(N([H])[H])c([H])c([H])c1F
228	591-54-8	[H]c1nc([H])c([H])c(N([H])[H])n1
229	623-04-1	[H]OC([H])([H])c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
230	87999-04-0	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c2c(c1[H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C2([H])[H]
231	21331-43-1	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c2c([H])c([H])c([H])c([H])c2c1[H]
232	106-40-1	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1Br
233	1135-12-2	[H]c1c([H])c([H])c(C([H])([H])c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
234	24596-19-8	[H]c1c(Br)c([H])c(C([H])([H])[H])c(N([H])[H])c1C([H])([H])[H]
235	328-74-5	[H]c1c(N([H])[H])c([H])c(C(F)(F)F)c([H])c1C(F)(F)F
236	454-79-5	[H]c1c([H])c(C(F)(F)F)c([H])c(N([H])[H])c1Br
237	583-75-5	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c(C([H])([H])[H])c([H])c1Br
238	701-34-8	[H]c1c([H])c(S(=O)(=O)N([H])[H])c([H])c([H])c1Br
239	91-00-9	[H]c1c([H])c([H])c(C([H])(c2c([H])c([H])c([H])c([H])c2[H])N([H])[H])c([H])c1[H]
240	100-46-9	[H]c1c([H])c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
241	27431-62-5	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])N(C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
242	2447-57-6	[H]c1nc(OC([H])([H])[H])c(OC([H])([H])[H])c(N([H])S(=O)(=O)c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])n1
243	29676-71-9	[H]OC(=O)C([H])([H])c1nc(N([H])[H])sc1[H]
244	1134-47-0	[H]OC(=O)C([H])([H])C([H])(c1c([H])c([H])c(Cl)c([H])c1[H])C([H])([H])N([H])[H]
245	2486-69-3	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c(OC([H])([H])[H])c1[H]
246	420-04-2	[H]N([H])C#N
83	4578-31-8	[H]OC1([H])C([H])(n2c([H])nc3c(N([H])[H])nc([H])nc32)OC([H])(C([H])([H])OP(=O)([O-])[O-])C1([H])O[H].[Na+].[Na+]

247	75-04-7	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
248	80460-73-7	[H]OB(O[H])c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
249	456-14-4	[Cl-].[H+].[H]/N=C(/c1c([H])c([H])c(F)c([H])c1[H])N([H])[H]
250	3321-03-7	[H]OC(=O)C([H])(N([H])C(=O)C([H])([H])N([H])[H])C([H])([H])c1c([H])c([H])c([H])c([H])c1[H]
251	2950-43-8	[H]OS(=O)(=O)ON([H])[H]
252	102-51-2	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c(N([H])[H])c([H])c1OC([H])([H])[H]
253	106-49-0	[H]c1c([H])c(C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
40	1220-83-3	[H]c1nc(OC([H])([H])[H])c([H])c(N([H])S(=O)(=O)c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])n1
254	108-45-2	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c(N([H])[H])c1[H]
255	109-73-9	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
256	1877-77-6	[H]OC([H])([H])c1c([H])c([H])c([H])c(N([H])[H])c1[H]
257	22288-78-4	[H]c1sc(C(=O)OC([H])([H])[H])c(N([H])[H])c1[H]
258	39978-14-8	[H]c1sc([H])c(N([H])[H])c1C(=O)OC([H])([H])[H]
259	4651-81-4	[H]c1sc(N([H])[H])c(C(=O)OC([H])([H])[H])c1[H]
260	51-67-2	[H]Oc1c([H])c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
47	5424-05-5	[H]c1nc2c([H])c([H])c([H])c([H])c2nc1N([H])[H]
101a	5440-00-6	[H]N([H])c1c(N([H])[H])n(C([H])([H])[H])c(=O)n(C([H])([H])[H])c1=O
261	59-88-1	[Cl-].[H+].[H]c1c([H])c([H])c(N([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
262	7206-70-4	[H]c1c(Cl)c(N([H])[H])c([H])c(OC([H])([H])[H])c1C(=O)[O-]
263	13280-60-9	[H]OC(=O)c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1[N+](=O)[O-]
264	94-09-7	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1C(=O)OC([H])([H])C([H])([H])[H]
265	121-57-3	[H]OS(=O)(=O)c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
266	134-32-7	[H]c1c([H])c([H])c2c(N([H])[H])c([H])c([H])c([H])c2c1[H]
267	3086-62-2	[H]c1c(OC([H])([H])[H])c(OC([H])([H])[H])c(OC([H])([H])[H])c([H])c1C(=O)N([H])[H]
268	1744-22-5	[H]c1c(OC(F)(F)F)c([H])c2sc(N([H])[H])nc2c1[H]
269	62-31-7	[Cl-].[H+].[H]Oc1c([H])c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1O[H]
270	38762-41-3	[H]c1c(Cl)c([H])c(N([H])[H])c([H])c1Br
271	140-80-7	[H]N([H])C([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])N(C([H])([H])C([H])([H])[H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
272	722-92-9	[H]OC(c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H])(C(F)(F)F)C(F)(F)F
273	102767-28-2	[H]N([H])C(=O)C([H])(N1C(=O)C([H])([H])C([H])([H])C1([H])[H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
274	124832-27-5	[Cl-].[H+].[H]c1nc2c(=O)nc(N([H])[H])n([H])c2n1C([H])([H])OC([H])([H])C([H])([H])OC(=O)C([H])(N([H])[H])C([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H]
275	3737-09-5	[H]c1nc(C(=O)N([H])[H])c2c([H])c([H])c([H])c([H])c2[H])C([H])([H])C([H])([H])N(C([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H])C([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])C([H])([H])c([H])c([H])c1[H]
276	169590-42-5	[H]c1c([H])c(C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1-c1c([H])c(C(F)(F)F)nn1-c1c([H])c([H])c(S(=O)(=O)N([H])[H])c([H])c1[H]
277	1072-98-6	[H]c1nc(N([H])[H])c([H])c([H])c1Cl
278	118-92-3	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
279	141-43-5	[H]OC([H])([H])C([H])([H])N([H])[H]
280	151-63-3	[H]N([H])C([H])([H])C#N.[H]OS(=O)(=O)O[H]
281	1544-85-0	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c2c1OC(F)(F)O2
282	22483-09-6	[H]N([H])C([H])([H])C([H])(OC([H])([H])[H])OC([H])([H])[H]
283	2365-85-7	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(F)c(N([H])[H])c1[H]
284	2840-26-8	[H]c1c([H])c(C(=O)[O-])c([H])c(N([H])[H])c1OC([H])([H])[H]

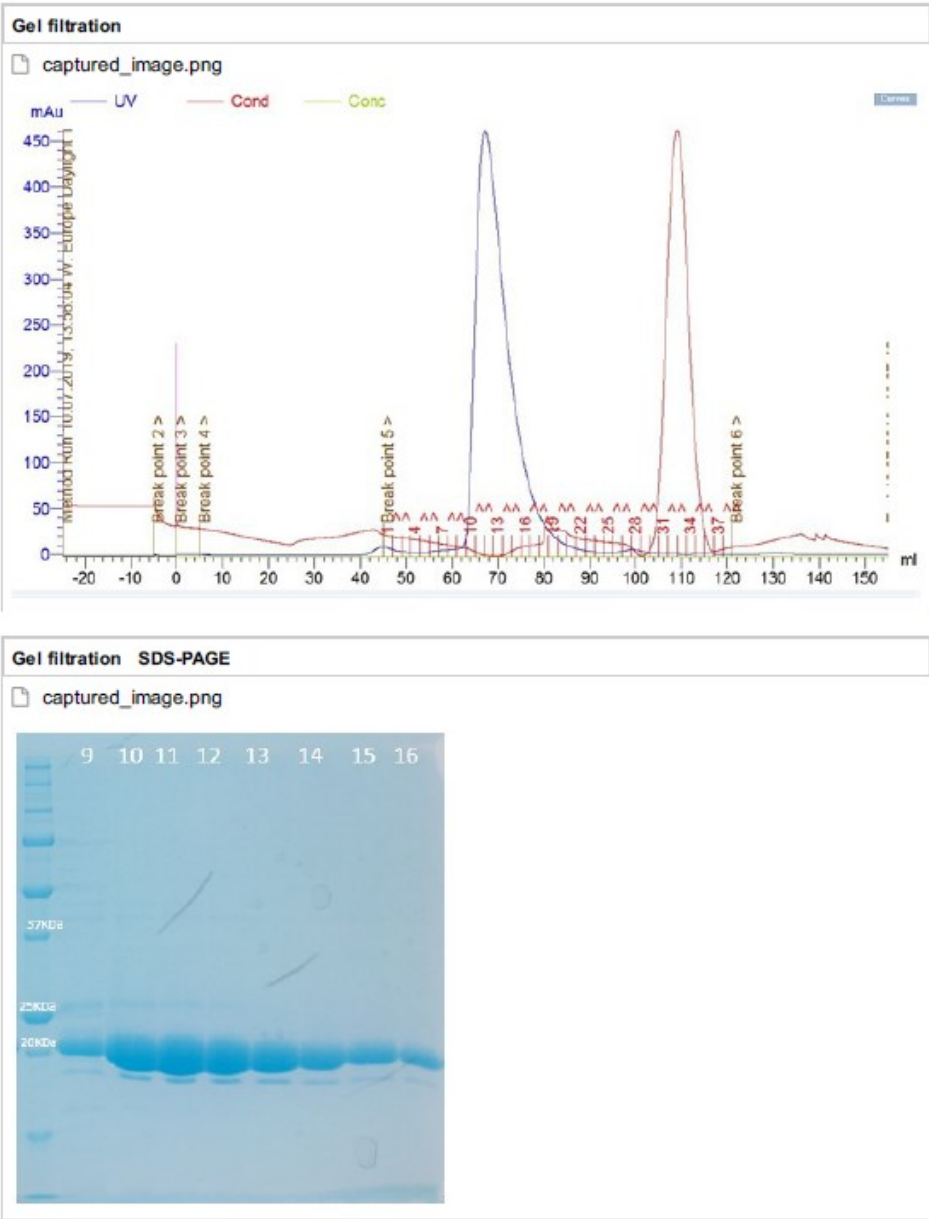
285	2840-28-0	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(Cl)c(N([H])[H])c1[H]
286	3544-24-9	[H]c1c([H])c(C(=O)N([H])[H])c([H])c(N([H])[H])c1[H]
287	3544-25-0	[H]c1c([H])c(C([H])([H])C#N)c([H])c([H])c1N([H])[H]
288	3676-85-5	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c2c1C(=O)N([H])C2=O
289	4389-50-8	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c(C(=O)[O-])c(C([H])([H])[H])c1[H]
290	5344-90-1	[H]OC([H])([H])c1c([H])c([H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
291	56961-25-2	[H]OC(=O)c1c([H])c(Cl)c(N([H])[H])c(Cl)c1[H]
292	618-84-8	[H]OC(=O)c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([N+](=O)[O-])c1[H]
293	660-88-8	[H]OC(=O)C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H]
294	7598-35-8	[H]c1nc(Br)c([H])c(N([H])[H])c1[H]
295	873-74-5	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1C#N
296	89-54-3	[H]OC(=O)c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1Cl
297	89-77-0	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(Cl)c([H])c1N([H])[H]
298	98-18-0	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c(S(=O)(=O)N([H])[H])c1[H]
299	107-95-9	[H]OC(=O)C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H]
300	15118-60-2	[H]OC(=O)C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
301	2237-30-1	[H]c1c([H])c(C#N)c([H])c(N([H])[H])c1[H]
302	2458-12-0	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(C([H])([H])[H])c(N([H])[H])c1[H]
303	2486-75-1	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1C([H])([H])[H]
304	2941-78-8	[H]OC(=O)c1c([H])c(C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
305	4294-95-5	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(OC([H])([H])[H])c([H])c1N([H])[H]
306	4389-45-1	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c([H])c(C([H])([H])[H])c1N([H])[H]
307	455-87-8	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c(F)c1[H]
308	52130-17-3	[H]c1c([H])c(C(=O)[O-])c(C([H])([H])[H])c(N([H])[H])c1[H]
309	536-90-3	[H]c1c([H])c(OC([H])([H])[H])c([H])c(N([H])[H])c1[H]
310	56-12-2	[H]OC(=O)C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H]
311	6331-71-1	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1C(=O)N(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H]
312	6928-85-4	[H]N([H])N1C([H])([H])C([H])([H])N(C([H])([H])[H])C([H])([H])C1([H])[H]
313	99-05-8	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c([H])c(N([H])[H])c1[H]
314	24242-19-1	[H]c1nc([H])c(N([H])[H])c([H])c1C(=O)[O-]
315	150-13-0	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
316	2038-03-1	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])N1C([H])([H])C([H])([H])OC([H])([H])C1([H])[H]
317	5003-71-4	[Br-].[H+].[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])Br
318	98-10-2	[H]c1c([H])c([H])c(S(=O)(=O)N([H])[H])c([H])c1[H]
319	17260-71-8	[H]c1c([H])c(Cl)c([H])c(S(=O)(=O)N([H])[H])c1[H]
320	6388-47-2	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c([H])c(Cl)c1N([H])[H]
321	95-74-9	[H]c1c([H])c(C([H])([H])[H])c(Cl)c([H])c1N([H])[H]
322	74878-31-2	[H]c1c(Cl)c(N([H])[H])c(Cl)c([H])c1C(=O)OC([H])([H])C([H])([H])[H]
323	5438-70-0	[H]c1c([H])c(C([H])([H])C(=O)OC([H])([H])C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
324	302-01-2	[H]N([H])N([H])[H]
325	5470-11-1	[Cl-].[H+].[H]ON([H])[H]
132	75-31-0	[H]N([H])C([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H]
326	104-96-1	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1SC([H])([H])[H]
327	14268-66-7	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c2c1OC([H])([H])O2
328	1783-81-9	[H]c1c([H])c(SC([H])([H])[H])c([H])c(N([H])[H])c1[H]
329	19501-58-7	[Cl].[H]c1c([H])c(N([H])N([H])[H])c([H])c([H])c1OC([H])([H])[H]
330	2393-23-9	[H]c1c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c([H])c([H])c1OC([H])([H])[H]

331	41608-64-4	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c(OC([H])([H])[H])c([H])c1C(=O)OC([H])([H])[H]
332	4518-10-9	[H]c1c([H])c(C(=O)OC([H])([H])[H])c([H])c(N([H])[H])c1[H]
333	6937-03-7	[H]c1nc(N([H])[H])c([H])c(C(=O)OC([H])([H])[H])c1[H]
334	74-89-5	[H]N([H])C([H])([H])[H]
335	91-59-8	[H]c1c([H])c([H])c2c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c2c1[H]
336	64-04-0	[H]c1c([H])c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
337	2516-34-9	[H]N([H])C1([H])C([H])([H])C([H])([H])C1([H])[H]
338	2835-77-0	[H]c1c([H])c([H])c(C(=O)c2c([H])c([H])c([H])c([H])c2N([H])[H])c([H])c1[H]
339	45791-36-4	[H]c1c([H])c(C([H])N([H])[H])C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1Br
340	57-13-6	[H]N([H])C(=O)N([H])[H]
341	619-45-4	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1C(=O)OC([H])([H])[H]
342	20925-27-3	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c(Cl)c1C#N
343	2894-51-1	[H]c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c(C(=O)c2c([H])c([H])c(Cl)c([H])c2[H])c1[H]
344	4863-91-6	[H]c1c(F)c([H])c(N([H])[H])c([H])c1Cl
345	74103-07-4	[H]OC(=O)C1([H])c2c([H])c([H])c(C(=O)c3c([H])c([H])c([H])c3[H])n2C([H])([H])C1([H])[H].[H]OC([H])([H])C(N([H])[H])(C([H])([H])O[H])C([H])([H])O[H]
346	147-82-0	[H]c1c(Br)c([H])c(Br)c(N([H])[H])c1Br
347	455-14-1	[H]c1c([H])c(C(F)(F)F)c([H])c([H])c1N([H])[H]
348	461-82-5	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1OC(F)(F)F
349	4795-29-3	[H]N([H])C([H])([H])C1([H])OC([H])([H])C([H])([H])C1([H])[H]
350	75-64-9	[H]N([H])C(C([H])([H])[H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H]
351	2010-06-2	[H]c1sc(N([H])[H])nc1-c1c([H])c([H])c([H])c1[H]
352	3167-49-5	[H]OC(=O)c1c([H])nc(N([H])[H])c([H])c1[H]
353	56-91-7	[H]OC(=O)c1c([H])c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
354	138-37-4	[Cl-].[H+].[H]c1c([H])c(S(=O)(=O)N([H])[H])c([H])c([H])c1C([H])([H])N([H])[H]
355	15996-76-6	[Cl-].[H+].[H]c1c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c([H])c([H])c1C#N
356	2393-17-1	[H]OC(=O)C([H])([H])C([H])([H])c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
357	100-01-6	[H]c1c([H])c([N+](=O)[O-])c([H])c([H])c1N([H])[H]
358	102-49-8	[H]c1c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c([H])c(Cl)c1Cl
359	104-78-9	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])N(C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
360	104-94-9	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1OC([H])([H])[H]
361	107-85-7	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
362	108-44-1	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c(C([H])([H])[H])c1[H]
363	111-26-2	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
364	111-68-2	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
365	111-86-4	[H]N([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
366	120-20-7	[H]c1c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c([H])c(OC([H])([H])[H])c1OC([H])([H])[H]
367	13214-66-9	[H]c1c([H])c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
368	139-59-3	[H]c1c([H])c([H])c(Oc2c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
369	13952-84-6	[H]N([H])C([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
370	156-43-4	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1OC([H])([H])C([H])([H])[H]
371	17852-52-7	[Cl-].[H+].[H]c1c([H])c(S(=O)(=O)N([H])[H])c([H])c([H])c1N([H])N([H])[H]

372	2039-67-0	[Cl-].[H+].[H]c1c([H])c(OC([H])([H])[H])c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])N([H])[H])c1[H]
373	2217-41-6	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c2c(c1[H])C([H])([H])C([H])([H])C([H])([H])C2([H])[H]
374	2328-12-3	[Cl-].[H]c1c(OC([H])([H])[H])c(OC([H])([H])[H])c([H])c2c1C([H])([H])C([H])([H])[N+](([H])([H])C2([H])[H]
375	3144-09-0	[H]N([H])S(=O)(=O)C([H])([H])[H]
376	368-90-1	[H]c1c([H])c(C(F)(F)F)c([H])c([H])c1N([H])N([H])[H]
377	3886-69-9	[H]c1c([H])c([H])c(C([H])(N([H])[H])C([H])([H])[H])c([H])c1[H]
378	39070-63-8	[H]c1c([H])c([H])c(C(=O)c2c([H])c([H])c(N([H])[H])c(N([H])[H])c2[H])c([H])c1[H]
379	43100-38-5	[H]c1c([H])c(C(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H])C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1C(=O)N([H])N([H])[H]
380	443-79-8	[H]OC(=O)[C@]([H])(N([H])[H])[C@@]([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])C([H])([H])[H]
381	530-47-2	[Cl-].[H+].[H]c1c([H])c([H])c(N(c2c([H])c([H])c([H])c([H])c2[H])N([H])[H])c([H])c1[H]
382	535-52-4	[H]c1c([H])c(C(F)(F)F)c([H])c(N([H])[H])c1F
383	5398-36-7	[H]c1sc(N([H])[H])nc1C(=O)OC([H])([H])C([H])([H])[H]
384	540-37-4	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c([H])c([H])c1I
385	556-90-1	[H]N([H])C1=NC(=O)C([H])([H])S1
386	557-24-4	[H]OC(=O)/C([H])=C/[H]C(=O)N([H])[H]
387	563-41-7	[Cl-].[H+].[H]N([H])C(=O)N([H])N([H])[H]
388	579-66-8	[H]c1c([H])c(C([H])([H])C([H])([H])[H])c(N([H])[H])c(C([H])([H])C([H])([H])[H])c1[H]
389	60-18-4	[H]OC(=O)C([H])(N([H])[H])C([H])([H])c1c([H])c([H])c(O[H])c([H])c1[H]
390	60-34-4	[H]N([H])N([H])C([H])([H])[H]
391	61-78-9	[H]OC(=O)C([H])([H])N([H])C(=O)c1c([H])c([H])c(N([H])[H])c([H])c1[H]
392	619-57-8	[H]Oc1c([H])c([H])c(C(=O)N([H])[H])c([H])c1[H]
393	62-56-6	[H]N([H])C(=S)N([H])[H]
394	6339-87-3	[H]c1sc(S(=O)(=O)N([H])[H])c([H])c1[H]
395	712-76-5	[H]c1c([H])c([H])c(-c2c([H])c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c([H])c2[H])c([H])c1[H]
396	769-92-6	[H]c1c([H])c(C(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H])C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
397	7803-49-8	[H]ON([H])[H]
398	87-59-2	[H]c1c([H])c(N([H])[H])c(C([H])([H])[H])c(C([H])([H])[H])c1[H]
399	95-00-1	[H]c1c([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c(Cl)c([H])c1Cl
400	95-53-4	[H]c1c([H])c([H])c(C([H])([H])[H])c(N([H])[H])c1[H]
401	99-88-7	[H]c1c([H])c(C([H])(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
402	99-98-9	[H]c1c([H])c(N(C([H])([H])[H])C([H])([H])[H])c([H])c([H])c1N([H])[H]
403	3731-52-0	[H]c1nc([H])c(C([H])([H])N([H])[H])c([H])c1[H]
404	SSPH04	COC1=CC=C(C(NC2=CC(NCC(OCC)=O)=CC=C2)=O)C(N)=C1
405	PH445	NC1=CC=CC(NC(OC@C)=O)=C1
406	PH495	CC@C1=CC=C(C(NC2=CC(CCC(OCC)=O)=CC=C2)=O)C(N)=C1
407	GF56	NC1=CC=CC(CCC(OCC)=O)=C1

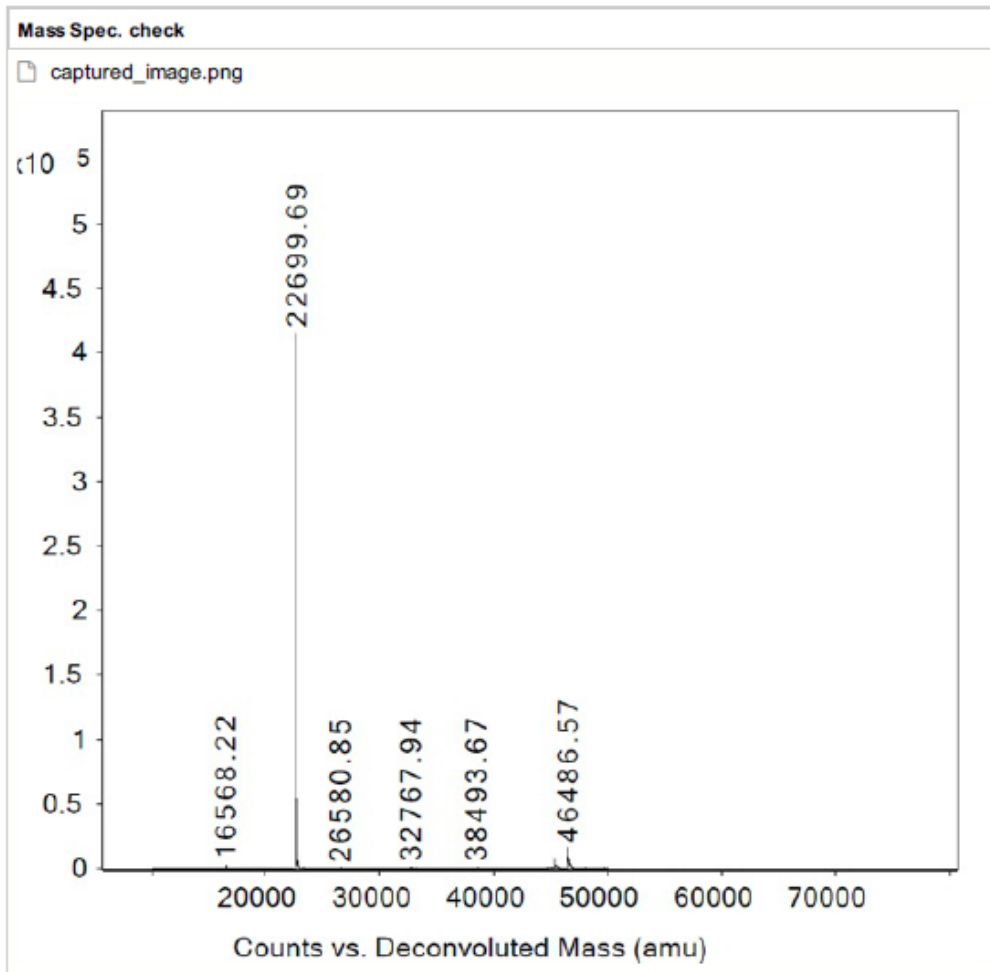
Anhang

Anhang 3: Chromatogramm des exprimierten rekombinanten TLX-LBD-Proteins und entsprechender SDS-PAGE-Analyse. Die SDS-PAGE bestätigt das Vorliegen einer monomeren TLX-LBD-Form. Mit freundlicher Genehmigung von Xiaomin Ni und Rezart Zhubi.



Anhang

Anhang 4: Massenspektrometrische Analyse des exprimierten rekombinanten TLX-LBD-Proteins. Die MS-Analyse bestätigt das Vorliegen einer monomeren TLX-LBD-Form. Mit freundlicher Genehmigung von Xiaomin Ni und Rezart Zhubi.



8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
4-DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
AcOH	Essigsäure
ADOR	Adenosinrezeptor
ADMET	engl. <i>administration, distribution, metabolism, excretion, toxicology</i>
AF-1	engl. <i>Ligand-independent activation function 1</i>
AF-2	engl. <i>Ligand-dependent activation function 1</i>
AHP	engl. <i>Adult rat hippocampus-derived progenitors</i>
AK	Arbeitskreis
Akt	engl. <i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene</i>
APNEA	[¹²⁵ I]-N ⁶ -2-(4-Aminophenyl)ethyladenosin
ATP	Adenosintriphosphat
ATRAL	engl. <i>all trans retinal</i>
Atr1	Säugetier-Atrophin-1
Atr2	Säugetier-Atrophin-2
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i>
BCL11A	engl. <i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BTSC	engl. <i>brain tumor stem cells</i>
BTG2	engl. <i>BTG anti-proliferation factor 2</i>
CARM1	engl. <i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
cDNA	engl. <i>copy deoxyribonucleic acid</i>
cAMP	engl. <i>cyclic adenosine monophosphat</i>
CGS21680	[³ H]-2-[4-(2-Carboxyethyl)phenyl]ethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosin
CHA	[³ H]-N ⁶ -Cyclohexyladenosin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i>
CMV	engl. <i>cytomegalovirus</i>
COPD	engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
COSY	engl. <i>correlated spectroscopy</i>
CPA	N ⁶ -Cyclopentyladenosin
CREBP	engl. <i>cAMP response element binding protein</i>
CTE	engl. <i>carboxyterminal extension</i>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dATRO	Drosophila Atrophin
DAX1	engl. <i>dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome Gene 1</i>
DBD	engl. <i>DNA-binding domain</i>
DC	Dünnschichtchromatographie

Abkürzungsverzeichnis

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	engl. <i>direct repeat</i>
DSF	engl. <i>differential scanning fluorimetry</i>
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	effektive mittlere Konzentration
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI-MS	engl. <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>
EtOH	Ethanol
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FI	Fluoreszenzintensitäten
FRET	engl. <i>Förster resonance energy transfer</i>
GAPDH	engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GPCR	engl. <i>G-protein coupled receptors</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HAT	engl. <i>histone acetyltransferases</i>
HCl	Salzsäure
HDAC3	engl. <i>histone deacetylase-3</i>
HEK293T	engl. human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMT	engl. <i>histone methyltransferases</i>
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HRE	engl. <i>hormone response element</i>
HR-MS	engl. <i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	engl. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTRF	engl. <i>homogenous time-resolved fluorescence</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IMAC	immobilisierte Metal-Affinitätschromatographie
iPrNH ₂	<i>Iso</i> -Propylamin
iPrOH	<i>Iso</i> -Propanol
IPTG	<i>Iso</i> -Propyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	engl. <i>inverted repeat</i>
ITC	engl. <i>isothermal titration calorimetry</i>
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LBD	engl. <i>ligand-binding domain</i>
LBP	engl. <i>ligand-binding pocket</i>
LDH	engl. <i>lactate dehydrogenase</i>
LiOH	Lithiumhydroxid
LSD-1	engl. <i>lysine-specific histone demethylase 1A</i>
MALDI	engl. <i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>

Abkürzungsverzeichnis

MARCoNI	engl. <i>microarray assay for real-time analysis of co-regulator-nuclear receptor interaction</i>
MASH1 bzw. ASCL1	engl. <i>achaete-scute homolog 1</i>
MBP	engl. <i>maltose binding protein</i>
MCS	engl. <i>multiple cloning site</i>
MMP-2	engl. <i>matrix metalloproteinase-2</i>
MMP-9	engl. <i>matrix metalloproteinase-9</i>
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ S ₂ O ₄	Natriumdithionit
NaBH(OAc) ₃	Natriumtriacetoxyborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NADP bzw. NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH	Natriumhydrid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaNO ₂	Natriumnitrit
NaOH	Natriumhydroxid
NCOR	engl. <i>nuclear receptor corepressor</i>
NECA	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
NEt ₃	Triethylamin
NH ₃	Ammoniak
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
NR	Nukleärer Rezeptor
NSC	engl. <i>neuronal stem cells</i>
NTD	engl. <i>N-terminal domain</i>
OD	optische Dichte
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
p/CAF	engl. <i>p300/CBP-associated factor</i>
p21 bzw. CDK	engl. <i>cyclin dependent kinase</i>
PAINS	engl. <i>pan-assay interference compounds</i>
Pax2	engl. <i>paired box gene 2</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PD	engl. <i>Parkinson's Disease</i>
pdb	engl. <i>protein data bank</i>
PDE	Phosphodiesterase
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphin)palladium
PI	Propidiumiodid
PIA	[³ H]-N ⁶ -(Phenylisopropyl)adenosin
PI3K	engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKA	engl. <i>protein kinase A</i>
PKC	engl. <i>protein kinase C</i>
PLC	engl. <i>phospholipase C</i>
PRMT1	engl. <i>protein arginine methyltransferase 1</i>
PTEN	engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>

Abkürzungsverzeichnis

PTM	engl. <i>posttranslational modifications</i>
qPCR	engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RA	relative Aktivierung
RE	engl. <i>response element</i>
RLE	relative Lichteinheiten
RMSD	engl. <i>root mean square deviation</i>
RT	Raumtemperatur
SAR	engl. <i>structure activity relationship</i>
sGFP	engl. <i>superfolder green fluorescent protein</i>
SGZ	Subgranuläre Zone
SHP	engl. <i>small heterodimeric partner</i>
SHR	Steroidhormonrezeptor
Sin3	engl. <i>transcriptional regulatory protein SIN3</i>
SIRT1	engl. <i>sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1</i>
SLC1a1	engl. <i>Solute carrier family 1 member 1</i>
SMRT	engl. <i>Silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors</i>
SRC-2	engl. <i>Steroid receptor coactivator 2</i>
SUMO	engl. <i>Small ubiquitin-related modifier</i>
SV40	engl. <i>simian virus 40</i>
SVZ	subventrikuläre Zone
SWI/SNF	engl. <i>Mammalian homolog of Drosophila switch defective/sucrose non fermenter</i>
TAE	engl. <i>TLX activating element</i>
TB	engl. <i>Terrific-broth</i>
Tb-SA	Tb ³⁺ -Kryptat-Streptavidinlinker
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TET3	engl. <i>Tet methylcytosine dioxygenase 3</i>
TEV	engl. <i>Tobacco etch virus</i>
THF	Tetrahydrofuran
TLC	engl. <i>Thin layer chromatography</i>
tll	engl. <i>tailless homolog</i>
TLX	Säugetier tll
TMS	Tetramethylsilan
TMSP-Na	Natriumtrimethylsilylpropionat
TRAP/DRIP/ARC	engl. <i>Thyroid hormone receptor-associated proteins/vitamin D receptor interacting protein/activator recruited cofactor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRRAP	engl. <i>Transformation/transcription domain-associated protein</i>
TUSC1	engl. <i>tumor suppressor candidate 1</i>
UV	ultraviolett
VP16	engl. <i>trans inducing factor</i>
WST	engl. <i>water soluble tetrazolium</i>
ZNS	Zentralnervensystem

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Struktur von nukleären Rezeptoren (NR).....	3
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der DNA-Bindedomäne (engl. <i>DNA-binding domain</i> , DBD).....	5
Abbildung 3: Darstellung einer monomeren DBD-Einheit (engl. <i>DNA-binding domain</i> , DBD) des Glucocorticoidrezeptors an einem kurzsträngigen HRE (engl. <i>hormone response element</i> , HRE).....	6
Abbildung 4: Darstellung der kanonischen Ligandenbindedomäne (engl. <i>ligand-binding domain</i> , LBD).....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der kanonischen Hormonantwortelemente (engl. <i>hormon response element</i> , HRE).....	10
Abbildung 6: Einteilung der nukleären Rezeptoren (NR) anhand ihrer Dimerisierungseigenschaft.....	12
Abbildung 7: Darstellung des „Mausfalle-Modell“ durch Vergleich von apo- und holo-Kristallstrukturen.....	14
Abbildung 8: Darstellung der dipolartigen Ladungsklammer zur exakten Positionierung des Coaktivator LXXLL-Motivs (grün).....	15
Abbildung 9: Transaktivierung und Transrepression von nukleären Rezeptoren (NR) entsprechender Zielgene.	17
Abbildung 10: Darstellung des TLX-dAtro-Komplexes.	22
Abbildung 11: TLX als konstitutiver Transkriptionsrepressor rekrutiert weitgehend nicht-klassische Corepressoren wie Atrophin, LSD1-CoREST, HDAC und BCL11A zur Transkriptionsrepression.....	23
Abbildung 12: Darstellung bisheriger TLX-Modulatoren.	25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 13: Projektübersicht zur Entwicklung neuartiger TLX-Modulatoren basierend auf vorausgegangen Screenings.....	29
Abbildung 14: Allgemeines Schema des Gal4-Hybridassays.....	31
Abbildung 15: Einfluss von Gal4-TLX auf die basale Transkription des Reportergens.....	35
Abbildung 16: Gal4-TLX in Kombination mit diversen Gal4-NRs in HEK293T-Zellen.	36
Abbildung 17: Effekte von ccrp1 (1), ccrp2 (2) und ccrp3 (3) im Gal4-TLX-Reporterassay.	37
Abbildung 18: Auswirkung von Gal4-TLX auf Gal4-Nurr1.	38
Abbildung 19: Auswirkung von Gal4-TLX auf Gal4-VP16.	40
Abbildung 20: Darstellung der Firefly- und Renilla-Luciferase Absolutwerte im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay.	41
Abbildung 21: Darstellung der adressierten Aminosäuren zur ortsgerichteten Mutagenese.	43
Abbildung 22: Aktivität der Gal4-TLX-Mutanten im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay.	44
Abbildung 23: Untersuchung eines potentiellen RXR α -TLX-Heterodimerisierungsmechanismus.	45
Abbildung 24: TLXfull/TAE-Reporterassay in HEK293T-Zellen.....	47
Abbildung 25: Modelle der etablierten TLX-Reporterassays.	48
Abbildung 26: Darstellung des Zwei-Zustände-Modells.	50
Abbildung 27: Modelle zur Wirkung von Agonisten und inversen Agonisten auf TLX im Gal4-Hybridformat (A) und auf das TLX-Volllängenprotein (B).....	51
Abbildung 28: Validierung der Referenzliganden.	53
Abbildung 29: Koffein (55) als inverser TLX-Agonist.	65

Abbildung 30: Modulation der Agonisten-induzierten Gal4-NR Reporteraktivierung durch Gal4-TLX in Kombinationen mit dem inversen TLX-Agonisten Koffein (55).	67
Abbildung 31: Aktivitäten der Verbindungen 34 , 68 und 69 (jeweils 30 μ M) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay.	70
Abbildung 32: Aktivität von ATP (85) (30 μ M) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay. ...	74
Abbildung 33: Aktivität an Gal4-TLX von 8-Phenyltheophyllin (97) (30 μ M) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay.	78
Abbildung 34: Selektivitätsprofil von Koffein (55) (30 μ M), 100k (10 μ M) und Istradefyllin (116) (1 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle.	88
Abbildung 35: Aktivität an Gal4-TLX von 100k (10 μ M), Istradefyllin (116) (1 μ M) und 115 (1 μ M) im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay.	89
Abbildung 36: Verdünnungsreihen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-, TLXfull/TAE- und VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay von 55 (A), 100k (B), 116 (C) und 115 (D).	90
Abbildung 37: Relative Quantifizierung der x-fachen Genexpression der TLX-Zielgene p21 (A), PTEN (B), TET3 (C), SIRT1 (D), BTG2 (F), SLC1a1 (G) und TUSC1 (H) nach achtstündiger Inkubation von T98G-Glioblastomzellen mit ccrp2 (2 , 10 μ M), Koffein (55 , 30 μ M), Istradefyllin (116 , 1 μ M), 100k (10 μ M) und 115 (1 μ M).	93
Abbildung 38: 1 H-NMR Spektrum der aromatischen Ligandensignale von ccrp2 (2) (A), Koffein (55) (B) und 100k (C) in Anwesenheit (schwarz) oder Abwesenheit (rot) von rekombinantem TLX-LBD-Protein.	95
Abbildung 39: 1 H-NMR Spektrum der aromatischen Ligandensignale von 116 (A) und 115 (B) in Anwesenheit (schwarz) oder Abwesenheit (rot) von rekombinantem TLX-LBD-Protein. ...	96
Abbildung 40: ITC-Experimente der TLX-LBD (10-40 μ M) mit den Xanthinen Koffein (55) (100 μ M), 104a (100 μ M) und 115 (100 μ M).	98
Abbildung 41: Kontrollexperimente mit Adenosin (81) zum Ausschluss ADOR-vermittelter Signalwege im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay.	100

Abbildung 42: Dosis-Wirkungskurven im Gal4-TLX/Gal4-VP16- (grau), Gal4-TLX _{A189E} /Gal4-VP16- (rot) und Gal4-TLX _{F226W I230E} -Reporterassay (grün) der Verbindungen Koffein (55) (A), 100k (B), 104a (C) Istradefyllin (116) (D) und 115 (E).	101
Abbildung 43: Untersuchung von sGFP-TLX-LBD mit Tb ³⁺ -Kryptat-Streptavidin (Tb-SA) gelabelten Atroboxeptiden.	103
Abbildung 44: TLX-Coregulator-Rekrutierungsscreening.....	104
Abbildung 45: Interaktion von TLX mit NCoR und SMRT.	105
Abbildung 46: Hetero- und Homodimerisierungsexperimente unter Verwendung von sGFP-RXR α -LBD und sGFP-TLX-LBD.	106
Abbildung 47: Aktivitäten der TLX-Agonisten 01E04 (30) und Propranolol (54) an TLX.....	112
Abbildung 48: Untersuchung von 01E04 (30) und Propranolol (54) auf RXR α -TLX-Heterodimerisierungseffekte auf zellulärer Ebene.....	115
Abbildung 49: Verdünnungsreihen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay von Atenolol (118), Sotalol (120) (A) und im TLXfull/TAE-Reporterassay von 118 , 120 (B).....	116
Abbildung 50: Selektivitätsprofil von Propranolol (54) (75 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle.....	117
Abbildung 51: ITC-Experimente von rekombinantem TLX-LBD-Protein (40 μ M) mit Propranolol (54) (200 μ M).	118
Abbildung 52: Relative Quantifizierung der x-fachen Genexpression der TLX-Zielgene SIRT1 (A), PTEN (B), TET3 (C), SLC1a1 (E) und TUSC1 (F) nach Behandlung mit Propranolol (54) und Atenolol (118).....	120
Abbildung 53: Struktur motive (grün, gelb und rot) von Propranolol (54), die zum Teil durch eine systematische SAR-Untersuchung (Bachelorarbeit: Lea Rachor) analysiert wurden. ...	121
Abbildung 54: Untersuchung der Zellviabilität nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (118), Sotalol (120) (A) und 133 , Propranolol (54) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle.....	125

Abbildung 55: Untersuchung der Zellviabilität nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (118), Sotalol (120) (A) und 133 , Propranolol (54) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle.....	126
Abbildung 56: Untersuchung pro-apoptotischer Effekte unter Färbung von DNA toter Zellen mittels Propidiumiodid (PI) nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (118), Sotalol (120) (A) und 133 , Propranolol (54) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle.....	127
Abbildung 57: Untersuchung von Proliferationseffekten nach Entfernung toter Zellen unter Verwendung von Kristallviolett nach 72 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (118), Sotalol (120) (A) und 133 , Propranolol (54) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle.....	128
Abbildung 58: Prinzip der Migrationsuntersuchung anhand der Boydenkammer.....	129
Abbildung 59: Untersuchung gerichteter Migrationseffekte nach 24 Stunden Behandlung von T98G-Zellen mit Atenolol (118), Sotalol (120) (A) und 133 , Propranolol (54) (B) gegen eine unbehandelte 0,1 % DMSO-Kontrolle mit FCS-Gradienten.	130
Abbildung 60: 06A05 (45) als TLX-Agonist.	131
Abbildung 61: Strukturvergleich zwischen Fragment 45 und ccrp2 (2). Ähnliche Struktur motive (grün und blau) sind farblich hervorgehoben.	132
Abbildung 62: Pharmakophormodell von Fragment 45 und Molekülfragment (2a) aus ccrp2 (2) (A) im Vergleich zu ccrp2 (2), welches unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt (Ermittlung erfolgte mit MOE) (B).....	133
Abbildung 63: 137b als TLX-Agonist.....	135
Abbildung 64: DSF-Experiment von ccrp2 (2), Fragment 45 und 137b bei einer Konzentration von 100 µM gegen eine unbehandelte 2 % DMSO-Kontrolle.....	136
Abbildung 65: Fusionszentren oder funktionelle Gruppen, die über Amidkupplung mit Fragment 45 vereint werden sollten.....	136

Abbildung 66: 137h als TLX-Agonist.....	140
Abbildung 67: Selektivitätsprofil von 137h (3 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten 0,1 % DMSO-Kontrolle.	141
Abbildung 68: Relative Quantifizierung der x-fachen Genexpression der TLX-Zielgene p21 (A), PTEN (B), TET3 (C), SIRT1 (D), BTG2 (F), SLC1a1 (G) und TUSC1 (H) nach Behandlung mit 45 und 137h	142
Abbildung 69: ITC-Experimente des TLX-LBD-Proteins (40 μ M) mit 137h (100 μ M).....	144
Abbildung 70: Einfluss von 137h auf die TLX-Homodimerisierung mittels HTRF (engl. <i>homogenous time-resolved fluorescence</i> , HTRF)-Experimenten.	145
Abbildung 71: Vergleich von 137h zur Startstruktur 06A05 (45) und den Referenzliganden ccrp2 (2) und BMS453 (7).....	146
Abbildung 72: Struktureller Vergleich zwischen Fragment 03A02 (34), 04E11 (39) und 06D02 (47).	148
Abbildung 73: Heat Map Darstellung der x-fachen Reporteraktivierungen der Verbindungen 408-662 im Gal4-TLX/Gal4-VP16- (A) und im TLXfull/TAE-Reporterassay (B) gegen eine unbehandelte 0,25 % DMSO-Kontrolle	154
Abbildung 74: Darstellung der drei interessantesten, möglichen Trefferkandidaten 582 , 611 und 629 mit den entsprechenden x-fachen Reporteraktivierungen im Gal4-TLX/Gal4-VP16- und TLXfull/TAE-Reporterassay.....	155
Abbildung 75: Dosis-Wirkungskurven von 582 und 629 im Gal4-TLX/Gal4-VP16-Reporterassay (A und B) und im TLXfull/TAE-Reporterassay (C und D).	158
Abbildung 76: Dosis-Wirkungskurven von 582 und 629 im VP16-RXR α /Gal4-TLX-Reporterassay (A und B).	159
Abbildung 77: ITC-Experimente der TLX-LBD (40 μ M) mit 629 (100 μ M).....	160
Abbildung 78: Übersicht der Projekte ausgehend von der Assayetablierung und dem Wirkstofffragment- bzw. Arzneistoffscreening.....	165

Abbildung 79: Übersicht und Meilensteine der Xanthinderivate als inverse TLX-Agonisten. Essentielle Substitutionspositionen (R^1 , R^2 und R^4) für eine Aktivität an Gal4-TLX sind grün hervorgehoben.....	166
Abbildung 80: Propranolol (54) als TLX-Agonist. Die essentielle Substitutionsposition für eine Aktivität an TLX ist grün markiert, während die nicht essentielle Hydroxygruppe rot markiert ist.	168
Abbildung 81: Übersicht und Meilensteine zur Generierung von 137h als potenter neuartiger TLX-Agonist.....	169
Abbildung 82: Übersicht und Meilensteine des Scaffold Hopping Ansatzes und darauffolgender kombinatorischer Chemie zur Darstellung neuartiger TLX-Modulatoren 582 , 611 und 629 .	171
Abbildung 83: Postuliertes, dynamisches Gleichgewicht von TLX-Homodimeren und RXR α -TLX-Heterodimeren.....	174

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Familie der nukleären Rezeptoren (NR).	2
Tabelle 2: Optimierte Plasmidmengen der jeweiligen Reporterassays.	49
Tabelle 3: Übersicht ausgewählter Wirkstofffragmente aus dem Prestwick-Wirkstofffragmentscreening	56
Tabelle 4: Übersicht über ausgewählte Arzneistoffe anhand einer Substruktursuche	60
Tabelle 5: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX von methylierten Xanthinderivaten 34, 55 und 65-70	69
Tabelle 6: Untersuchung weiterer Purin- und Pyrimidinderivate.....	71
Tabelle 7: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX weiterer Xanthinderivate 86-98	75
Tabelle 8: Exemplarische Übersicht der IC ₅₀ -Werte des Methylxanthins IBMX (92) an ADORs und PDEs.....	80
Tabelle 9: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX kommerziell erhältlicher und synthetisierter Xanthinderivate 68, 97, 100a-m, 104a-f, 106 und 115-117	84
Tabelle 10: Erhaltene thermodynamische Parameter der Xanthine 55, 104a und 115 nach dem Datenfit.....	99
Tabelle 11: Übersicht der IC ₅₀ -Werte und maximale Reporteraktivierungen im Gal4-TLX/Gal4-VP16-, Gal4-TLX _{A189E} /Gal4-VP16- und Gal4-TLX _{F226W I230E} /Gal4-VP16-Reporterassay von 55, 100k, 104a, 116 und 115	102
Tabelle 12: Übersicht literaturbekannter ADOR-Affinitäten der Xanthine und Harnsäurederivate 34, 55, 66-70, 88-91, 95-97, 100a-k, 104a-f, 115 und 116 im Vergleich zu den ermittelten IC ₅₀ -Werten auf Gal4-TLX.....	107
Tabelle 13: Übersicht der Aktivität an TLX ausgewählter Arzneistoffe 54, R-54, S-54 und 118-120 basierend auf Fragment 30	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 14: Erhaltene thermodynamische Parameter von Propranolol (54) nach dem Fit der ITC-Daten.....	119
Tabelle 15: Übersicht der Aktivität an TLX von 01E04 (30), Propranolol (54) und synthetisierter Propranololderivate RL29, RL31, RL35, RL48, 124, 126 und 133	124
Tabelle 16: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX synthetisierter Derivate 137a-h, 141 und 144	134
Tabelle 17: Thermodynamische Parameter von 137h nach dem Datenfit.....	144
Tabelle 18: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX synthetisierter Derivate 146, 147 und 149, 150	150
Tabelle 19: Übersicht der Aktivität an Gal4-TLX synthetisierter Derivate 153, 154 und 156, 157	152
Tabelle 20: Übersicht der Aktivität an TLX der Verbindungen 327, 356, 374, 582, 611 und 629	157
Tabelle 21: Übersicht der eingeführten Reporterassays zur Aktivitätsstudie von TLX....	163
Tabelle 22: Chemische Verschiebungssignale verwendeter deuterierter Lösungsmittel zur Referenzierung der Spektren	198

11 Schemaverzeichnis

Schema 1: Substratumsetzung der Firefly-Luciferase.....	32
Schema 2: Substratumsetzung der Renilla-Luciferase.....	33
Schema 3: Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen 100a-m (A) und zur Darstellung der Zielverbindungen 104a-f und 106 (B)	82
Schema 4: Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindung 115	83
Schema 5: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen 124, 126, RL29, RL31, RL35 und 133	122
Schema 6: Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindung RL48	123
Schema 7: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen 137a-h, 141 und 144	138
Schema 8: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen 146, 147, 149 und 150 ..	149
Schema 9: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen 153, 154, 156 und 157 ..	151
Schema 10: Syntheseroute zur Generation einer Substanzbibliothek.	153
Schema 11: Syntheserouten zur Darstellung der Zielverbindungen 582, 611 und 629	156

12 Anhangverzeichnis

Anhang 1: Übersicht der verwendeten Fluorescein-gelabelten Coregulatorpeptide für das TLX-Coregulatorscreening.	261
Anhang 2: Übersicht der verwendeten Aminedukte inklusive entsprechender CAS-Nummern und SMILES für den kombinatorischen, chemischen Ansatz (siehe Kapitel 4.8).	262
Anhang 3: Chromatogramm des exprimierten rekombinanten TLX-LBD-Proteins und entsprechender SDS-PAGE-Analyse.	269
Anhang 4: Massenspektrometrische Analyse des exprimierten rekombinanten TLX-LBD-Proteins.	270

13 Literaturverzeichnis

- (1) Toft, D.; Shyamala, G.; Gorski, J. A Receptor Molecule for Estrogens: Studies Using a Cell-Free System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1967**, *57* (6), 1740–1743.
<https://doi.org/10.1073/pnas.57.6.1740>.
- (2) Govindan, M. V.; Devic, M.; Green, S.; Gronemeyer, H.; Chambon, P. Cloning of the Human Glucocorticoid Receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13* (23), 8293–8304.
<https://doi.org/10.1093/nar/13.23.8293>.
- (3) Hollenberg, S. M.; Weinberger, C.; Ong, E. S.; Cerenr, G.; Lebo, R.; Thompson, E. B.; Rosenfeld, M. G.; Evans, R. M. Primary Structure and Expression of a Functional Human Glucocorticoid Receptor cDNA. *Nature* **1985**, *318* (6047), 635–641.
- (4) Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How Many Drug Targets Are There? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (12), 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>.
- (5) Laudet, V.; Hanni, C.; Coll, J.; Catzeflis, F.; Stehelin, D. Evolution of the Nuclear Gene Superfamily. *EMBO J.* **1990**, *1* (3), 1003–1013.
- (6) Zhang, Z.; Burch, P. E.; Cooney, A. J.; Lanz, R. B.; Pereira, F. A.; Wu, J.; Gibbs, R. A.; Weinstock, G.; Wheeler, D. A. Genomic Analysis of the Nuclear Receptor Family: New Insights Into Structure, Regulation, and Evolution From the Rat Genome. *Genome Res.* **2004**, *14* (4), 580–590. <https://doi.org/10.1101/gr.2160004>.
- (7) Owen, G. I.; Zelent, A. Origins and Evolutionary Diversification of the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57* (5), 809–827.
<https://doi.org/10.1007/s000180050043>.
- (8) Sladek, F. M. Nuclear Receptors as Drug Targets: New Developments in Coregulators, Orphan Receptors and Major Therapeutic Areas. *Expert Opin. Ther. Targets* **2003**, *7* (5), 679–684. <https://doi.org/10.1517/14728222.7.5.679>.
- (9) Zhao, L.; Zhou, S.; Gustafsson, J. Å. Nuclear Receptors: Recent Drug Discovery for Cancer Therapies. *Endocr. Rev.* **2019**, *40* (5), 1207–1249.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00222>.
- (10) A Unified Nomenclature System For. *Cell* **1999**, *97* (100), 161–163.

- (11) Weikum, E. R.; Liu, X.; Ortlund, E. A. The Nuclear Receptor Superfamily: A Structural Perspective. *Protein Sci.* **2018**, *27* (11), 1876–1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>.
- (12) Pawlak, M.; Lefebvre, P.; Staels, B. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (6), 486–504. <https://doi.org/10.2174/156802612799436641>.
- (13) Lavery, D. N.; McEwan, I. J. Structure and Function of Steroid Receptor AF1 Transactivation Domains: Induction of Active Conformations. *Biochem. J.* **2005**, *391* (3), 449–464. <https://doi.org/10.1042/BJ20050872>.
- (14) Kumar, R.; Moure, C. M.; Khan, S. H.; Callaway, C.; Grimm, S. L.; Goswami, D.; Griffin, P. R.; Edwards, D. P. Regulation of the Structurally Dynamic N-Terminal Domain of Progesterone Receptor by Protein-Induced Folding. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (42), 30285–30299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.491787>.
- (15) Weigel, N. L. Steroid Hormone Receptors and Their Regulation by Phosphorylation. *Biochem. J.* **1996**, *319* (3), 657–667. <https://doi.org/10.1042/bj3190657>.
- (16) Anbalagan, M.; Huderson, B.; Murphy, L.; Rowan, B. G. Post-Translational Modifications of Nuclear Receptors and Human Disease. *Nucl. Recept. Signal.* **2012**, *10*, 1–13. <https://doi.org/10.1621/nrs.10001>.
- (17) Lin, H. K.; Yeh, S.; Kang, H. Y.; Chang, C. Akt Suppresses Androgen-Induced Apoptosis by Phosphorylating and Inhibiting Androgen Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (13), 7200–7205. <https://doi.org/10.1073/pnas.121173298>.
- (18) Lin, H. K.; Hu, Y. C.; Yang, L.; Altuwaijri, S.; Chen, Y. T.; Kang, H. Y.; Chang, C. Suppression Versus Induction of Androgen Receptor Functions by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Prostate Cancer LNCaP Cells with Different Passage Numbers. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (51), 50902–50907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300676200>.
- (19) Fu, M.; Rao, M.; Wang, C.; Sakamaki, T.; Wang, J.; Di Vizio, D.; Zhang, X.; Albanese, C.; Balk, S.; Chang, C.; Fan, S.; Rosen, E.; Palvimo, J. J.; Jänne, O. A.; Muratoglu, S.; Avantaggiati, M. L.; Pestell, R. G. Acetylation of Androgen Receptor Enhances Coactivator Binding and Promotes Prostate Cancer Cell Growth. *Mol. Cell. Biol.* **2003**,

- 23 (23), 8563–8575. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.23.8563-8575.2003>.
- (20) Murphy, L. C.; Seekallu, S. V.; Watson, P. H. Clinical Significance of Estrogen Receptor Phosphorylation. *Endocr. Relat. Cancer* **2011**, *18* (1), 1–14.
<https://doi.org/10.1677/ERC-10-0070>.
- (21) Irusen, E.; Matthews, J. G.; Takahashi, A.; Barnes, P. J.; Chung, K. F.; Adcock, I. M. P38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Induced Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Reduces Its Activity: Role in Steroid-Insensitive Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *109* (4), 649–657. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.122465>.
- (22) Beekun, O. Van; Fleskens, V.; Kalkhoven, E. Posttranslational Modifications of PPAR- γ : Fine-Tuning the Metabolic Master Regulator. *Obesity* **2009**, *17* (2), 213–219.
<https://doi.org/10.1038/oby.2008.473>.
- (23) Song, K. H.; Park, Y. Y.; Ki, C. P.; Cheol, Y. H.; Jin, H. P.; Shong, M.; Lee, K.; Choi, H. S. The Atypical Orphan Nuclear Receptor DAX-1 Interacts with Orphan Nuclear Receptor Nur77 and Represses Its Transactivation. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18* (8), 1929–1940.
<https://doi.org/10.1210/me.2004-0043>.
- (24) Seol, W.; Choi, H. S.; Moore, D. D. An Orphan Nuclear Hormone Receptor That Lacks a DNA Binding Domain and Heterodimerizes with Other Receptors. *Science* **1996**, *272* (5266), 1336–1339. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1336>.
- (25) Gronemeyer, H.; Moras, D. Nuclear Receptors. How to Finger DNA. *Nature* **1995**, *375*, 190–191.
- (26) Helsen, C.; Kerkhofs, S.; Clinckemalie, L.; Spans, L.; Laurent, M.; Boonen, S.; Vanderschueren, D.; Claessens, F. Structural Basis for Nuclear Hormone Receptor DNA Binding. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *348* (2), 411–417.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.025>.
- (27) Schwabe, J. W. R.; Chapman, L.; Finch, J. T.; Rhodes, D. The Crystal Structure of the Estrogen Receptor DNA-Binding Domain Bound to DNA: How Receptors Discriminate between Their Response Elements. *Cell* **1993**, *75*, 567–578.
- (28) Danielsen, M.; Hinck, L.; Ringold, G. M. Two Amino Acids within the Knuckle of the First Zinc Finger Specify DNA Response Element Activation by the Glucocorticoid

- Receptor. *Cell* **1989**, 57 (7), 1131–1138. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90050-0).
- (29) Mader, S.; Kumar, V.; Verneull, H. de; Chambon, P. Three Amino Acids of the Oestrogen Receptor Are Essential to Its Ability to Distinguish an Oestrogen from a Glucocorticoid Responsive Element. *Nature* **1989**, 338, 271–274.
- (30) Zechel, C.; Shen, X. Q.; Chambon, P.; Gronemeyer, H. Dimerization Interfaces Formed between the DNA Binding Domains Determine the Cooperative Binding of RXR/RAR and RXR/TR Heterodimers to DR5 and DR4 Elements. *EMBO J.* **1994**, 13 (6), 1414–1424. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06395.x>.
- (31) Viollet, B.; Kahn, A.; Raymondjean, M. Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation Modulates DNA-Binding Activity of Hepatocyte Nuclear Factor 4. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17 (8), 4208–4219. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.8.4208>.
- (32) Schoenmakers, E.; Alen, P.; Verrijdt, G.; Peeters, B.; Verhoeven, G.; Rombauts, W.; Claessens, F. Differential DNA Binding by the Androgen and Glucocorticoid Receptors Involves the Second Zn-Finger and a C-Terminal Extension of the DNA-Binding Domains. *Biochem. J.* **1999**, 341 (3), 515–521. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3410515>.
- (33) Melvin, V. S.; Harrell, C.; Adelman, J. S.; Kraus, W. L.; Churchill, M.; Edwards, D. P. The Role of the C-Terminal Extension (CTE) of the Estrogen Receptor α and β DNA Binding Domain in DNA Binding and Interaction with HMGB. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (15), 14763–14771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313335200>.
- (34) Roemer, S. C.; Donham, D. C.; Sherman, L.; Pon, V. H.; Edwards, D. P.; Churchill, M. E. A. Structure of the Progesterone Receptor-Deoxyribonucleic Acid Complex: Novel Interactions Required for Binding to Half-Site Response Elements. *Mol. Endocrinol.* **2006**, 20 (12), 3042–3052. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0511>.
- (35) Rastinejad, F.; Wagner, T.; Zhao, Q.; Khorasanizadeh, S. Structure of the RXR-RAR DNA-Binding Complex on the Retinoic Acid Response Element DR1. *EMBO J.* **2000**, 19 (5), 1045–1054. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.1045>.
- (36) Zhao, Q.; Chasse, S. A.; Devarakonda, S.; Sierk, M. L.; Ahvazi, B.; Rastinejad, F.

- Structural Basis of RXR-DNA Interactions. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 509–520.
- (37) Rastinejad, F.; Perlmann, T.; Evans, R. M.; Sigler, P. B. Structural Determinants of Nuclear Receptor Assembly on DNA Direct Repeats. *Nature* **1995**, *375* (6528), 203–211. <https://doi.org/10.1038/375203a0>.
- (38) Gearhart, M. D.; Holmbeck, S. M. A.; Evans, R. M.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. Monomeric Complex of Human Orphan Estrogen Related Receptor-2 with DNA: A Pseudo-Dimer Interface Mediates Extended Half-Site Recognition. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327* (4), 819–832. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00183-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00183-9).
- (39) Sem, D. S.; Casimiro, D. R.; Kliewer, S. A.; Provencal, J.; Evans, R. M.; Wright, P. E. NMR Spectroscopic Studies of the DNA-Binding Domain of the Monomer-Binding Nuclear Orphan Receptor, Human Estrogen Related Receptor-2: The Carboxyl-Terminal Extension to the Zinc-Finger Region Is Unstructured in the Free Form of the Protein. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (29), 18038–18043. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18038>.
- (40) Zwart, W.; De Leeuw, R.; Rondaij, M.; Neefjes, J.; Mancini, M. A.; Michalides, R. The Hinge Region of the Human Estrogen Receptor Determines Functional Synergy between AF-1 and AF-2 in the Quantitative Response to Estradiol and Tamoxifen. *J. Cell Sci.* **2010**, *123* (8), 1253–1261. <https://doi.org/10.1242/jcs.061135>.
- (41) Burns, K. A.; Li, Y.; Arao, Y.; Petrovich, R. M.; Korach, K. S. Selective Mutations in Estrogen Receptor α D-Domain Alters Nuclear Translocation and Non-Estrogen Response Element Gene Regulatory Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (14), 12640–12649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187773>.
- (42) Delmotte, M. H.; Tahayato, A.; Formstecher, P.; Lefebvre, P. Serine 157, a Retinoic Acid Receptor α Residue Phosphorylated by Protein Kinase C in Vitro, Is Involved in RXR · RAR α Heterodimerization and Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (53), 38225–38231. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38225>.
- (43) Moras, D.; Gronemeyer, H. The Nuclear Receptor Ligand-Binding Domain: Structure and Function. *Cell Biol.* **1998**, *10*, 384–391.
- (44) Weatherman, R.; Fletterick, R.; Scanlan, T. Nuclear-Receptor Ligands and Ligand-Binding Domains. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 559–581.

- (45) Rastinejad, F.; Huang, P.; Chandra, V.; Khorasanizadeh, S. Understanding Nuclear Receptor Form and Function Using Structural Biology. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *51* (3). <https://doi.org/10.1530/JME-13-0173>.
- (46) Johnson, B. A.; Wilson, E. M.; Li, Y.; Moller, D. E.; Smith, R. G.; Zhou, G. Ligand-Induced Stabilization of PPAR γ Monitored by NMR Spectroscopy: Implications for Nuclear Receptor Activation. *J. Mol. Biol.* **2000**, *298* (2), 187–194. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3636>.
- (47) Nagy, L.; Schwabe, J. W. R. Mechanism of the Nuclear Receptor Molecular Switch. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (6), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.04.006>.
- (48) Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., & Gronemeyer, H. A Canonical Structure for the Ligand-Binding Domain of Nuclear Receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3* (2), 1996.
- (49) Frankenberg, T.; Miloh, T.; Chen, F. Y.; Ananthanarayanan, M.; Sun, A. Q.; Balasubramanian, N.; Arias, I.; Setchell, K. D. R.; Suchy, F. J.; Shneider, B. L. The Membrane Protein ATPase Class I Type 8B Member 1 Signals through Protein Kinase C Zeta to Activate the Farnesoid X Receptor. *Hepatology* **2008**, *48* (6), 1896–1905. <https://doi.org/10.1002/hep.22431>.
- (50) Pascual, G.; Fong, A. L.; Ogawa, S.; Gamliel, A.; Li, A. C.; Perissi, V.; Rose, D. W.; Willson, T. M.; Rosenfeld, M. G.; Glass, C. K. A SUMOylation-Dependent Pathway Mediates Transrepression of Inflammatory Response Genes by PPAR- γ . *Nature* **2005**, *437* (7059), 759–763. <https://doi.org/10.1038/nature03988>.
- (51) Williams, S. P.; Sigler, P. B. Atomic Structure of Progesterone Complexed with Its Receptor. *Nature* **1998**, *393*, 392–396.
- (52) Schwartz, J. A.; Zhong, L.; Deighton-Collins, S.; Zhao, C.; Skafar, D. F. Mutations Targeted to a Predicted Helix in the Extreme Carboxyl-Terminal Region of the Human Estrogen Receptor- α Alter Its Response to Estradiol and 4-Hydroxytamoxifen. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (15), 13202–13209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112215200>.
- (53) Ruse, M. D.; Privalsky, M. L.; Sladek, F. M. Competitive Cofactor Recruitment by

- Orphan Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 α 1: Modulation by the F Domain. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22 (6), 1626–1638. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.6.1626-1638.2002>.
- (54) Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Nuclear-Receptor Interactions on DNA-Response Elements. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26 (6), 384–390. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01800-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01800-X).
- (55) Umesono, K.; Murakami, K. K.; Thompson, C. C.; Evans, R. M. Direct Repeats as Selective Response Elements for the Thyroid Hormone, Retinoic Acid, and Vitamin D3 Receptors. *Cell* **1991**, 65 (7), 1255–1266. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90020-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90020-Y).
- (56) Näär, A. M.; Boutin, J. M.; Lipkin, S. M.; Yu, V. C.; Holloway, J. M.; Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. The Orientation and Spacing of Core DNA-Binding Motifs Dictate Selective Transcriptional Responses to Three Nuclear Receptors. *Cell* **1991**, 65 (7), 1267–1279. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90021-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90021-P).
- (57) Forman, B. M.; Umesono, K.; Chen, J.; Evans, R. M. Unique Response Pathways Are Established by Allosteric Interactions among Nuclear Hormone Receptors. *Cell* **1995**, 81 (4), 541–550. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90075-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90075-6).
- (58) Leblanc, B. P.; Stunnenberg, H. G. 9-Cis Retinoic Acid Signaling: Changing Partners Causes Some Excitement. *Genes Dev.* **1995**, 9 (15), 1811–1816. <https://doi.org/10.1101/gad.9.15.1811>.
- (59) Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, 157 (1), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>.
- (60) Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schiitq, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evan, R. M. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* **1995**, 83, 835–839.
- (61) Meinke, G.; Sigler, P. B. DNA-Binding Mechanism of the Monomeric Orphan Nuclear Receptor NGFI-B. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6 (5), 471–477. <https://doi.org/10.1038/8276>.
- (62) Pratt, W. B.; Toft, D. O. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and

- Immunophilin Chaperones. *Endocr. Rev.* **1997**, *18* (3), 306–360.
<https://doi.org/10.1210/er.18.3.306>.
- (63) Renaud, J. P.; Rochel, N.; Ruff, M.; Vivat, V.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal Structure of the RAR- γ Ligand-Binding Domain Bound to All-Trans Retinoic Acid. *Nature* **1995**, *378* (6558), 681–689. <https://doi.org/10.1038/378681a0>.
- (64) Nolte, R. T.; Wisely, G. B.; Westin, S.; Cobb, J. E.; Lambert, M. H.; Kurokawa, R.; Rosenfeld, M. G.; Willson, T. M.; Glass, C. K.; Milburn, M. V. Ligand Binding and Co-Activator Assembly of the Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- γ . *Nature* **1998**, *395* (6698), 137–143. <https://doi.org/10.1038/25931>.
- (65) Pissios, P.; Tzamelis, I.; Kushner, P. J.; Moore, D. D. Dynamic Stabilization of Nuclear Receptor Ligand Binding Domains by Hormone or Corepressor Binding. *Mol. Cell* **2000**, *6* (2), 245–253. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00026-5).
- (66) Meijer, F. A.; Leijten-van de Gevel, I. A.; de Vries, R. M. J. M.; Brunsveld, L. Allosteric Small Molecule Modulators of Nuclear Receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *485*, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.022>.
- (67) Hu, X.; Lazar, M. A. The CoNR Motif Controls the Recruitment of Corepressors by Nuclear Hormone Receptors. *Nature* **1999**, *402* (6757), 93–96.
<https://doi.org/10.1038/47069>.
- (68) Perissi, V.; Staszewski, L. M.; McInerney, E. M.; Kurokawa, R.; Krones, A.; Rose, D. W.; Lambert, M. H.; Milburn, M. V.; Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. Molecular Determinants of Nuclear Receptor-Corepressor Interaction. *Genes Dev.* **1999**, *13* (24), 3198–3208.
<https://doi.org/10.1101/gad.13.24.3198>.
- (69) Webb, P.; Anderson, C. M.; Valentine, C.; Nguyen, P.; Marimuthu, A.; West, B. L.; Baxter, J. D.; Kushner, P. J. The Nuclear Receptor Corepressor (N-CoR) Contains Three Isoleucine Motifs (I/LXXII) That Serve as Receptor Interaction Domains (IDs). *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14* (12), 1976–1985. <https://doi.org/10.1210/mend.14.12.0566>.
- (70) Gadaleta, R. M.; Magnani, L. Nuclear Receptors and Chromatin: An Inducible Couple. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *52* (2). <https://doi.org/10.1530/JME-13-0170>.
- (71) Wade, P. A.; Wolffe, A. P. Transcriptional Regulation: SWitching Circuitry. *Curr. Biol.*

- 1999**, 9 (6), 221–224. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80134-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80134-1).
- (72) Hargreaves, D. C.; Crabtree, G. R. ATP-Dependent Chromatin Remodeling: Genetics, Genomics and Mechanisms. *Cell Res.* **2011**, 21 (3), 396–420. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.32>.
- (73) Fondell, J. D.; Ge, H.; Roeder, R. G. Ligand Induction of a Transcriptionally Active Thyroid Hormone Receptor Coactivator Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93 (16), 8329–8333. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8329>.
- (74) Rachez, C.; Lemon, B. D.; Suldan, Z.; Bromleigh, V.; Gamble, M.; Näär, A. M.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Freedman, L. P. Ligand-Dependent Transcription Activation by Nuclear Receptors Requires the DRIP Complex. *Nature* **1999**, 398 (6730), 824–828. <https://doi.org/10.1038/19783>.
- (75) Xu, J.; Li, Q. Review of the in Vivo Functions of the P160 Steroid Receptor Coactivator Family. *Mol. Endocrinol.* **2003**, 17 (9), 1681–1692. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0116>.
- (76) Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. The Coregulator Exchange in Transcriptional Functions of Nuclear Receptors. *Genes Dev.* **2000**, 14 (2), 121–141. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>.
- (77) Rosenfeld, M. G.; Glass, C. K. Coregulator Codes of Transcriptional Regulation by Nuclear Receptors. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (40), 36865–36868. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100041200>.
- (78) Jürgens, G.; Wieschaus, E.; Nüsslein-Volhard, C.; Kluding, H. Mutations Affecting the Pattern of the Larval Cuticle in *Drosophila Melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **1984**, 193 (3), 283–295. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2004.v40.i3.265>.
- (79) Morán, É.; Jiménez, G. The Tailless Nuclear Receptor Acts as a Dedicated Repressor in the Early *Drosophila* Embryo. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, 26 (9), 3446–3454. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.9.3446-3454.2006>.
- (80) Pignoni, F.; Baldarelli, R. M.; Steingrimsson, E.; Diaz, R. J.; Patapoutian, A.; Merriam, J. R.; Lengyel, J. A. The *Drosophila* Gene Tailless Is Expressed at the Embryonic Termini and Is a Member of the Steroid Receptor Superfamily. *Cell* **1990**, 62 (1), 151–163.

- [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90249-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90249-E).
- (81) Yu, R. T.; McKeown, M.; Evans, R. M.; Umesono, K. Relationship between *Drosophila* Gap Gene *Tailless* and a Vertebrate Nuclear Receptor *Tlx*. *Nature* **1994**, *370* (6488), 375–379. <https://doi.org/10.1038/370375a0>.
- (82) Shi, Y.; Chichung Lie, D.; Taupin, P.; Nakashima, K.; Ray, J.; Yu, R. T.; Gage, F. H.; Evans, R. M. Expression and Function of Orphan Nuclear Receptor *TLX* in Adult Neural Stem Cells. *Nature* **2004**, *427* (6969), 78–83. <https://doi.org/10.1038/nature02211>.
- (83) Miyawaki, T. *Tlx*, an Orphan Nuclear Receptor, Regulates Cell Numbers and Astrocyte Development in the Developing Retina. *J. Neurosci.* **2004**, *24* (37), 8124–8134. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-04.2004>.
- (84) Monaghan, A. P.; Grau, E.; Bock, D.; Schütz, G. The Mouse Homolog of the Orphan Nuclear Receptor *Tailless* Is Expressed in the Developing Forebrain. *Development* **1995**, *121* (3), 839–853.
- (85) Gage, F. H. Neurogenesis in the Adult Brain. *J. Neurosci.* **2002**, *22* (3), 612–613. <https://doi.org/10.33588/rn.4409.2006426>.
- (86) Islam, M. M.; Zhang, C.-L. *TLX*: A Master Regulator for Neural Stem Cell Maintenance and Neurogenesis. *Biochim Biophys Acta.* **2015**, *1849* (2), 210–216. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/1/015008.Fluid>.
- (87) Obernier, K.; Simeonova, I.; Fila, T.; Mandl, C.; Hölzl-Wenig, G.; Monaghan-Nichols, P.; Ciccolini, F. Expression of *Tlx* in Both Stem Cells and Transit Amplifying Progenitors Regulates Stem Cell Activation and Differentiation in the Neonatal Lateral Subependymal Zone. *Stem Cells* **2011**, *29* (9), 1415–1426. <https://doi.org/10.1002/stem.682>.
- (88) Elmi, M.; Matsumoto, Y.; Zeng, Z. jun; Lakshminarasimhan, P.; Yang, W.; Uemura, A.; Nishikawa, S. ichi; Moshiri, A.; Tajima, N.; Ågren, H.; Funa, K. *TLX* Activates *MASH1* for Induction of Neuronal Lineage Commitment of Adult Hippocampal Neuroprogenitors. *Mol. Cell. Neurosci.* **2010**, *45* (2), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.06.003>.
- (89) Gui, H.; Li, M. L.; Tsai, C. C. A Tale of *Tailless*. *Dev. Neurosci.* **2011**, *33* (1), 1–13.

- <https://doi.org/10.1159/000321585>.
- (90) Li, W.; Sun, G.; Yang, S.; Qu, Q.; Nakashima, K.; Shi, Y. Nuclear Receptor TLX Regulates Cell Cycle Progression in Neural Stem Cells of the Developing Brain. *Mol. Endocrinol.* **2008**, *22* (1), 56–64. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0290>.
- (91) Liu, H. K.; Belz, T.; Bock, D.; Takacs, A.; Wu, H.; Lichter, P.; Chai, M.; Schütz, G. The Nuclear Receptor Tailless Is Required for Neurogenesis in the Adult Subventricular Zone. *Genes Dev.* **2008**, *22* (18), 2473–2478. <https://doi.org/10.1101/gad.479308>.
- (92) Yu, R. T.; Chiang, M. Y.; Tanabe, T.; Kobayashi, M.; Yasuda, K.; Evans, R. M.; Umesono, K. The Orphan Nuclear Receptor Tlx Regulates Pax2 and Is Essential for Vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (6), 2621–2625. <https://doi.org/10.1073/pnas.050566897>.
- (93) Zhang, C. L.; Zou, Y.; Yu, R. T.; Gage, F. H.; Evans, R. M. Nuclear Receptor TLX Prevents Retinal Dystrophy and Recruits the Corepressor Atrophin1. *Genes Dev.* **2006**, *20* (10), 1308–1320. <https://doi.org/10.1101/gad.1413606>.
- (94) O’Leary, J. D.; O’Leary, O. F.; Cryan, J. F.; Nolan, Y. M. Regulation of Behaviour by the Nuclear Receptor TLX. *Genes, Brain Behav.* **2018**, *17* (3), 1–11. <https://doi.org/10.1111/gbb.12357>.
- (95) Young, K. A.; Berry, M. L.; Mahaffey, C. L.; Saionz, J. R.; Hawes, N. L.; Chang, B.; Zheng, Q. Y.; Smith, R. S.; Bronson, R. T.; Nelson, R. J.; Simpson, E. M. Fierce: A New Mouse Deletion of Nr2e1; Violent Behaviour and Ocular Abnormalities Are Background-Dependent. *Behav. Brain Res.* **2002**, *132* (2), 145–158. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00413-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00413-2).
- (96) O’Leary, J. D.; Kozareva, D. A.; Hueston, C. M.; O’Leary, O. F.; Cryan, J. F.; Nolan, Y. M. The Nuclear Receptor Tlx Regulates Motor, Cognitive and Anxiety-Related Behaviours during Adolescence and Adulthood. *Behav. Brain Res.* **2016**, *306*, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.022>.
- (97) Abrahams, B. S.; Kwok, M. C. H.; Trinh, E.; Budaghzadeh, S.; Hossain, S. M.; Simpson, E. M. Pathological Aggression in “Fierce” Mice Corrected by Human Nuclear Receptor 2E1. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (27), 6263–6270. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4757->

04.2005.

- (98) Murai, K.; Qu, Q.; Sun, G.; Ye, P.; Li, W.; Asuelime, G.; Sun, E.; Tsai, G. E.; Shi, Y. Nuclear Receptor TLX Stimulates Hippocampal Neurogenesis and Enhances Learning and Memory in a Transgenic Mouse Model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (25), 9115–9120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406779111>.
- (99) Kumar, R. A.; McGhee, K. A.; Leach, S.; Bonaguro, R.; Maclean, A.; Aguirre-Hernandez, R.; Abrahams, B. S.; Coccaro, E. F.; Hodgins, S.; Turecki, G.; Condon, A.; Muir, W. J.; Brooks-Wilson, A. R.; Blackwood, D. H.; Simpson, E. M. Initial Association of NR2E1 with Bipolar Disorder and Identification of Candidate Mutations in Bipolar Disorder, Schizophrenia, and Aggression through Resequencing. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **2008**, *147* (6), 880–889. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30696>.
- (100) Zhu, Z.; Khan, M. A.; Weiler, M.; Blaes, J.; Jestaedt, L.; Geibert, M.; Zou, P.; Gronych, J.; Bernhardt, O.; Korshunov, A.; Bugner, V.; Lichter, P.; Radlwimmer, B.; Heiland, S.; Bendszus, M.; Wick, W.; Liu, H. K. Targeting Self-Renewal in High-Grade Brain Tumors Leads to Loss of Brain Tumor Stem Cells and Prolonged Survival. *Cell Stem Cell* **2014**, *15* (2), 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.007>.
- (101) Park, H. J.; Kim, J. K.; Jeon, H. M.; Oh, S. Y.; Kim, S. H.; Park, M. J.; Soeda, A.; Nam, D. H.; Kim, H. The Neural Stem Cell Fate Determinant TLX Promotes Tumorigenesis and Genesis of Cells Resembling Glioma Stem Cells. *Mol. Cells* **2010**, *30* (5), 403–408. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0122-z>.
- (102) Cui, Q.; Yang, S.; Ye, P.; Tian, E.; Sun, G.; Zhou, J.; Sun, G.; Liu, X.; Chen, C.; Murai, K.; Zhao, C.; Azizian, K. T.; Yang, L.; Warden, C.; Wu, X.; D'Apuzzo, M.; Brown, C.; Badie, B.; Peng, L.; et al. Downregulation of TLX Induces TET3 Expression and Inhibits Glioblastoma Stem Cell Self-Renewal and Tumorigenesis. *Nat. Commun.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10637>.
- (103) Chavali, P. L.; Saini, P. K. R.; Zhai, Q.; Vizlin-Hodzic, D.; Venkatabalasubramanian, S.; Hayashi, A.; Johansson, E.; Zeng, Z. J.; Mohlin, S.; Pählman, S.; Hansford, L.; Kaplan, D. R.; Funayama, K. TLX Activates MMP-2, Promotes Self-Renewal of Tumor Spheres in Neuroblastoma and Correlates with Poor Patient Survival. *Cell Death Dis.* **2014**, *5* (10).

- <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.449>.
- (104) Wu, D.; Yu, S.; Jia, L.; Zou, C.; Xu, Z.; Xiao, L.; Wong, K. B.; Ng, C. F.; Chan, F. L. Orphan Nuclear Receptor TLX Functions as a Potent Suppressor of Oncogene-Induced Senescence in Prostate Cancer via Its Transcriptional Co-Regulation of the CDKN1A (P21^{WAF1/CIP1}) and SIRT1 Genes. *J. Pathol.* **2015**, *236* (1), 103–115.
<https://doi.org/10.1002/path.4505>.
- (105) Jia, L.; Wu, D.; Wang, Y.; You, W.; Wang, Z.; Xiao, L.; Cai, G.; Xu, Z.; Zou, C.; Wang, F.; Teoh, J. Y. C.; Ng, C. F.; Yu, S.; Chan, F. L. Orphan Nuclear Receptor TLX Contributes to Androgen Insensitivity in Castration-Resistant Prostate Cancer via Its Repression of Androgen Receptor Transcription. *Oncogene* **2018**, *37* (25), 3340–3355.
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0198-z>.
- (106) TLX uniprot (zuletzt abgerufen am 10.12.2021)
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y466>.
- (107) Benod, C.; Villagomez, R.; Webb, P. TLX: An Elusive Receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *157*, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.11.001>.
- (108) Zhi, X.; Zhou, X. E.; He, Y.; Searose-Xu, K.; Zhang, C. L.; Tsai, C. C.; Melcher, K.; Xu, H. E. Structural Basis for Corepressor Assembly by the Orphan Nuclear Receptor TLX. *Genes Dev.* **2015**, *29* (4), 440–450. <https://doi.org/10.1101/gad.254904.114>.
- (109) Webb, P.; Benod, C.; Villagomez, R.; Filgueira, C. S.; Hwang, P. K.; Leonard, P. G.; Poncet-Montange, G.; Rajagopalan, S.; Fletterick, R. J.; Gustafsson, J. Å. The Human Orphan Nuclear Receptor Tailless (TLX, NR2E1) Is Druggable. *PLoS One* **2014**, *9* (6), e99440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099440>.
- (110) Xiang, Z. Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2006**, *7* (3), 217–227. <https://doi.org/10.2174/138920306777452312>.
- (111) Sablin, E. P.; Woods, A.; Krylova, I. N.; Hwang, P.; Ingraham, H. A.; Fletterick, R. J. The Structure of Corepressor Dax-1 Bound to Its Target Nuclear Receptor LRH-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (47), 18390–18395.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808936105>.
- (112) Kruse, S. W.; Suino-Powell, K.; Zhou, X. E.; Kretschman, J. E.; Reynolds, R.; Vonrhein,

- C.; Xu, Y.; Wang, L.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J.; Xu, H. E. Identification of COUP-TFII Orphan Nuclear Receptor as a Retinoic Acid-Activated Receptor. *PLoS Biol.* **2008**, *6* (9), 2002–2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060227>.
- (113) Tan, M. H. E.; Zhou, X. E.; Soon, F. F.; Li, X.; Li, J.; Yong, E. L.; Melcher, K.; Xu, H. E. The Crystal Structure of the Orphan Nuclear Receptor NR2E3/PNR Ligand Binding Domain Reveals a Dimeric Auto-Repressed Conformation. *PLoS One* **2013**, *8* (9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074359>.
- (114) Fulton, J.; Mazumder, B.; Whitchurch, J. B.; Monteiro, C. J.; Collins, H. M.; Chan, C. M.; Clemente, M. P.; Hernandez-Quiles, M.; Stewart, E. A.; Amoaku, W. M.; Moran, P. M.; Mongan, N. P.; Persson, J. L.; Ali, S.; Heery, D. M. Heterodimers of Photoreceptor-Specific Nuclear Receptor (PNR/NR2E3) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR γ) Are Disrupted by Retinal Disease-Associated Mutations. *Cell Death Dis.* **2017**, *8* (3), e2677-11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.98>.
- (115) Yokoyama, A.; Takezawa, S.; Schule, R.; Kitagawa, H.; Kato, S. Transrepressive Function of TLX Requires the Histone Demethylase LSD1. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (12), 3995–4003. <https://doi.org/10.1128/MCB.02030-07>.
- (116) Sun, G.; Yu, R. T.; Evans, R. M.; Shi, Y. Orphan Nuclear Receptor TLX Recruits Histone Deacetylases to Repress Transcription and Regulate Neural Stem Cell Proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (39), 15282–15287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704089104>.
- (117) Estruch, S. B.; Buzón, V.; Carbó, L. R.; Schorova, L.; Lüders, J.; Estébanez-Perpiñá, E. The Oncoprotein BCL11A Binds to Orphan Nuclear Receptor TLX and Potentiates Its Transrepressive Function. *PLoS One* **2012**, *7* (6), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037963>.
- (118) Corso-Díaz, X.; de Leeuw, C. N.; Alonso, V.; Melchers, D.; Wong, B. K. Y.; Houtman, R.; Simpson, E. M. Co-Activator Candidate Interactions for Orphan Nuclear Receptor NR2E1. *BMC Genomics* **2016**, *17* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3173-5>.
- (119) Dueva, E.; Singh, K.; Kalyta, A.; LeBlanc, E.; Rennie, P. S.; Cherkasov, A. Computer-Aided Discovery of Small Molecule Inhibitors of Transcriptional Activity of TLX (NR2E1)

- Nuclear Receptor. *Molecules* **2018**, *23* (2967), 1–10.
- (120) Griffett, K.; Bedia-Diaz, G.; Hegazy, L.; de Vera, I.; Wanninayake, U.; Koeblen, T.; Wilhelm, M.; Burris, T. The Orphan Nuclear Receptor TLX Is a Receptor for Synthetic and Natural Retinoids. *Cell Chem. Bio.* **2020**, *27*, 1272–1284.
<https://doi.org/10.2139/ssrn.3545512>.
- (121) Kandel, P.; Semerci, F.; Bajic, A.; Baluya, D.; Ma, L.; Chen, K.; Cao, A.; Phongmekhin, T.; Matinyan, N.; Choi, W.; Jiménez-Panizo, A.; Chamakuri, S.; Raji, I. O.; Chang, L.; Fuentes-Prior, P.; MacKenzie, K. R.; Benn, C. L.; Estébanez-Perpiñá, E.; Venken, K.; et al. Oleic Acid Triggers Hippocampal Neurogenesis by Binding to TLX/NR2E1. *bioRxiv* **2020**, 2020.10.28.359810.
- (122) Heering, J.; Merk, D. Hybrid Reporter Gene Assays: Versatile In Vitro Tools to Characterize Nuclear Receptor Modulators. In *Methods in Molecular Biology*; 2019; pp 175–192.
- (123) Baldwin, T. O. Firefly Luciferase: The Structure Is Known, but the Mystery Remains. *Structure* **1996**, *4* (3), 223–228. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00026-3).
- (124) Ohmiya, Y.; Hirano, T. Shining the Light: The Mechanism of the Bioluminescence Reaction of Calcium-Binding Photoproteins. *Chem. Biol.* **1996**, *3* (5), 337–347.
[https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90116-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90116-7).
- (125) Maglich, J. M.; Parks, D. J.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Goodwin, B.; Billin, A. N.; Stoltz, C. A.; Kliewer, S. A.; Lambert, M. H.; Willson, T. M.; Moore, J. T. Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (19), 17277–17283.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M300138200>.
- (126) Plunket, K. D.; Fivush, A. M.; Wilson, J. G.; Creech, K. L.; Jones, S. A.; Haffner, C. D.; Lewis, M. C.; Parks, D. J.; Moore, L. B.; Willson, T. M.; Chandra, G.; Maloney, P. R. Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR. *J. Med. Chem.* **2002**, *43* (16), 2971–2974. <https://doi.org/10.1021/jm0002127>.
- (127) Schultz, J. R.; Tu, H.; Luk, A.; Repa, J. J.; Medina, J. C.; Li, L.; Schwendner, S.; Wang, S.; Thoolen, M.; Mangelsdorf, D. J.; Lustig, K. D.; Shan, B. Role of LXRs in Control of

- Lipogenesis. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2831–2838.
<https://doi.org/10.1101/gad.850400.On>.
- (128) Allenby, G.; Bocquel, M. T.; Saunders, M.; Kazmer, S.; Speck, J.; Rosenberger, M.; Lovey, A.; Kastner, P.; Grippo, J. F.; Chambon, P.; Levin, A. A. Retinoic Acid Receptors and Retinoid X Receptors: Interactions with Endogenous Retinoic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (1), 30–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.30>.
- (129) Boehm, M. F.; Zhang, L.; Badea, B. A.; White, S. K.; Mais, D. E.; Berger, E.; Suto, C. M.; Goldman, M. E.; Heyman, R. A. Synthesis and Structure—Activity Relationships of Novel Retinoid X Receptor-Selective Retinoids. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (18), 2930–2941. <https://doi.org/10.1021/jm00044a014>.
- (130) Brown, P. J.; Stuart, L. W.; Hurley, K. P.; Lewis, M. C.; Winegar, D. A.; Wilson, J. G.; Wilkison, W. O.; Ittoop, O. R.; Willson, T. M. Identification of a Subtype Selective Human PPAR α Agonist through Parallel-Array Synthesis. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (9), 1225–1227. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00188-3).
- (131) Lehmann, J. M.; Moore, L. B.; Smith-Oliver, T. A.; Wilkison, W. O.; Willson, T. M.; Kliewer, S. A. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (22), 12953–12956. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.12953>.
- (132) Berger, J.; Leibowitz, M. D.; Doebber, T. W.; Elbrecht, A.; Zhang, B.; Zhou, G.; Biswas, C.; Cullinan, C. A.; Hayes, N. S.; Li, Y.; Tanen, M.; Ventre, J.; Wu, M. S.; Berger, G. D.; Mosley, R.; Marquis, R.; Santini, C.; Sahoo, S. P.; Tolman, R. L.; et al. Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ and PPAR δ Ligands Produce Distinct Biological Effects. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (10), 6718–6725.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6718>.
- (133) Moore, D. D.; Kato, S.; Xie, W.; Mangelsdorf, D. J.; Schmidt, D. R.; Xiao, R.; Kliewer, S. A. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I Receptors: Constitutive Androstane Receptor, Pregnane X Receptor, Farnesoid X Receptor α , Farnesoid X Receptor β , Liver X Receptor α , Liver X Receptor β , and Vitamin D Receptor. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (4), 742–759. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.6>.
- (134) Sadowski, I.; Ma, J.; Triezenberg, S.; Ptashne, M. GAL4-VP16 Is an Unusually Potent

- Transcriptional Activator. *Nature* **1988**, 335 (6190), 563–564.
<https://doi.org/10.1038/335563a0>.
- (135) Budzyński, M. A.; Puustinen, M. C.; Joutsen, J.; Sistonen, L. Uncoupling Stress-Inducible Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 from Its Activation. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, 35 (14), 2530–2540. <https://doi.org/10.1128/MCB.00816-14>.
- (136) Iwahara, N.; Hisahara, S.; Hayashi, T.; Horio, Y. Transcriptional Activation of NAD⁺-Dependent Protein Deacetylase SIRT1 by Nuclear Receptor TLX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 386 (4), 671–675. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.103>.
- (137) Mutscher, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M. Mutschler Arzneimittelwirkungen; 2001; S. 71f.
- (138) Prestwick Chemical Library, zuletzt abgerufen am 15.09.2021,
<https://www.prestwickchemical.com/screening-libraries/prestwick-drug-fragment-library/>.
- (139) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 4–17.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- (140) Jhoti, H.; Williams, G.; Rees, D. C.; Murray, C. W. The “rule of Three” for Fragment-Based Drug Discovery: Where Are We Now? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12 (8), 644.
<https://doi.org/10.1038/nrd3926-c1>.
- (141) Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A ‘Rule of Three’ for Fragment-Based Lead Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, 8 (19), 876. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02765-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02765-X).
- (142) Smellie, F. W.; Davis, C. W.; Daly, J. W.; Wells, J. N. Alkylxanthines: Inhibition of Adenosine-Elicited Accumulation of Cyclic AMP in Brain Slices and of Brain Phosphodiesterase Activity. *Life Sci.* **1979**, 24 (26), 2475–2481.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90458-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90458-2).
- (143) Francis, S. H.; Sekhar, K. R.; Ke, H.; Corbin, J. D. Inhibition of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases by Methylxanthines and Related Compounds. *Handb. Exp.*

- Pharmacol.* **2011**, *200* (200), 93–133. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_4.
- (144) Faudone, G.; Arifi, S.; Merk, D. The Medicinal Chemistry of Caffeine. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (11), 7156–7178. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00261>.
- (145) Müller, C.; Jacobson, K. A. Xanthines as Adenosine Receptor Antagonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *200* (10).
- (146) Londos, C.; Wolff, J. Two Distinct Adenosine-Sensitive Sites on Adenylate Cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74* (12), 5482–5486. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5482>.
- (147) Calker, D. van; Müller, M.; Hamprecht, B. Adenosine Regulates Via Two Different Types of Receptors, the Accumulation of Cyclic Amp in Cultured Brain Cells. *J. Neurochem.* **1979**, *33* (5), 999–1005. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x>.
- (148) B. B. Fredholm, M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. W. Daly, T. K. Harden, K. A. Jacobson, P. Leff, M. W. VI. Nomenclature and Classification of Purinoreceptors. *Pharmacology* **1994**.
- (149) Daly, J. W.; Butts-Lamb, P.; Padgett, W. Subclasses of Adenosine Receptors in the Central Nervous System: Interaction with Caffeine and Related Methylxanthines. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1983**, *3* (1), 69–80. <https://doi.org/10.1007/BF00734999>.
- (150) Zhou, Q. Y.; Chuanyu, L. I.; Olah, M. E.; Johnson, R. A.; Stiles, G. L.; Civelli, O. Molecular Cloning and Characterization of an Adenosine Receptor: The A₃ Adenosine Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (16), 7432–7436. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7432>.
- (151) Haskó, G.; Csóka, B.; Németh, Z. H.; Vizi, E. S.; Pacher, P. A_{2B} Adenosine Receptors in Immunity and Inflammation. *Trends Immunol.* **2009**, *30* (6), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.001>.
- (152) Bruns, R. F.; Daly, J. W.; Snyder, S. H. Adenosine Receptors in Brain Membranes: Binding of N⁶-Cyclohexyl[³H]Adenosine and 1,3-Diethyl-8-[³H]Phenylxanthine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77* (9), 5547–5551. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.9.5547>.

- (153) Jacobson, K. A.; Gao, Z. G. Adenosine Receptors as Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (3), 247–264. <https://doi.org/10.1038/nrd1983>.
- (154) Shafiee-Nick, R.; Afshari, A. R.; Mousavi, S. H.; Rafighdoust, A.; Askari, V. R.; Mollazadeh, H.; Fanoudi, S.; Mohtashami, E.; Rahimi, V. B.; Mohebbi, M.; Vahedi, M. M. A Comprehensive Review on the Potential Therapeutic Benefits of Phosphodiesterase Inhibitors on Cardiovascular Diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 541–556. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.084>.
- (155) Maurice, D. H.; Ke, H.; Ahmad, F.; Wang, Y.; Chung, J.; Manganiello, V. C. Advances in Targeting Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (4), 290–314. <https://doi.org/10.1038/nrd4228>.
- (156) Bender, A. T.; Beavo, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (3), 488–520. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.5>.
- (157) Francis, S. H.; Blount, M. A.; Corbin, J. D. Mammalian Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Physiol. Rev.* **2011**, *91* (2), 651–690. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2010>.
- (158) Keravis, T.; Lugnier, C. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) Isozymes as Targets of the Intracellular Signalling Network: Benefits of PDE Inhibitors in Various Diseases and Perspectives for Future Therapeutic Developments. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165* (5), 1288–1305. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01729.x>.
- (159) Reneerkens, O. A. H.; Rutten, K.; Steinbusch, H. W. M.; Blokland, A.; Prickaerts, J. Selective Phosphodiesterase Inhibitors: A Promising Target for Cognition Enhancement. *Psychopharmacology (Berl)*. **2009**, *202* (1–3), 419–443. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1273-x>.
- (160) Sutherland, E. W.; Rall, T. W. Fractionation and Characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles. *J. Biol. Chem.* **1958**, *232* (2), 1077–1091. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)77423-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77423-7).
- (161) Garst, J. E.; Kramer, G. L.; Wu, Y. J.; Wells, J. N. Inhibition of Separated Forms of Phosphodiesterases from Pig Coronary Arteries by Uracils and by 7-Substituted

- Derivatives of 1-Methyl-3-Isobutylxanthine. *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (4), 499–503.
<https://doi.org/10.1021/jm00226a010>.
- (162) Barnes, P. J. Theophylline in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: New Horizons. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2005**, *2* (4), 334–339. <https://doi.org/10.1513/pats.200504-024SR>.
- (163) van Galen, P. J. M.; Stiles, G. L.; Michaels, G.; Jacobson, K. A. Adenosine A₁ and A₂ Receptors: Structurefunction Relationships. *Med. Res. Rev.* **1992**, *12* (5), 423–471.
<https://doi.org/10.1002/med.2610120502>.
- (164) Dungo, R.; Deeks, E. D. Istradefylline: First Global Approval. *Drugs* **2013**, *73* (8), 875–882. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0066-7>.
- (165) Hockemeyer, J.; Burbiel, J. C.; Müller, C. E. Multigram-Scale Syntheses, Stability, and Photoreactions of A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists with 8-Styrylxanthine Structure: Potential Drugs for Parkinson's Disease. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (10), 3308–3318. <https://doi.org/10.1021/jo0358574>.
- (166) Wilson, C. N. A₁ Adenosine Receptor Antagonists. US 2014/0031375 A1, 2014.
- (167) Politzer, P.; Murray, J. S.; Clark, T. Halogen Bonding and Other σ -Hole Interactions: A Perspective. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (27), 11178–11189.
<https://doi.org/10.1039/c3cp00054k>.
- (168) Johansson, E.; Zhai, Q.; Zeng, Z. J.; Yoshida, T.; Funa, K. Nuclear Receptor TLX Inhibits TGF- β Signaling in Glioblastoma. *Exp. Cell Res.* **2016**, *343* (2), 118–125.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.028>.
- (169) Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent Developments in Adenosine Receptor Ligands and Their Potential as Novel Drugs. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**, *1808* (5), 1290–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.017>.
- (170) Bruns, R. F.; Daly, J. W.; Snyder, S. H. Adenosine Receptor Binding: Structure-Activity Analysis Generates Extremely Potent Xanthine Antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80* (7 I), 2077–2080. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.2077>.
- (171) Davis, S. M.; Thomas, A. L.; Nornie, K. J.; Huang, L.; Dierick, H. A. Tailless and Atrophin

- Control *Drosophila* Aggression by Regulating Neuropeptide Signalling in the Pars Intercerebralis. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms4177>.
- (172) Haecker, A.; Qi, D.; Lilja, T.; Moussian, B.; Andrioli, L. P.; Luschnig, S.; Mannervik, M. *Drosophila* Brakeless Interacts with Atrophin and Is Required for Tailless-Mediated Transcriptional Repression in Early Embryos. *PLoS Biol.* **2007**, *5* (6), 1298–1308. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050145>.
- (173) Bruns, R. F. Adenosine Antagonism by Purines, Pteridines and Benzopteridines in Human Fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* **1981**. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(81\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(81)90062-9).
- (174) Shamim, M. T.; Ukena, D.; Padgett, W. L.; Daly, J. W. Effects of 8-Phenyl and 8-Cycloalkyl Substituents on the Activity of Mono-, Di-, and Trisubstituted Alkylxanthines with Substitution at the 1-, 3-, and 7-Positions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1989**, *32* (2), 179.
- (175) Van Galen, P. J. M.; Van Bergen, A. H.; Gallo-Rodriguez, C.; Melman, N.; Olah, M. E.; Stiles, G. L.; Jacobson, K. A. A Binding Site Model and Structure-Activity Relationships for the Rat A₃ Adenosine Receptor. *Mol Pharmacol* **1994**, *45* (6), 1101–1111.
- (176) Hunter, R. E.; Barrera, C. M.; Dohanich, G. P.; Dunlap, W. P. Effects of Uric Acid and Caffeine on A₁ Adenosine Receptor Binding in Developing Rat Brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1990**, *35* (4), 791–795. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90360-T](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90360-T).
- (177) Daly, J. W.; Padgett, W.; Shamim, M. T.; Butts-Lamb, P.; Waters, J. 1,3-Dialkyl-8-(p-Sulphophenyl)Xanthines: Potent Water-Soluble Antagonists for A₁ -and A₂-Adenosine Receptors. *J. Med. Chem.* **1985**, *28* (4), 487–492. <https://doi.org/10.1021/jm00382a018>.
- (178) Jacobson, K. A.; Kiriasis, L.; Barone, S.; Bradbury, B. J.; Campagne, J. M.; Secunda, S.; Daly, J. W.; Kammula, U.; Neumeyer, J. L.; Pfeleiderer, W. Sulfur-Containing 1,3-Dialkylxanthine Derivatives as Selective Antagonists at A₁-Adenosine Receptors. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (8), 1873–1879. <https://doi.org/10.1021/jm00128a031>.
- (179) Hamilton, H. W.; Ortwine, D. F.; Worth, D. F.; Badger, E. W.; Bristol, J. A.; Bruns, R. F.;

- Haleen, S. J.; Steffen, R. P. Synthesis of Xanthines as Adenosine Antagonists, a Practical Quantitative Structure-Activity Relationship Application. *J. Med. Chem.* **1985**, *28* (8), 1071–1079. <https://doi.org/10.1021/jm00146a016>.
- (180) Jacobson, K. A.; Gallo-Rodriguez, C.; Melman, N.; Fischer, B.; Maillard, M.; Van Bergen, A.; Van Galen, P. J. M.; Karton, Y. Structure-Activity Relationships of 8-Styrylxanthines as A₂-Selective Adenosine Antagonists. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (10), 1333–1342.
- (181) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (11), 3849–3862. <https://doi.org/10.1021/jo960057x>.
- (182) Abdel-Magid, A. F.; Mehrman, S. J. A Review on the Use of Sodium Triacetoxyborohydride in the Reductive Amination of Ketones and Aldehydes. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10* (5), 971–1031. <https://doi.org/10.1021/op0601013>.
- (183) Biryán, F.; Demirelli, K.; Torğut, G.; Pihtılı, G. Synthesis, Thermal Degradation and Dielectric Properties of Poly[2-Hydroxy,3-(1-Naphthyloxy)Propyl Methacrylate]. *Polym. Bull.* **2017**, *74* (2), 583–602. <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1731-2>.
- (184) Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, *11* (SUPPL.), 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7).
- (185) Kaja, S.; Payne, A. J.; Naumchuk, Y.; Koulen, P. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2017**, *2017*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/cptx.21>.
- (186) Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M. C.; Grignani, F.; Riccardi, C. A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *J. Immunol. Methods* **1991**, *139* (2), 271–279. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90198-O](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90198-O).
- (187) https://www.biolegend.com/en-us/cell-health-tools?gclid=Cj0KCQiAkZKNBhDiARIsAPsk0WjruebxwnsRmt-mSLLY9-9eJDnqmWH91uMfwCv6hZArhjZ1ZiL6CRkaAjMeEALw_wcB, zuletzt abgerufen am

29.11.2021.

- (188) <https://www.abcam.com/crystal-violet-assay-kit-cell-viability-ab232855.html>, zuletzt abgerufen am 07.10.2021.
- (189) Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016* (4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>.
- (190) Fecher, A.; Fretz, H.; Riederer, M. 2,3,4,9-Tetrahydro-1H-Carbazole Derivatives as CRTH2 Receptor Antagonists. US 2009/0270414 A1, 2009.
- (191) Böhm, H. J.; Flohr, A.; Stahl, M. Scaffold Hopping. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1* (3), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.10.009>.
- (192) Arendash, G. W.; Schleif, W.; Rezai-Zadeh, K.; Jackson, E. K.; Zacharia, L. C.; Cracchiolo, J. R.; Shippy, D.; Tan, J. Caffeine Protects Alzheimer's Mice against Cognitive Impairment and Reduces Brain β -Amyloid Production. *Neuroscience* **2006**, *142*, 941–952. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.021>.
- (193) Arendash, G. W.; Mori, T.; Cao, C.; Mamcarz, M.; Runfeldt, M.; Dickson, A.; Rezai-Zadeh, K.; Tan, J.; Citron, B. A.; Lin, X.; Echeverria, V.; Potter, H. Caffeine Reverses Cognitive Impairment and Decreases Brain Amyloid- β Levels in Aged Alzheimer's Disease Mice. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1087>.
- (194) Ross, G. W.; Abbott, R. D.; Petrovitch, H.; Morens, D. M.; Grandinetti, A.; Tung, K. H.; Tanner, C. M.; Masaki, K. H.; Blanchette, P. L.; Curb, J. D.; Popper, J. S.; White, L. R. Association of Coffee and Caffeine Intake with the Risk of Parkinson Disease. *J. Am. Med. Assoc.* **2000**, *283* (20), 2674–2679. <https://doi.org/10.1001/jama.283.20.2674>.
- (195) Costa, J.; Lunet, N.; Santos, C.; Santos, J.; Vaz-Carneiro, A. Caffeine Exposure and the Risk of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studiess. *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *20* (SUPPL.1). <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091525>.
- (196) Sääksjärvi, K.; Knekt, P.; Rissanen, H.; Laaksonen, M. A.; Reunanen, A.; Männistö, S. Prospective Study of Coffee Consumption and Risk of Parkinson's Disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2008**, *62* (7), 908–915. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602788>.

- (197) Wong, A. D.; Ye, M.; Levy, A. F.; Rothstein, J. D.; Bergles, D. E.; Searson, P. C. The Blood-Brain Barrier: An Engineering Perspective. *Front. Neuroeng.* **2013**, *6* (JUL), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>.
- (198) FDA. Initial U.S. Approval for Nourianz https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/022075s000lbl.pdf.
- (199) Orr, A. G.; Lo, I.; Schumacher, H.; Ho, K.; Gill, M.; Guo, W.; Kim, D. H.; Knox, A.; Saito, T.; Saido, T. C.; Simms, J.; Toddes, C.; Wang, X.; Yu, G. Q.; Mucke, L. Istradefylline Reduces Memory Deficits in Aging Mice with Amyloid Pathology. *Neurobiol. Dis.* **2018**, *110*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.10.014>.
- (200) Luong, K. V. Q.; Nguyễn, L. T. H. The Role of β -Adrenergic Blockers in Parkinson's Disease: Possible Genetic and Cell-Signaling Mechanisms. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Demen.* **2013**, *28* (4), 306–317. <https://doi.org/10.1177/1533317513488919>.
- (201) Marsden, C. D.; Owen, D. A. L. Effect of Adrenergic Beta Blockade on Parkinsonian Tremor. *Am. J. Cardiol.* **1966**, *18* (3), 484. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(66\)90078-6](https://doi.org/10.1016/0002-9149(66)90078-6).
- (202) Gilligan, B. S.; Veale, J. L.; Wodak, J. Propranolol in the Treatment of Tremor. *Med. J. Aust.* **1972**, *1* (7), 320–322. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1972.tb46801.x>.
- (203) Connolly, B. S.; Lang, A. E. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2014**, *311* (16), 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>.
- (204) Olesen, J.; Hertz, M. Isoproterenol and Propranolol: Ability to Cross the Blood-Brain Barrier and Effects on Cerebral Circulation in Man. *Stroke* **1978**, *9* (4), 344–349. <https://doi.org/10.1161/01.STR.9.4.344>.
- (205) Laurens, C.; Abot, A.; Delarue, A.; Knauf, C. Central Effects of Beta-Blockers May Be Due to Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Release Independently of Their Ability to Cross the Blood-Brain Barrier. *Front. Neurosci.* **2019**, *13* (JAN), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00033>.
- (206) Tewarie, I. A.; Senders, J. T.; Hulsbergen, A. F. C.; Kremer, S.; Broekman, M. L. D. Beta-Blockers and Glioma: A Systematic Review of Preclinical Studies and Clinical Results.

- Neurosurg. Rev.* **2021**, *44*, 669–677. <https://doi.org/10.1007/s10143-020-01277-4>.
- (207) Wolter, J. K.; Wolter, N. E.; Blanch, A.; Partridge, T.; Cheng, L.; Morgenstern, D. A.; Podkowa, M.; Kaplan, D. R.; Irwin, M. S. Anti-Tumor Activity of the Beta-Adrenergic Receptor Antagonist Propranolol in Neuroblastoma. *Oncotarget* **2014**, *5* (1), 161–172. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1083>.
- (208) Annabi, B.; Lachambre, M. P.; Plouffe, K.; Moumdjian, R.; Béliveau, R. Propranolol Adrenergic Blockade Inhibits Human Brain Endothelial Cells Tubulogenesis and Matrix Metalloproteinase-9 Secretion. *Pharmacol. Res.* **2009**, *60* (5), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.05.005>.
- (209) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; Heering, J.; Lamers, C.; Lüddens, H.; Wurglics, M.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (16), 7199–7205. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00903>.
- (210) Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.066>.
- (211) Meijer, I.; Willems, S.; Ni, X.; Heering, J.; Chaikuad, A.; Merk, D. Chemical Starting Matter for HNF4 α Ligand Discovery and Chemogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (21), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms21217895>.
- (212) Willems, S.; Kilu, W.; Ni, X.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Heering, J.; Merk, D. The Orphan Nuclear Receptor Nurr1 Is Responsive to Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Commun. Chem.* **2020**, *3* (1). <https://doi.org/10.1038/s42004-020-0331-0>.
- (213) Rau, O.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Zitzkowski, J.; Meindl, N.; Bock, A.; Dingermann, T.; Abdel-Tawab, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, Are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med.* **2006**. <https://doi.org/10.1055/s-2006-946680>.
- (214) Moret, M.; Helmstädter, M.; Grisoni, F.; Schneider, G.; Merk, D. Beam Search for

- Automated Design and Scoring of Novel ROR Ligands with Machine Intelligence. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2021**, *60* (35), 19477–19482. <https://doi.org/10.1002/anie.202104405>.
- (215) Gellrich, L.; Heitel, P.; Heering, J.; Kilu, W.; Pollinger, J.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Arifi, S.; Pogoda, W.; Paulke, A.; Steinhilber, D.; Proschak, E.; Wurglics, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Bischoff, I.; Fürst, R.; Merk, D. L-Thyroxin and the Nonclassical Thyroid Hormone TETRAC Are Potent Activators of PPAR γ . *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (13), 6727–6740. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02150>.
- (216) Pédelacq, J. D.; Cabantous, S.; Tran, T.; Terwilliger, T. C.; Waldo, G. S. Engineering and Characterization of a Superfolder Green Fluorescent Protein. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (1), 79–88. <https://doi.org/10.1038/nbt1172>.
- (217) M. Vedadi, H. Berglund, F. H. N. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), 399–404.
- (218) Adams, R. W.; Holroyd, C. M.; Aguilar, J. A.; Nilsson, M.; Morris, G. A. “Perfecting” WATERGATE: Clean Proton NMR Spectra from Aqueous Solution. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (4), 358–360. <https://doi.org/10.1039/c2cc37579f>.
- (219) Schmidt, J.; Klingler, F. M.; Proschak, E.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac Do Not Interact with Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep14782>.
- (220) Hiesinger, K.; Kramer, J. S.; Beyer, S.; Eckes, T.; Brunst, S.; Flauaus, C.; Wittmann, S. K.; Weizel, L.; Kaiser, A.; Kretschmer, S. B. M.; George, S.; Angioni, C.; Heering, J.; Geisslinger, G.; Schubert-Zsilavecz, M.; Schmidtko, A.; Pogoryelov, D.; Pfeilschifter, J.; Hofmann, B.; et al. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies of Dual Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase and 5-Lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (20), 11498–11521. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00561>.
- (221) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.

14 Danksagung

Als erstes will ich mich bei Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertationsarbeit in seinem Arbeitskreis angefertigt haben zu können. Zusätzlich bedanke ich mich sehr für die inspirierenden Diskussionen während der internen Seminare, die immer zu neuen Ideen für die Projektgestaltung geführt haben.

Als nächstes will ich mich bei Prof. PD. Dr. Daniel Merk für die hervorragende Betreuung - sowohl auf fachlicher als auch auf menschlicher Ebene - meiner Arbeit bedanken. Dank der geduldvollen, fachkompetenten und vorbildlichen Arbeitsweise konnte ich meinen eigenen Horizont erweitern. Das Meiste, was ich geschätzt habe, war die große Entscheidungsfreiheit meiner Projektgestaltung und die stetige Verfügbarkeit von Prof. PD. Dr. Daniel Merk zur Diskussion von Ergebnissen und Problemen und die inspirierenden Anregungen zur Problemlösung.

Ein weiterer Dank geht an alle meine Kollegen aus dem Arbeitskreis. Ich habe sehr die Zusammenarbeit, die freundschaftliche Atmosphäre und die zahlreichen Unternehmungen genossen.

Zusätzlich danke ich Dr. Pascal Heitel für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für die fachlichen Diskussionen meiner Probleme im Rahmen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen Kooperationspartnern für die geleisteten Tätigkeiten bedanken. Hierzu bedanke ich mich sehr bei Dr. Jan Heering, Dr. Whitney Kilu und Prof. Dr. Eugen Proschak für die Durchführung aller HTRF-basierten Experimente. Darüber hinaus bedanke ich mich sehr bei Xiaomin Ni, Rezart Zhubi, Dr. Martin Schröder, Dr. Apirat Chaikwad und Prof. Dr. Stefan Knapp für die Proteinexpression und die Einarbeitung in neuen Methoden. Außerdem danke ich Dr. Iris Bischoff-Kont, Isabelle Franz und Prof. Dr. Robert Fürst sehr für die Zusammenarbeit und die Vermittlung neuer zellbasierter Methoden. Des Weiteren danke ich Dr. Sridhar Sreeramulu und Prof. Dr. Harald Schwalbe für alle NMR-basierten Studien. Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei Astrid Kaiser für alle von ihr durchgeführten Experimenten und Reinheitsbestimmungen.

Anschließend bedanke ich mich sehr bei Lea Rachor für ihre sehr gute Bachelorarbeit und bei allen meinen Praktikanten (Niklas Weichwald, Lorena Rüger, Arne Hackspacher und Fatih Celik) für ihren leistungsstarken Einsatz und Interesse.

Danksagung

Ein großer Dank geht an alle restlichen Kollegen des Instituts für Pharmazeutische Chemie und Biologie, die zu jeder Zeit hilfsbereit waren. In diesem Zusammenhang danke ich allen Professoren, die durch ihre vorbildliche Zusammenarbeit miteinander eine sehr angenehme und familiäre Atmosphäre zwischen den verschiedenen Arbeitskreisen gewährleisten.

Der größte und bei weitem wichtigste Dankspruch geht an meine Eltern. Ihnen danke ich sehr, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben ein Studium mit anschließender Promotion zu ermöglichen. Ohne ihre Erziehung, Einfluss und Unterstützung würde ich mich nicht am heutigen Punkt in meinem Leben befinden. Danke Mama, danke Papa.

15 Eidesstaatliche Erklärung

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)

Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

.....
.....
.....

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr
angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen
aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift
gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis
beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung
in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)

16 Curriculum Vitae

Name: Giuseppe Faudone



Ausbildung

- 01/2018 - 12/2021 **Promotion** im Fach Pharmazie
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Institut für Pharmazeutische Chemie
- Titel der Dissertationsarbeit: „Entwicklung und Charakterisierung von neuen Liganden des nukleären Rezeptors TLX“
 - Betreuung von Forschungspraktika und Abschlussarbeiten
 - Praktikums- und Seminarbetreuung des zweiten Semesters Pharmazie „Quantitative Analyse von Arznei-, Hilfs- und Schadstoffen“
- 10/2015 - 09/2017 **Master of Science** im Studienfach Chemie (Abschlussnote: 1,1)
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 10/2012 - 09/2015 **Bachelor of Science** im Studienfach Chemie (Abschlussnote: 1,5)
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 08/2009 - 06/2012 Abitur, Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt am Main

Berufliche Laufbahn

- 01/2022 - heute Projektmanager Extractables & Leachables, SGS Institut Fresenius GmbH, Wiesbaden
- Planung, Steuerung und Berichterung von E&L Studien
 - Bewertung von Analyseergebnissen unter GMP-Qualitätskriterien
 - Verantwortung von Kundenprojekten im nationalen und internationalen Umfeld
- 08/2014 - 12/2016 Praktikum/Werkstudententätigkeit Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
- Gehaltsbestimmungen von Wirkstoffen
 - Durchführung von sicherheitstechnischen Untersuchungen anhand der REACH-Verordnung, inkl. Dokumentation und Auswertung

Curriculum Vitae

- Erstellung von Standardarbeitsanweisungen

03/2014 - 03/2014

Praktikum Continental AG, Frankfurt am Main

- Methodenentwicklung an GC-MS
- Auswertung von Massenspektren

06/2012 - 10/2014

Nebenbeschäftigung New Yorker, Main-Taunus-Zentrum, Sulzbach (Taunus)

- Pflege des Warensortiments
- Kundenberatung
- Tätigkeiten im Kassensbereich

Auszeichnungen

11/2015

Dr. Albert Hloch-Preis für einen der besten Abschlüsse im Studiengang Bachelor-Chemie

Kenntnisse und Fähigkeiten

Kompetenzen

- präparative organische Synthese (Schlenk Technik)
- analytische Fähigkeiten (NMR, MS, IR, HPLC-MS, GC-MS)
- zellbasierte Assays (Reportergen-, Viabilitäts-, Proliferations-, Migrations-, Apoptose- und Scratchassays)
- Thermal-Shift-Assays, Isotherme Titrationskalorimetrie
- qPCR (mRNA-Extraktion, cDNA Umschreibung, SYBR Green Quantifizierung)
- virtuelles Screening
- rationales Design kleiner organischer Moleküle als tool compounds
- quantitative Analyse über volumetrische und gravimetrische Bestimmungsmethoden

Zusatzqualifikationen

- Zertifikat Hochschullehre
- Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter/innen und Beauftragte für die Biologische Sicherheit
- Brandschutzhelfer

Sprachkenntnisse

- Deutsch (Muttersprache)
- Italienisch (Muttersprache)
- Englisch (verhandlungssicher)
- Latein (Grundkenntnisse)
- Spanisch (Grundkenntnisse)

EDV-Kenntnisse

- MS-Office
- Software zur Datenanalyse (KNIME)
- Software zur Untersuchung von Biomolekülen (MOE, PyMol, Chimera, SwissModel)
- Software zur Analyse von NMR-Daten (MestReNova, Topspin)

Curriculum Vitae

- Software zur Synthese- und Reaktionsplanung (ChemBioOffice)

Main-Taunus-Kreis, 08.03.2022

Giuseppe Faudone

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Faudone', with a long horizontal flourish extending to the right.

17 Publikationsliste

Patente

- (1) Daniel Merk, Pascal Heitel, Giuseppe Faudone, Jurema Schmidt, Manfred Schubert-Zsilavecz: WO2019057969A1; Dual agonists of FXR and PPAR δ and their uses (2019 gewährt).

Wissenschaftliche Publikationen

- (1) Faudone G.; Zhubi R.; Celik F.; Knapp S.; Chaikuad A.; Heering J.; Merk D.; Design of a potent TLX agonist by rational fragment fusion, *J. Med. Chem.*, **2022**, *65*, 2288-2296.
- (2) Willems S.; Kilu W.; Faudone G.; Heering J.; Merk D.; Nurr1 modulation mediates neuroprotective effects of statins, in Revision bei *Adv. Sci.*.
- (3) Faudone G.; Kilu W.; Ni X.; Chaikuad A.; Sreeramulu S.; Heitel P.; Schwalbe H.; Knapp S.; Schubert-Zsilavecz M.; Heering J.; Merk D.; The Transcriptional Repressor Orphan Nuclear Receptor TLX is Responsive to Xanthines, *Pharmacol. Transl. Sci.*, **2021**, *4*, 1797-1807.
- (4) Faudone G.; Bischoff-Kont I.; Rachor L.; Willems S.; Zhubi R.; Kaiser A.; Chaikuad A.; Knapp S.; Fürst R.; Heering J.; Merk D.; Propranolol Activates the Orphan Nuclear Receptor TLX to Counteract Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells, *J. Med. Chem.*, **2021**, *64* (12), 8727-8738.
- (5) Faudone G.; Arifi S.; Merk D.; The Medicinal Chemistry of Caffeine, *J. Med. Chem.*, **2021**, *64* (11), 7156-7178.
- (6) Heitel, P.; Faudone, G.; Helmstädter, M.; Schmidt, J.; Kaiser, A.; Tjaden, A.; Schröder, M.; Müller-Knapp, S.; Schierle, S.; Pollinger, J.; Merk, D.; A Triple Farnesoid X Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α/δ Activator Reverses Hepatic Fibrosis in Diet-Induced NASH in Mice, *Commun. Chem.*, **2020**, *3*, 174.
- (7) Hanke, T.; Cheung, S.-Y.; Kilu, W.; Heering, J.; Ni, X.; Planz, V.; Schierle, S.; Faudone, G.; Friedrich, M.; Wanior, M.; Werz, O.; Windbergs, M.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Merk, D.; A selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor γ with unprecedented binding mode, *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*, 4555–4561.

18 Kooperationspartner

Wenn nicht durch Referenzen oder Danksagungen anders deklariert, wurde die vorliegende Arbeit im Rahmen meines Promotionsstudiums von mir selbst unter der Aufsicht meiner Betreuer generiert. Beiträge von Kooperationspartnern/Kollegen wurden kenntlich gemacht und ausdrücklich erwähnt. Folgende Arbeiten bzw. Ergebnisse wurden durch Kooperationsarbeit erhalten:

- Alle neuartigen Plasmidkonstrukte und die Plasmide zur Studie von TLX (mit Ausnahme von pECE-SV40-Gal4-VP16, pFR-Luc und pRL-SV40), die für die Reporterassays verwendet wurden, wurden von Dr. Jan Heering (Fraunhofer Institut für translationale Medizin und Pharmakologie) designed und kloniert. Nach Erhalt der fertigen Konstrukte wurden diese von mir in den entsprechenden Reporterassays verwendet.
- Entsprechende Gal4-TLX^{Mutanten} wurden ebenfalls von Dr. Jan Heering designed und kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden von mir in den entsprechenden Reporterassays verwendet.
- Die Synthese der Propranololderivate mit den Initialen **RL** erfolgte im Rahmen einer Bachelorarbeit unter meiner Betreuung durch Lea Rachor (Institut für Pharmazeutische Chemie) und wurde in dieser Arbeit lediglich zwecks einer vollständigen Diskussion aufgeführt.
- Alle HTRF-basierten Experimente wurden von Dr. Whitney Kilo (AK Prof. Dr. Eugen Proschak, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität) und Dr. Jan Heering (Fraunhofer Institut für translationale Medizin und Pharmakologie) geplant, durchgeführt und analysiert. Die entsprechenden rekombinanten Fusionsproteine wurden ebenfalls zuvor genannter Personen hergestellt und aufgereinigt.
- Das rekombinante TLX-LBD-Protein, welches für die NMR-,ITC- und DSF-Experimente verwendet wurde, wurde von Xiaomin Ni (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität), Rezart Zhubi (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität) und Dr. Apirat Chaikwad (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität) hergestellt und aufgereinigt. Die Analyse der ITC-Daten und Bestimmung entsprechender thermodynamischer Parameter erfolgte durch Dr. Apirat Chaikwad und Prof. PD. Dr. Daniel Merk (Institut für Pharmazeutische Chemie, LMU München).

Kooperationspartner

- Die ¹H-NMR-basierten Protein-Ligand-Experimente wurden von Dr. Sridhar Sreeramulu (AK Prof. Dr. Harald Schwalbe, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität) durchgeführt und analysiert.
- Die Durchführung der Proliferations-, Apoptose- und Viabilitätsexperimente (WST- und LDH-Quantifizierung in T98G-Zellen) für Propranolol (**54**), Sotalol (**120**) und **133** erfolgte durch Dr. Iris Bischoff-Kont (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie, Goethe-Universität). Hierbei unterstützte Isabelle Franz (AK Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie, Goethe-Universität). Die Durchführung der direkten Migrationsexperimente in T98G-Zellen für Propranolol (**54**) und **133** erfolgte ebenfalls von Dr. Iris Bischoff-Kont mit Unterstützung von Isabelle Franz.
- Alle Reinheitsbestimmungen der synthetisierten Substanzen über HPLC-Messungen, die Bestimmung der metabolischen Stabilitäten und die Wasserlöslichkeitsbestimmung von **137h** wurden von Astrid Kaiser (AK Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität) durchgeführt.
- Synthetisierte Derivate mit den Initialen NW (Niklas Weichwald), LR (Lorena Rüger), AH (Arne Hackspacher) und FC (Fatih Celik) wurden im Rahmen von Forschungspraktika unter meiner Betreuung dargestellt.

19 Copyrights

Alle notwendigen Copyrightanfragen wurden entsprechend den Richtlinien des Verlags eingeholt und untenstehend kenntlich gemacht.

"Reprinted with permission from [*ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2021, 4, 6, 1794–1807; Publication Date: November 23, 2021; <https://doi.org/10.1021/acspsci.1c00195>]. Copyright [2022] American Chemical Society."

"Reprinted with permission from [*J. Med. Chem.* 2021, 64, 12, 8727–8738; Publication Date: June 11, 2021; <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00733>]. Copyright [2022] American Chemical Society."

"Reprinted with permission from [*J. Med. Chem.* 2022, 65, 3, 2288–2296; Publication Date: January 6, 2022; <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01757>]. Copyright [2022] American Chemical Society."