

E. Biedermann  
R. Löser  
M. Hasmann

Abteilung Pharmakologie,  
Klinge Pharma GmbH, München

# Droloxifen hemmt das Wachstum und die Proteinsynthese von Brustkrebszellen effektiver als Tamoxifen und Toremifen

## Schlüsselwörter

Droloxifen  
MCF-7  
Proteinbiosynthese  
Wachstumshemmung

## Key Words

Droloxifene  
MCF-7  
Protein biosynthesis  
Growth inhibition

## Zusammenfassung

Das neue Antiöstrogen Droloxifen (DROL) zeichnet sich, verglichen mit Tamoxifen (TAM) oder Toremifen (TOR), durch eine mehr als 10fach höhere Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor (ER) aus. In der folgenden Studie wurde untersucht, ob diese höhere Bindungsaffinität sich entsprechend auf die Hemmung des Zellwachstums oder der Proteinbiosynthese auswirkt. Wir verglichen die antiproliferative Wirkung der drei Antiöstrogene auf die ER-positive menschliche Tumorzelllinie MCF-7 M1 und die ER-negative menschliche Tumorzelllinie MDA-MB-231 (als Negativkontrolle) unter serumfreien Bedingungen. Effekte auf die Protein-Neusynthese wurden anhand des  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Einbaus untersucht, während Veränderungen des Gesamtproteingehalts mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Sulforhodamin-101 am Flow-Cytometer quantifiziert wurden. Die  $\text{IC}_{50}$  für die Wachstumshemmung lag bei der Zelllinie MCF-7 M1 für DROL unter  $0,03 \mu\text{M}$ , während sie bei TAM oder TOR um eine Zehnerpotenz höher, bei etwa  $0,3 \mu\text{M}$ , lag. DROL hemmte im ER-abhängigen Konzentrationsbereich von  $0,03$ – $1 \mu\text{M}$  den  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Einbau überraschenderweise genauso effektiv wie Cycloheximid, ein bekannter Inhibitor der Proteinbiosynthese, während TAM oder TOR in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine Wirkungen zeigten. Die Messungen am Flow-Cytometer bestätigten diese Ergebnisse. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine höhere ER-Bindungsaffinität bei den nichtsteroiden Antiöstrogenen mit einer stärker antiproliferativen Aktivität korreliert.

## Summary

The new triphenylethylene antiestrogen droloxifene (DROL) is distinguished from tamoxifen (TAM) and toremifene (TOR) by a more than 10-fold higher binding affinity to the human estrogen receptor (ER). The present study was carried out to test whether this high affinity binding translated into increased effects on cell growth and protein synthesis. We compared the antiproliferative potency of the antiestrogens DROL, TAM and TOR on the ER-positive cell line MCF-7 M1 under serum-free conditions. The effects on cellular protein biosynthesis were determined by  $^{14}\text{C}$ -leucine incorporation, and by flow cytometry after staining cellular proteins with sulforhodamine 101. The  $\text{IC}_{50}$  value for MCF-7 M1 cell growth inhibition was found to be less than  $0.03 \mu\text{M}$  for DROL. In contrast, the dose-response curves of both TAM and TOR were shifted to at least 10-fold higher concentrations. DROL concentrations between  $0.03$  and  $1 \mu\text{M}$ , which produce no ER-independent effects, reduced the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -leucine dose-dependently with a similar efficacy

as cycloheximide, a well-known inhibitor of eukaryotic protein biosynthesis. Equimolar concentrations of TAM or TOR had no effect. Similar results were obtained by flow cytometric quantitation of cellular protein content. In conclusion, the high affinity binding of DROL to the ER is correlated by superior antiproliferative activity as compared to TAM and TOR. Surprisingly, DROL compares well with cycloheximide as an inhibitor of protein synthesis in ER-positive breast cancer cells; in contrast, TAM and TOR are without effect when tested in therapeutically relevant concentrations.

## Einleitung

Nichtsteroidale Antiöstrogene sind Triphenylethylenverbindungen, die ursprünglich als Mittel zur Regulierung der Fruchtbarkeit getestet wurden, bis man ihre selektive Wirkung auf die Proliferation Östrogenrezeptor-positiver Brustkrebszellen erkannte [1]. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit konkurrieren sie mit dem Östrogen um die Bindung am Rezeptormolekül und können so zelluläre Vorgänge beeinflussen. Das am meisten verwendete Antiöstrogen ist Tamoxifen (TAM), das jedoch neben seiner antiöstrogenen Wirkung am Menschen auch als partieller Agonist auftritt und das aufgrund seiner langen Halbwertszeit (7 Tage) zu einer Akkumulation im Körper führt [2]. Als weiteres Antiöstrogen wird Toremifen (TOR) verwendet, dessen Eigenschaften im wesentlichen dem TAM entsprechen, das jedoch eine etwas kürzere Halbwertszeit besitzt (5 Tage) und aufgrund besserer Verträglichkeit höher dosiert werden kann [3, 4]. Bei dem neu entwickelten Antiöstrogen Droloxifen (DROL) läßt sich zeigen, daß es im Vergleich zu TAM und TOR eine höhere Affinität zum Rezeptor sowie eine geringere Östrogenität und Halbwertszeit (1 Tag) besitzt, wodurch eine höhere biologische Aktivität erreicht wird. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß DROL effektiver als TAM zu einer Reduktion der S-Phasen und zu einer Arretierung Östrogenrezeptor-positiver Zellen in der G1-Phase führt [5]. In der folgenden Studie soll die wachstumshemmende Wirkung dieser drei Antiöstrogene verglichen und ihr Einfluß auf die zelluläre Proteinbiosynthese untersucht werden.

## Material und Methode

### Zellkultur

Verwendet wurde die Östrogenrezeptor(ER)-positive Mammakarzinomzelllinie MCF-7 M1 und die ER-negative Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Die Zellen wurden in IMEM-ZO Medium + 10% fetales Kälberserum kultiviert. Für Versuche unter serumfreien Bedingungen mußten die 12-«Well»-Schalen zuvor über Nacht mit 4 µg/cm<sup>2</sup> Collagen Typ IV (Sigma, Deisenhofen) beschichtet werden. Am darauffolgenden Tag wurden 70000 Zellen/ml/Well in serumfreiem Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> in Luft inkubiert. Von den zu testenden Substanzen wurden 10<sup>-2</sup> M Stocklösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt, von denen mit 96%igem Äthanol eine Verdünnungsreihe angelegt wurde.

Für die Substanzlösungen der Kulturen wurden die Substanzen anschließend im Verhältnis 1:1000 in serumfreiem Medium bis zur gewünschten Konzentration weiterverdünnt. Der Mediumwechsel erfolgte jeden 3. Tag.

### DNS-Bestimmung

Um feststellen zu können, welchen Einfluß die Substanzen auf das Wachstum der einzelnen Zelllinien ausüben, wurde nach 10 Tagen kontinuierlicher Substanzinkubation unter serumfreien Bedingungen als Proliferationsnachweis der DNS-Gehalt pro Well mit Hilfe der Burton-Methode modifiziert nach Taylor [8] bestimmt. Dazu wurde das Medium von den Kulturschalen abgesaugt, pro Well wurden 0,5 ml 0,5 N HClO<sub>4</sub> zugegeben und 30 min bei 90°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml Burton's Reagens zupipettiert und über Nacht im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte über lineare Regressionsanalyse anhand von Eichkurven. Aus den Dreifachansätzen pro Konzentration wurden jeweils Mittelwert ± Standardabweichung (SA) berechnet.

### Bestimmung des zellulären Proteingehalts mit dem Flow-Cytometer

Nachdem die Zellen 3 Tage lang kontinuierlich unter serumfreien Bedingungen mit Substanz behandelt wurden, wurde das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und der Zellrasen mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch von den Wells abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert und 30 min bei 4°C mit Methanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden erneut abzentrifugiert, anschließend in eiskalter Sulforhodamin-101-Lösung (3 mg/100 ml) 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend in der Färbelösung am Flow-Cytometer vermessen. Pro Probe wurden 20000 Zellen über Einzelzellanalyse vermessen; das Verhältnis Rotfluoreszenz/Volumen wurde berechnet.

### Bestimmung des zellulären Proteingehalts über <sup>14</sup>C-Leucin-Einbau

Nach 3 Tagen kontinuierlicher Substanzinkubation unter serumfreien Bedingungen wurden pro Well 1,85×10<sup>4</sup> Bq (in 10 µl) <sup>14</sup>C-Leucin zugegeben und weitere 2 h (MCF-7 M1) bzw. 1 h (MDA-MB-231) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von den Wells abgelöst und zusammen mit dem Inkubationsmedium in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden mit 9 ml eiskalter 10% Trichloressigsäure versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Das ausgefallene Protein wurde abfiltriert, die beladenen Filter anschließend in Szintillationsröhrchen überführt und die Radioaktivität mit einem Hewlett-Packard-Szintillationszähler bestimmt. Aus Vierfachansätzen wurde jeweils pro Konzentration der Mittelwert ± Standardabweichung ermittelt und mit dem parallel dazu bestimmten DNS-Mittelwert verrechnet.

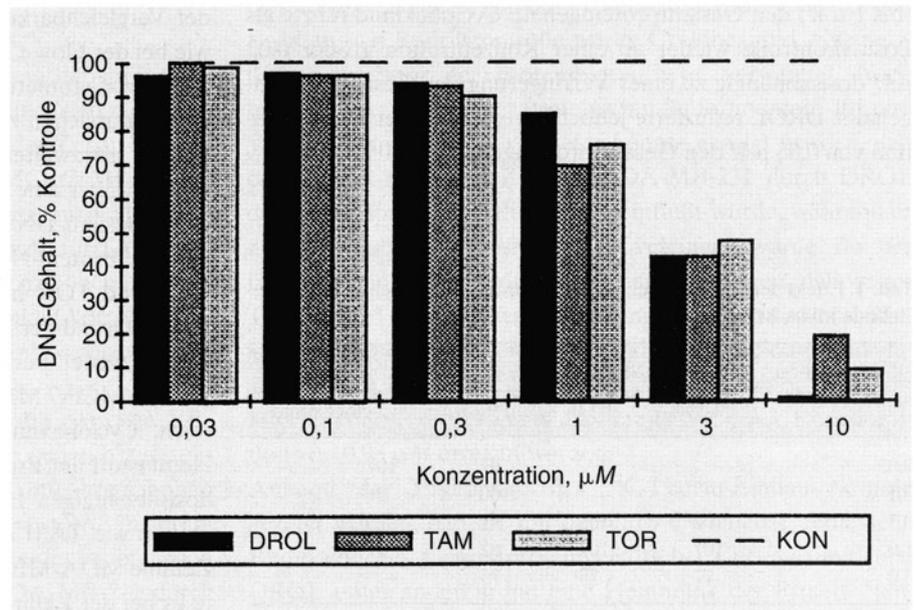
## Ergebnisse

### Einfluß der Antiöstrogene auf das Zellwachstum

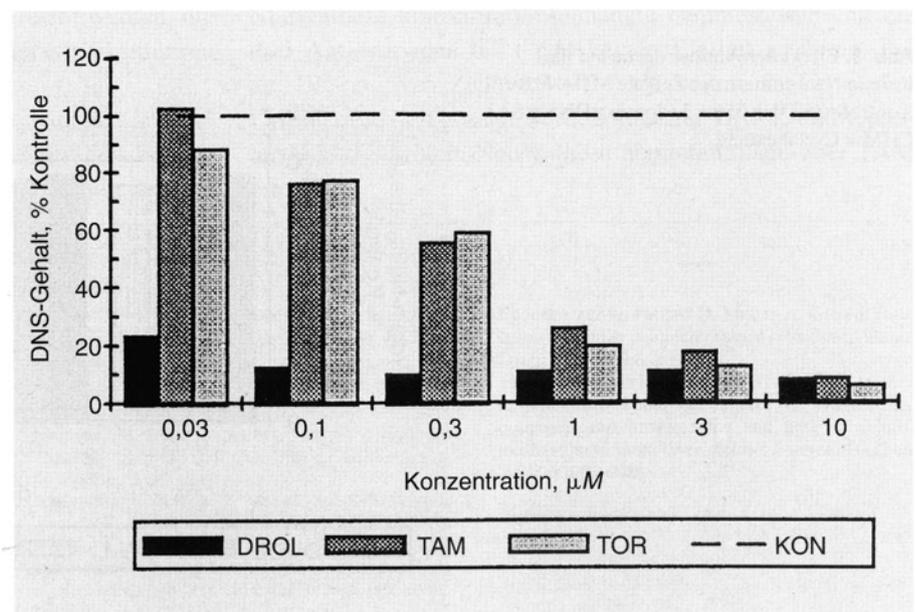
Für diesen Versuch wurde sowohl die ER-positive Zelllinie MCF-7 M1 als auch die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231

(als Negativkontrolle) 10 Tage lang kontinuierlich mit den drei Antiöstrogenen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und anschließend der DNS-Gehalt bestimmt. Bei der hormonunabhängigen Zelllinie MDA-MB-231 verlaufen die Dosiswirkungskurven der drei Antiöstrogene exakt gleich. Bis zu einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  wird die Proliferation der Zellen kaum beeinflusst. Die  $\text{IC}_{50}$  wird bei allen Zelllinien erst ab einer Konzentration  $>1 \mu\text{M}$  erreicht (Abb. 1). Anders verhält es sich bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 M1. Während die Dosiswirkungskurven für TAM und TOR gleich verlaufen, hebt sich die für DROL deutlich von den beiden anderen ab. Die  $\text{IC}_{50}$  für TAM und TOR liegt etwa bei  $0,3 \mu\text{M}$ , während sie mit DROL bereits unter  $0,03 \mu\text{M}$ , mehr als eine Zehnerpotenz niedriger, erreicht wurde (Abb. 2).

**Abb. 1.** Effekt der Antiöstrogene auf die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231. Kontrolle (KON): (DNS-Gehalt/Well  $\pm$  SA):  $13,1 \pm 0,6 \mu\text{g}$ .



**Abb. 2.** Effekt der Antiöstrogene auf die ER-positive Zelllinie MCF-7 M1. Kontrolle (KON): (DNS-Gehalt/Well  $\pm$  SA):  $19,8 \pm 1,1 \mu\text{g}$ .



messen zu können. Dazu wurden die Zellen 3 Tage lang kontinuierlich mit den Substanzen in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend fixiert. Nach Färbung der Zellen mit SR-101 wurden die Zellen am Flow-Cytometer vermessen.

Bei der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231 konnte weder TAM noch TOR im rezeptorabhängigen Bereich bis 1  $\mu\text{M}$  den Gesamtproteingehalt beeinflussen. Erst ab einer Konzentration > 1  $\mu\text{M}$  führten beide Substanzen mit gleicher Effektivität zu einer Verringerung des Gesamtproteingehalts um zirka 25%. DROL führte bereits ab einer Konzentration von 1,0  $\mu\text{M}$  zu einer Verringerung des Gesamtproteingehalts um zirka 20%. Cycloheximid als Positivkontrolle zeigte deutlich, ab einer Konzentration von 0,03  $\mu\text{M}$ , eine dosisabhängige Verringerung des Gesamtproteingehalts (Tab. 1).

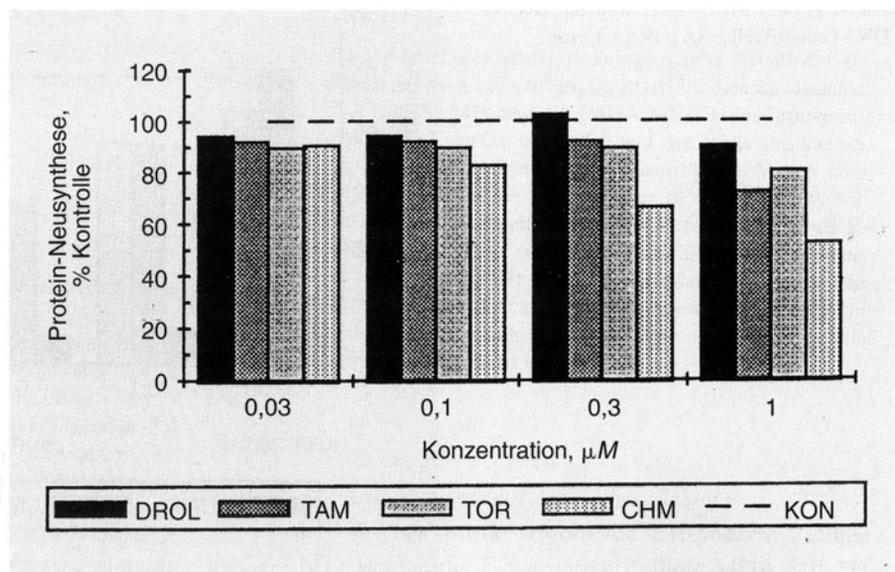
Auch bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 M1 (Tab. 2) beeinflusste weder TAM noch TOR im rezeptorabhängigen Bereich (bis 1  $\mu\text{M}$ ) den Gesamtproteingehalt. Cycloheximid führte als Positivkontrolle wieder ab einer Konzentration größer 0,03  $\mu\text{M}$  dosisabhängig zu einer Verringerung des Gesamtproteingehalts. DROL reduzierte jedoch bereits bei einer Konzentration von 0,03  $\mu\text{M}$  den Gesamtproteingehalt um 20%.

**Tab. 1.** Effekt der Antiöstrogene auf den Gesamtproteingehalt der Zelllinie MDA-MB-231

Konzentration $\mu\text{M}$	Relative SR-101-Fluoreszenz, %			
	TAM	TOR	DROL	Cycloheximid
0,03	–	–	97	107
0,1	–	–	100	91
0,3	102	108	91	73
1,0	107	104	82	51
3,0	77	75	75	–

– = Nicht gemessen.

**Abb. 3.** Effekt der Antiöstrogene auf die Protein-Neusynthese der Zelllinie MDA-MB-231. Kontrolle (KON):  $556 \pm 3$  (dpm/ $\mu\text{g}$  DNS  $\pm$  SA). CHM = Cycloheximid.



**Tab. 2.** Effekt der Antiöstrogene auf den Gesamtproteingehalt der Zelllinie MCF-7 M1

Konzentration $\mu\text{M}$	Relative SR-101-Fluoreszenz, %			
	TAM	TOR	DROL	Cycloheximid
0,03	95	107	80	112
0,1	97	101	76	93
0,3	100	99	64	78
1,0	95	101	–	66

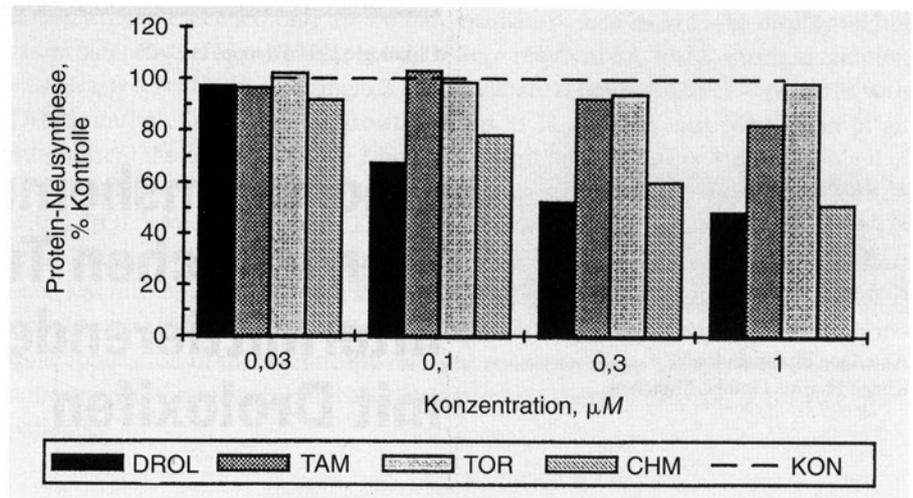
– = Nicht gemessen

#### Einfluß der Antiöstrogene auf die Protein-Neusynthese

Mit dieser Methode sollte untersucht werden, inwiefern die Reduktion des Gesamtproteingehalts mit der Hemmung der Protein-Neusynthese korreliert werden kann. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden dieselben Versuchsbedingungen wie bei der Flow-Cytometrie gewählt. Um, wie auch schon bei der Flow-Cytometrie, Aussagen über die relative Protein-Neusynthese machen zu können, wurde parallel zum  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Einbau als zweiter Parameter der Gesamt-DNS-Gehalt bestimmt. Über eine Verrechnung der erhaltenen dpm/Well mit dem Gesamt-DNS-Gehalt/Well wurde eine Interpretation über die Protein-Neusynthese pro Zelle möglich.

TAM und TOR hemmten die Protein-Neusynthese, wie bereits aufgrund der Versuchsergebnisse am Flow-Cytometer erwartet, weder bei der Zelllinie MDA-MB-231 noch bei der Zelllinie MCF-7 M1 im rezeptorabhängigen Konzentrationsbereich. Cycloheximid zeigte als Referenzsubstanz für einen Hemmstoff der Proteinbiosynthese bei beiden Zelllinien einen dosisabhängigen Hemmeffekt (Abb. 3, 4). Während DROL ebenso wie TAM und TOR auf die Protein-Neusynthese der Zelllinie MDA-MB-231 keinen Effekt ausüben konnte, hemmte es bei der Zelllinie MCF-7 M1 die Protein-Neusynthese genauso effektiv wie Cycloheximid (Abb. 3, 4).

**Abb. 4.** Effekt der Antiöstrogene auf die Protein-Neusynthese der Zelllinie MCF-7 M1. Kontrolle (KON): 606 ± 41 (dpm/μg DNS ± SA). CHM = Cycloheximid.



## Diskussion

Vergleicht man die antiproliferative Wirkung der drei Antiöstrogene DROL, TAM und TOR untereinander, so zeigt sich, daß DROL am effektivsten das Wachstum der Zellen hemmt. Die  $IC_{50}$  bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 M1 lag für DROL nach 10 Tagen kontinuierlicher Substanzbehandlung unter serumfreien Bedingungen unter  $0,03 \mu\text{M}$ , für TAM oder TOR dagegen um mehr als eine Zehnerpotenz höher, bei etwa  $0,3 \mu\text{M}$ . Dieser Unterschied in der Wirksamkeit korreliert mit der unterschiedlichen Affinität dieser Antiöstrogene zum Östrogenrezeptor [6].

Es konnte auch ein direkter Zusammenhang zwischen ER-Gehalt und Sensitivität gegenüber Antiöstrogenen hergestellt werden. Während die Zelllinie MCF-7 M1 mit ihrem hohen Gehalt an ER [7] sehr stark durch Antiöstrogene in ihrem Wachstum beeinflusst werden konnte, wurde die Proliferation der ER-negativ definierten [7] Zelllinie MDA-MB-231 durch therapeutisch relevante Konzentrationen der verschiedenen Antiöstrogene nicht gehemmt. Erst bei Konzentrationen über  $1 \mu\text{M}$  konnte eine Wachstumshemmung erreicht werden, die aber auf rezeptorunabhängige Mechanismen zurückzuführen ist.

Des weiteren wurde untersucht, welchen Einfluß die drei Antiöstrogene im rezeptorabhängigen Konzentrationsbereich von  $0,03$ – $1,0 \mu\text{M}$  nach 3tägiger Substanzinkubation auf den

Gesamtproteingehalt und die Protein-Neusynthese der Zellen ausüben. Als Positivkontrolle wurde Cycloheximid, ein spezifischer Inhibitor der Proteinbiosynthese, verwendet. Nach selektiver Anfärbung der Proteine mit Sulforhodamin-101 und Vermessung am Flow-Cytometer konnte gezeigt werden, daß bei der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231 durch DROL der Gesamtproteingehalt kaum beeinflusst wurde, während er durch Cycloheximid dosisabhängig verringert wurde. Bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 M1 ließ sich zeigen, daß weder TAM noch TOR den Gesamtproteingehalt im rezeptorabhängigen Konzentrationsbereich veränderten, Cycloheximid dagegen bei  $0,3 \mu\text{M}$  eine etwa 20%ige Reduktion erzielte. Mit DROL konnte dieses Ergebnis bereits mit einer Konzentration von  $0,03 \mu\text{M}$  erreicht werden.

Anhand der Ergebnisse des  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Einbaus konnte gezeigt werden, daß die mit der Flow-Cytometrie gemessene Reduktion des Gesamtproteingehalts bei Cycloheximid und DROL unter anderem auf eine Hemmung der Protein-Neusynthese zurückzuführen ist. So ließ sich bei der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231 nur durch Cycloheximid die Protein-Neusynthese konzentrationsabhängig hemmen, während die drei Antiöstrogene bis  $1 \mu\text{M}$  keinen Einfluß ausübten. Bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 M1 konnte analog zu den Cytometriedaten gezeigt werden, daß nur DROL und Cycloheximid die Protein-Neusynthese hemmten, nicht aber TAM oder TOR.

## Literatur

- Litherland S, Jackson IM: Antiestrogens in the management of hormone dependent cancer. *Cancer Treat Rev* 1988;15:183–194.
- Furr JA, Jordan VC: The pharmacology and clinical use of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 1984;25:127–205.
- Kallio S, Kangas L, Blanco G, Johansson R, Karjalainen A, Perilä M, Pippo I, Sundquist H, Toivola R: A new triphenylethylene compound, FC-1157a. I. Hormonal effects. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;17:103–108.
- Kangas L, Nieminen AL, Blanco G, Grönroos M, Kallio S, Karjalainen A, Perilä M, Södervall M, Toivola R: A new triphenylethylene compound, FC-1157a. II. Antitumor effects. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;17:109–113.
- Hasmann M, Löser R, Seibel K, Gast P, Kohr A: Third IST Int Symp Biol Ther Breast Cancer. Genoa, September 25–27, 1989.
- Kawamura I, Mizota T, Mukumoto S, Manda T, Masuda K, Nakamura T, Kubota H, Matsumoto S, Nishigaki F, Shimomura K, Mori J, Masugi T, Shibayama F: Antiestrogenic and antitumor effects of droloxifene in experimental breast carcinoma. *Drug Res* 1989;8:889–893.
- Eppenberger U, Fabbro D, Matter A: Growth regulation of human mammary tumor cells (hmt). *Tumor Diagn Ther* 1987;8:265–268.
- Taylor CM, Blanchard B, Zava DT: A simple method to determine whole cell uptake of radiolabelled oestrogen and progesterone and their subcellular localization in monolayer culture. *J steroid Biochem* 1984;20:1083–1088.