

DNA-gesteuerte bivalente Präsentation von Liganden für den Östrogenrezeptor**

Frank Abendroth, Alexander Bujotzek, Min Shan, Rainer Haag, Marcus Weber und Oliver Seitz*

Die Bildung von DNA-Komplexen erfolgt nach bekannten Gesetzmäßigkeiten, sodass es möglich ist, die wechselseitige Erkennung von DNA-Konjugaten für die präzise Positionierung von Gruppen zu nutzen. So ist es gelungen, Chromophore,^[1] Metalle,^[2] katalytische Einheiten,^[3] Nanopartikel,^[4] Fluorophore^[5] und sogar Proteine^[6] nach DNA-Hybridisierung in definierten Abständen anzutragen. Im Zentrum des Interesses standen bislang vorwiegend materialwissenschaftliche Aspekte sowie die Immobilisierung von Biomolekülen. Wir und andere gingen davon aus, dass die Fähigkeit, Funktionseinheiten in definierten Abständen aufreihen zu können, auch der Beantwortung biologischer Fragen dienen könnte.^[7] So könnte DNA als molekulares Lineal eingesetzt werden, um den Abstand von Bindungstaschen in biologischen Rezeptoren zu bestimmen. Die DNA-Komplexe bilden sich durch Selbstorganisation, sodass die räumliche Rasterung eines Rezeptors rasch und ohne hohen Syntheseaufwand erfolgen kann.^[8] Hierbei wird der Ligand eines biologischen Rezeptors kovalent mit einem Oligonukleotid verknüpft (Abbildung 1a). Die Bindung von zwei oder mehreren Oligonukleotid-Ligand-Konjugaten an einen Templatstrang liefert bi- bzw. multivalente DNA-Ligand-Komplexe. Bei einem solchen Ansatz lassen sich die Abstände zwischen zwei biologisch aktiven Liganden durch Variation des Templatstrangs sehr einfach einstellen. In dieser Studie demonstrieren wir erstmals die räumliche Rasterung eines Proteinrezeptors durch DNA-gesteuerte Präsentation von niedermolekularen Verbindungen. Am Beispiel eines sehr gut untersuchten kernständigen Rezeptors – des Östrogenrezeptors – und anhand eines Vergleichs mit üblicherweise genutzten Oligoethylenglycol-Konjugaten zeigen wir die Vorteile von DNA-Abstandhaltern auf.

Der Östrogenrezeptor (ER) wird durch das Hormon Östradiol aktiviert und reguliert hauptsächlich die Genexpression.^[9] Für die normale Rezeptorfunktion wird ange-

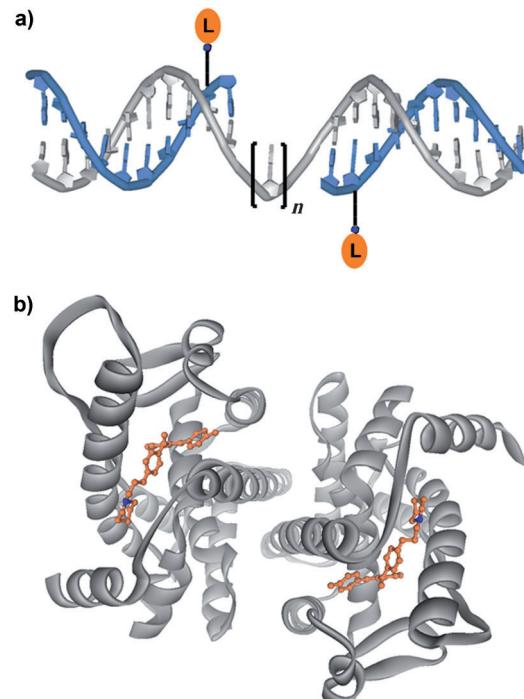


Abbildung 1. a) Bivale Präsentation von Östrogenrezeptorliganden (L) auf ternären DNA-Komplexen. b) Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (PDB-Code: 1ERR) im Komplex mit Raloxifen (orange). Die Stickstoffatome von Raloxifen (blau) werden in 35 Å Abstand angeordnet.

nommen, dass die Bildung des Dimers essenziell ist (Abbildung 1b).^[10] Die Dimerisierungskonstante liegt in einem subnanomolaren Bereich, jedoch kann die Bindung der Liganden das Dimerisierungsgleichgewicht beeinflussen.^[11] Die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM, Selective Estrogen Receptor Modulators) Hexestrol, Raloxifen^[12] und 4-Hydroxytamoxifen^[13] stabilisieren das Rezeptordimer und wurden daher von uns als für die räumliche Rasterung des ER geeignet betrachtet.^[10a]

Zur Synthese von SERM-Oligonukleotid-Konjugaten wurde der Alkin-modifizierte Uridinbaustein **X** im Zuge der automatisierten DNA-Synthese eingeführt (Schema 1). Die SERMs wurden mit Azidfunktionen ausgestattet^[14] und durch Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition mit den Oligonukleotiden **ODN-X** verknüpft.^[15] Die Konjugate **ODN-X^R** wurden in 30–70 % Ausbeute erhalten.

Die Affinität der Oligonukleotid-SERM-Komplexe für den Östrogenrezeptor (ER- α) wurde mithilfe des HitHunter-Assays bestimmt.^[16] Die Konjugation von Hexestrol (Hex) mit einem Oligonukleotid verringerte die Bindungsaffinität

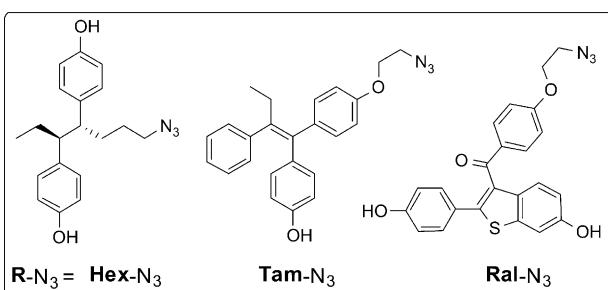
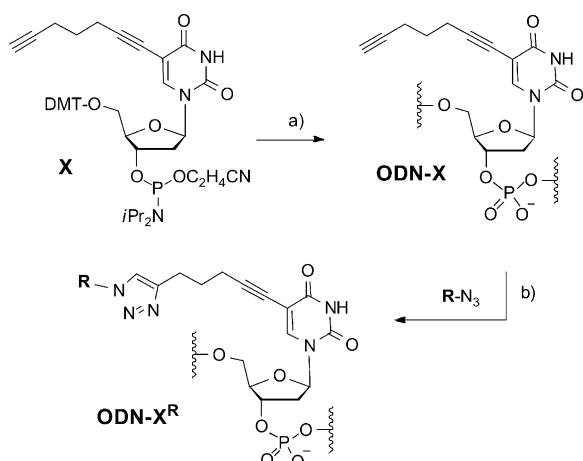
[*] F. Abendroth, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

A. Bujotzek, Dr. M. Weber
Zuse-Institut Berlin, Berlin (Deutschland)

M. Shan, Prof. Dr. R. Haag
Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Unterstützung (SFB 765).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101655> zu finden.



Schema 1. Synthese von Oligonucleotid-SERM-Konjugaten. a) DNA-Synthese (DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl); b) 1,3-dipolare Cycloaddition: Cu₂SO₄, 1–10 Äquiv. Azid, Tris(hydroxymethyl)triazolylmethylamin (THPTA), Natriumascorbat, NaCl, Harnstoff, H₂O/DMSO, 2 h, 80 °C.

um mehrere Größenordnungen (Abbildung 2). Dies ist plausibel, denn die Struktur von ER im Komplex mit Agonisten wie Hexestrol zeigt, dass die Bindungstasche nahezu komplett verschlossen wird (Hintergrundinformationen, Abbildung S33). Im Unterschied dazu zeigten die Östrogenanaloga Raloxifen (Ral) und 4-Hydroxytamoxifen (Tam) auch nach der DNA-Konjugation in **2 Tam** und **2 Ral** eine hohe ER-Affinität. Der ER ist ein Transkriptionsfaktor; es ist daher prinzipiell denkbar, dass die ER-Affinität der Konjugate durch Beiträge des Oligonucleotidgerüsts erhöht wird. Dies würde erklären, warum das Konjugat **2 Ral** mit höherer Affinität an den ER bindet als freies Raloxifen. Die Variation der Nucleinsäuresequenz (in **3 Ral**) führte zu stark verminderten Bindungsaaffinitäten, sodass es unwahrscheinlich ist, dass die hohe ER-Affinität von **2 Tam** und **2 Ral** lediglich auf ionischen Wechselwirkungen mit dem DNA-Rückgrat beruht. Kontrollexperimente zeigten, dass unmodifizierte Oligonucleotide im Rahmen der Grenzen des Bindungstests nicht in der Lage waren, an den ER zu binden (Hintergrundinformationen, Abbildung S32, Tabelle S4).

Zur räumlichen Rasterung der ER-Bindungstaschen wurden zwei 4-Hydroxytamoxifen- oder Raloxifen-ODN-Konjugate an einem Templatstrang arrangiert. In den resultierenden bivalenten, ternären Komplexen **4 R_n** wurde der Abstand zwischen den Liganden durch die Zahl der ungepaarten Templatnukleotide Y_n variiert (Abbildung 2). Schmelzanalysen belegten, dass die Stabilität der ternären Komplexe **4** nur geringfügig durch die Anbindung der ER-

RBA / %			
Hexestrol	300		
4-Hydroxytamoxifen	145 [a]		
Raloxifen	30		
R 5'-TXCTCCATGGTGGCC-3', 2R			
R = Hex	1		
R = Tam	130		
R = Ral	130		
R 5'-ACCAGGGCGCAGAXG-3', 3R			
R = Tam	20		
R = Ral	4		
R 5'-ACCAGGGCGCAGAXG 3'-TGGTCCCGCGTCTAC- Y_n -AAGAGGTACCACCGG-5', 4R_n			
Y_n	<i>n</i> ; Abstand in nt	R = Tam,	Ral
/	0; 3 nt	240	120
C	1; 4 nt	110	9
AC	2; 5 nt	180	< 1
AAC	3; 6 nt	210	80
GAAC	4; 7 nt	300	7
TGAAAC	6; 9 nt	120	40
GATGGAAC	8; 11 nt	200	20
TGGATGGAAC	10; 13 nt	110	50
R 5'-ACCAGGGCGCAGAXG 3'-TGGTCCCGCGTCTAC- Y_n -AAGAGGTACCACCGG-5', 5R_n			
Y_n	<i>n</i>	R = Tam	
/	0	50	
CAAG	4	40	
Ral · N=N- $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}-\text{N=N} · Ral$	<i>n</i>		
	1	70	
	7	10	
	10	5	
	13	5	
Ral_{2n}			
Ral · N=N- $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{O}-$	<i>m</i>		
	3	10	
	5	3	
Ral_m			

Abbildung 2. Relative Bindungsaaffinität (RBA, bezogen auf Östradiol). [a] Errechnet für das 1:1-Gemisch der *cis/trans*-Isomere. nt = Nucleotid (Bedeutungen: siehe Hintergrundinformationen, Tabelle S4).

Liganden beeinflusst wird (Hintergrundinformationen, Abbildungen S18–S20). Bei den ER-Bindungsexperimenten war die Höhe der gemessenen relativen Bindungsaaffinitäten von bis zu 300 % RBA auffällig. Dies ist bemerkenswert, da bei früheren Untersuchungen von flexibel verbrückten SERM-Dimeren niedrigere relative Bindungsaaffinitäten von < 7 % gemessen wurden.^[17]

Zur Kontrolle wurden die bivalenten Komplexe **4R_n** mit monovalenten Komplexen **5R_n** der gleichen Architektur verglichen. Dieser Vergleich offenbarte die Vorteile bivalenter Präsentation: Die bivalenten Komplexe **4 Tam₀** und **4 Tam₄** banden mit 5–7-fach höherer Affinität an den ER als die monovalenten Komplexe **5 Tam₀** und **5 Tam₄**. Die höchste Affinität wurde für Komplexe bestimmt, in denen die 4-Hydroxytamoxifeneinheiten in einem Abstand von 3 (**4 Tam₀**) oder 7 Nucleotiden (**4 Tam₄**) angeordnet wurden. Auch bei den Raloxifen-Konjugaten übertrafen die Affinitäten der bivalenten Konstrukte die ER-Affinität des freien Liganden,

und die Abstandsabhängigkeit der relativen Bindungsaktivität zeigte sich noch deutlicher. Wiederum wurden zwei Maxima der Bindungsaktivität bei einem Abstand von 3 (**4Ral**₀) und 6 Nucleotiden (**4Ral**₃) beobachtet.

Dass sowohl die 4-Hydroxytamoxifen- als auch die Raloxifen-DNA-Konjugate dann höchste Bindungsaffinitäten erzielten, wenn 3 oder 6 (bzw. 7) Abstandsnucleotide einbezogen werden, belegt die Signifikanz des Effekts. Eine Abschätzung der Abstände erhält man unter der Annahme, dass die Komplexe die Struktur der B-DNA (20 Å Helixdurchmesser, 3.4 Å Hub pro Basenpaar, 10.2 Nucleotide pro Windung) einnehmen. Diese Näherung ist vertretbar, da gezeigt wurde, dass vollständig basengepaarte ternäre Komplexe wie **4Ral**₀ oder **4Tam**₀ die Strukturmerkmale einer B-DNA beibehalten.^[18] In begleitenden FRET-Untersuchungen (FRET=resonanter Fluoreszenzenergietransfer) stellten wir fest, dass die Längendimensionen eines ternären Komplexes, in denen die doppelhelikalen Segmente durch drei ungepaarte Templatnucleotide getrennt werden, mit denen eines kanonischen B-Duplex übereinstimmen.^[8b]

Aus diesen Abschätzungen folgt, dass die Triazoleinheiten unter Berücksichtigung des Linkers und der helikalen Torsion bei einem Abstand von drei Nucleotiden in weniger als 23 Å Entfernung positioniert werden sollten. Ein 6–7 Nucleotide langer Abstandshalter arrangiert die Triazoleinheiten in 38–40 Å Distanz, wobei die Flexibilität der Ligandenpräsentation durch die ungepaarten Nucleotiden erhöht ist. Dieser Abstand ist in hinreichender Übereinstimmung mit dem 35-Å-Abstand, mit dem die Stickstoffatome des Raloxifens im Kokristall mit dem ER- α -Dimer angeordnet werden.^[19]

Abbildung 3 a illustriert die Passfähigkeit dieser DNA-Komplexe für die Proteinbindungstaschen, die anhand einer Docking-Studie ermittelt wurde. Darüber hinaus verdeutlichten Moleküldynamik(MD)-Rechnungen den semi-rigiden Charakter ternärer DNA-Komplexe. So bleiben die Längendimensionen einer DNA-Helix auch bei Einbeziehung ungepaarter Nucleotide erhalten (Hintergrundinformationen, Abbildung S45). Während die doppelsträngigen Segmente von stabförmiger Natur sind, vermitteln die Bereiche mit ungepaarten Nucleotiden eine lokale Flexibilität gegenüber Torsion und Biegen (Hintergrundinformationen, Abbildung S46), sodass die Varianz der Abstände und der Torsionswinkel zwischen zwei modifizierten Nucleotiden bei einem ternären Komplex mit ungepaarten Nucleotiden größer ist als bei einem DNA-Duplex. Nicht vorstellbar ist, dass der Komplex **4Ral**₀ die Liganden in die Konsensusbindungstaschen des ER-Dimers einpassen kann.

Kürzlich wurde entdeckt, dass das ER- β -Dimer nicht nur zwei, sondern vier 4-Hydroxytamoxifenmoleküle binden kann.^[20] Die zweite Bindungsstelle befindet sich in unmittelbarer Nähe der Konsensusligandenbindungstasche. In den gebundenen 4-Hydroxytamoxifenderivaten wurden die Stickstoffatome in 17 Å Abstand positioniert. Von ER- α ist bekannt, dass hydrophobe Peptide an eine benachbarte, hydrophobe Koaktivatorbindungsstelle binden.^[21] Es ist denkbar, dass diese Bindungsstelle von einem der beiden SERMs

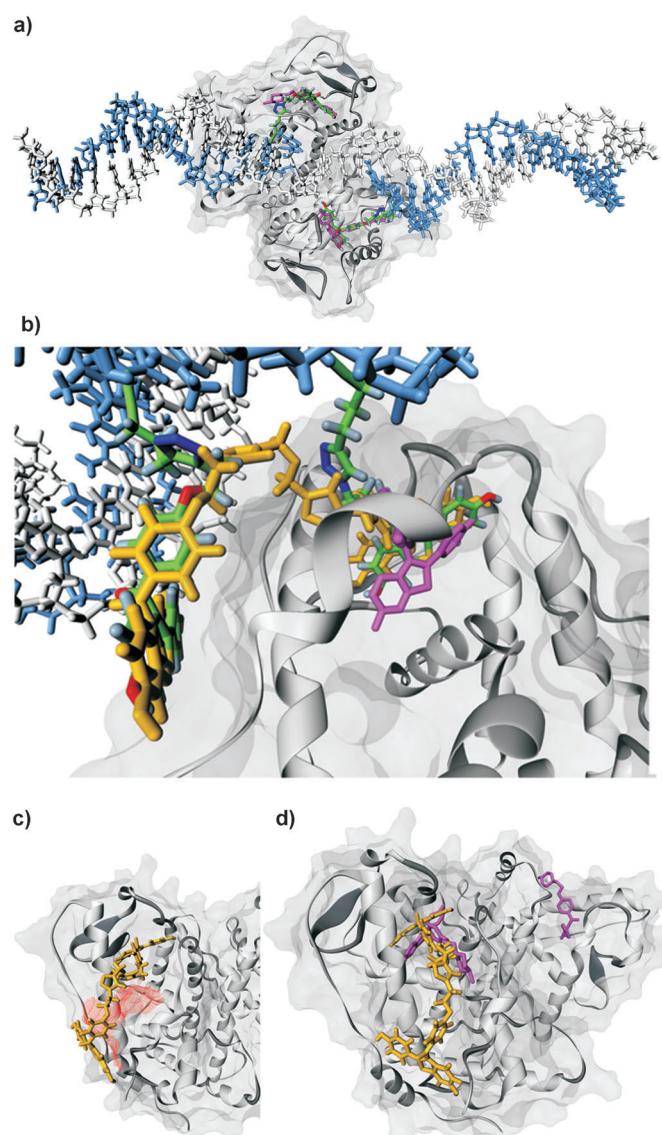


Abbildung 3. Docking des ternären DNA-Komplexes a) **4Ral**₃ und b) **4Ral**₀ (grün, konjugiertes Raloxifen mit Spacer) sowie des etherverbrückten Raloxifen-Konjugats **Ral2**₀ (gelb) an die Ligandenbindungsdomäne von ER- α (grau) und Darstellung von unkonjugiertem Raloxifen (magenta) im Kokristall (PDB-Code: 2R6W); c) Darstellung der hydrophoben Kontaktregion (rot) und von **Ral2**₁ (gelb); d) Docking des Konjugats **Ral2**₁ (gelb) an ER- α .

in Komplexen wie **4Tam**₀ oder **4Ral**₀ genutzt wird. Wir untersuchten diese Annahme durch eine Docking-Studie. Bei dieser wurde ein Ligand der DNA-Konjugate in die Konsensusbindungstasche von ER- α eingepasst, und für den zweiten Liganden wurden verschiedene Bindungszustände modelliert. Die Stabilität dieser Bindungszustände wurde in MD-Simulationen erprobt. Die bei der Interaktion zwischen Konjugat und Protein freigesetzte Energie wurde für verschiedene potenzielle Bindungsstellen^[22] charakterisiert (Abbildung 3 b; Hintergrundinformationen, Abbildung S34–S40). Demnach kann eine zweite Raloxifengruppe an einen

von Helix 3 und Helix 4 definierten hydrophoben Bereich binden (Abbildung 3c).

Die Ergebnisse der Bindungsexperimente und der Docking-Studie lassen darauf schließen, dass kleine hydrophobe Moleküle wie Raloxifen oder 4-Hydroxytamoxifen nicht nur an die Konsensusbindungstasche, sondern auch an eine zweite, hydrophobe Stelle des ER- α binden können. Um diese These zu untermauern, untersuchten wir die Bindungsaffinitäten von Ligandendimeren **Ral2_n**, in denen die Raloxifeneinheiten ähnlich zu früheren Studien durch flexible Oligoethylenglycolstrukturen verbrückt wurden (Abbildung 2).^[17] Bemerkenswerterweise zeigte das Konjugat **Ral2₁** mit der kürzesten Verbrückung die höchste Affinität für den ER. Im Vergleich mit dem monovalenten Raloxifen-Oligoethylenglycol-Konjugaten **Ral₃** wurde eine 7-fach höhere RBA gemessen. Auch hier illustrierte eine Docking-Studie die Möglichkeit einer gleichzeitigen Bindung der Raloxifeneinheiten an die Konsensusbindungstasche und die benachbarte hydrophobe Stelle (Abbildung 3b,d).

Zusätzliche Experimente an Verbindungen, in denen eine Raloxifeneinheit mit einer hydrophoben Gruppe wie Pyren konjugiert wurde, ließen darauf schließen, dass die hydrophobe Stelle auch von „Nicht-SERMs“ besetzt werden kann (Hintergrundinformationen, Tabelle S4; Ral-Pyr). Hingegen banden Konjugate die **Ral2₇**, **Ral2₁₀** und **Ral2₁₃**, in denen die Raloxifeneinheiten durch längere Abstandhalter flexibel verbunden wurden, mit einer Affinität, die nur wenig höher war als jene der monovalenten Konjugate **Ral₃** und **Ral₅**. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit früheren Studien zu flexibel verbrückten SERM-Konjugaten.^[17b,d] Zur Kontrolle führten wir Experimente an Raloxifendimeren durch, in denen einzelsträngige bivalente Oligonucleotide als flexible Linker fungierten. Eine frühere Arbeit zeigte, dass bei der Bindung von bivalent modifizierten DNA-Einzelsträngen an bivalente Rezeptoren im Prinzip mit höheren Bindungsaffinitäten gerechnet werden kann, als dies für monovalente Oligonucleotidkonjugate zu erwarten wäre.^[8b,23] Jedoch beobachteten wir, dass die bivalenten Einzelstränge mit niedrigerer Affinität an den ER banden als die monovalenten (Hintergrundinformationen, Tabelle S4). Auch dies stimmt mit den Resultaten anderer Studien mit flexibel verbrückten Ligandendimeren überein.

Über die Ursache für die niedrige Bindungsaffinität kann beim gegenwärtigen Stand nur spekuliert werden. Es ist denkbar, dass flexible Linker den SERM-Einheiten die Möglichkeit eröffnen, in intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen zu treten, wie dies in einer Modeling-Studie berichtet wurde.^[24] Bei der Bindung des ER an solche Konjugate müsste dann eine Energiestrafe für die Aufhebung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den SERMs entrichtet werden. Aus früheren Arbeiten zur Kontaktlösung in fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden ist bekannt, dass zwei konjugierte Gruppen in einem Einzelstrang in Stoßkontakt treten können.^[25] Hingegen ist eine solche Interaktion erschwert, wenn die konjugierten Gruppen durch die doppelhelikalen Segmente in rigider Umgebung eingebettet werden. Bereits mehrfach wurde der α -Östrogenrezeptor mithilfe steroidaler und nichtsteroidaler Ligandendimere untersucht.^[17] Die über Oligomethylen-, Oligoethylen-

glycol- oder Oligopropylenglycolketten flexibel verbrückten Binder zeigten relative Bindungsaffinitäten RBA < 7%. Bislang erschien es schwierig, bivalente Liganden zu konstruieren, die mit höherer Affinität an den ER binden als monovalente Liganden. Unsere Daten belegen, dass es möglich ist, hochaffine bivalente Binder zu konstruieren. Im Unterschied zu früheren Arbeiten werden die ER-Liganden in den ternären DNA-Komplexen **4R_n** über ein semi-rigides Gerüst präsentiert. In diesem sind die ER-Liganden an zwei rigid DNA-Duplexsegmenten befestigt und über eine kurze, flexible Scharnierregion verbunden. Die DNA-programmierte räumliche Rasterung ergab, dass ER- α zwei Anordnungen bevorzugt. Bestätigt wird diese Methode durch die Tatsache, dass eine dieser Anordnungen (**4R₃**) die Liganden in einem Abstand positioniert, der a) in der Kristallstruktur des ER- α -Raloxifen-Komplexes wiedergefunden werden kann^[18] und b) von Katzenellenbogen et al. bei Untersuchungen von flexibel verbrückten Östradioldimeren ebenfalls identifiziert wurde.^[17b]

Darüber hinaus weisen die Experimente auf ein weiteres Optimum bei kleinen Abständen hin. Wir betrachten es als möglich, dass dies auf eine zweite hydrophobe Bindungsstelle in der Nähe der Konsensusligandenbindungstasche von ER- α hinweist. Diese Annahme wird gestützt durch Docking-Studien und Bindungsexperimente, in denen Raloxifen über kurze Linker mit einem zweiten Raloxifen oder einer hydrophoben Gruppe wie Pyren verbrückt wurde.

Die DNA-gesteuerte Ligandenpräsentation sollte die räumliche Rasterung von Rezeptoren erleichtern, da bei dieser Methode anstelle einer Vielzahl unterschiedlicher kovalent verknüpfter Dimere lediglich zwei ODN-Ligand-Konjugate hergestellt werden müssen. Bei strukturell nicht charakterisierten Zielproteinen könnte dies die Findung von hochaffinen Bindern für biologische und medizinische Anwendungen beschleunigen.

Eingegangen am 7. März 2011,
veränderte Fassung am 2. Mai 2011
Online veröffentlicht am 26. Juli 2011

Stichwörter: Klick-Chemie · Multivalenz · Rezeptoren · Steroidhormone · Wirkstoff-Forschung

- [1] a) T. J. Bandy, A. Brewer, J. R. Burns, G. Marth, T. Nguyen, E. Stulz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 138–148; b) R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2009**, 2615–2624.
- [2] a) E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778; b) K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 190–195.
- [3] S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2010** *122*, 7336–7359; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180–7201.
- [4] a) A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611; b) F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, *321*, 1795–1799.
- [5] a) F. Stühmeier, A. Hillisch, R. M. Clegg, S. Diekman, *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 1081–1100; b) A. Hillisch, M. Lorenz, S. Diekman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 201–207.

- [6] a) C. M. Niemeyer, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 395–401; b) U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856–1876.
- [7] Übersichten: a) F. Diezmann, O. Seitz, *Chem. Soc. Rev.* DOI: 10.1039/C1CS15054E; b) L. Rögl, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3881–3887; c) Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1330–1336.
- [8] Untersuchung a) eines Lectins mit Peptidnucleinsäure(PNA)-Zucker-Konjugaten: C. Scheibe, A. Bujotzek, J. Dernedde, M. Weber, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 770–775; b) einer Tandem-SH2-Domäne mit DNA-Peptid-Konjugaten: H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4232–4236; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4146–4150; c) eines Antikörpers mit PNA-Oligomannose-Konjugaten: K. Gorska, K.-T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7831–7836; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7695–7700; d) eines regulatorischen Hefeproteins mit DNA-Peptid-Konjugaten: B. A. R. Williams, C. W. Diehnelt, P. Belcher, M. Greving, N. W. Woodbury, S. A. Johnston, J. C. Chaput, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17233–17241; e) eines dimeren Todesrezeptors mit PNA-Peptidmacrocyclus-Konjugaten: K. Gorska, J. Beyrath, S. Fournel, G. Guichard, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7742–7744.
- [9] a) H. Gronemeyer, J. A. Gustafsson, V. Laudet, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 950–964; b) K. Dahlman-Wright, V. Cavailles, S. A. Fuqua, V. C. Jordan, J. A. Katzenellenbogen, K. S. Korach, A. Maggi, M. Muramatsu, M. G. Parker, J. A. Gustafsson, *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 773–781.
- [10] a) S. E. Fawell, J. A. Lees, R. White, M. G. Parker, *Cell* **1990**, *60*, 953–962; b) V. Kumar, P. Chambon, *Cell* **1988**, *55*, 145–156.
- [11] a) A. Tamrazi, K. E. Carlson, J. R. Daniels, K. M. Hurth, J. A. Katzenellenbogen, *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 2706–2719; b) M. Salomonsson, J. Haggblad, B. W. O'Malley, G. M. Sitbon, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *48*, 447–452.
- [12] C. D. Jones, M. G. Jevnikar, A. J. Pike, M. K. Peters, L. J. Black, A. R. Thompson, J. F. Falcone, J. A. Clemens, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1057–1066.
- [13] a) D. W. Robertson, J. A. Katzenellenbogen, D. J. Long, E. A. Rorke, B. S. Katzenellenbogen, *J. Steroid Biochem.* **1982**, *16*, 1–13.
- [14] Die Synthese der Hexestrol-, 4-HO-Tamoxifen- und Raloxifenazide wird an anderer Stelle beschrieben.
- [15] a) P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478–8487; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358; b) D. M. Hammond, A. Manetto, J. Gierlich, V. A. Azov, P. M. E. Gramlich, G. A. Burley, M. Maul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4262–4265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4184–4187; c) F. Seela, V. R. Sirivolu, P. Chittipu, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 211–224; d) A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2415–2420; e) T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [16] <http://www.discoverx.com>.
- [17] a) A. E. Wendlandt, S. M. Yelton, D. Y. Lou, D. S. Watt, D. J. Noonan, *Steroids* **2010**, *75*, 825–833; b) A. L. LaFrake, K. E. Carlson, J. A. Katzenellenbogen, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3528–3535; c) D. Rabouin, V. Perron, B. N'Zemba, C. G. R. G. Berube, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 557–560; d) K. E. Bergmann, C. H. Wooge, K. E. Carlson, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *49*, 139–152.
- [18] a) E. Protozanova, P. Yakovchuk, M. D. F. Kamenetskii, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 775–778.
- [19] a) A. M. Brzozowski, A. C. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G. L. Greene, J. A. Gustafsson, M. Carlquist, *Nature* **1997**, *389*, 753–758.
- [20] a) Y. Wang, N. Y. Chirgadze, S. L. Briggs, S. Khan, E. V. Jensen, T. P. Burris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9908–9911; b) D. J. Kojetin, T. P. Burris, E. V. Jensen, S. A. Khan, *Endocrinol. Relat. Cancer* **2008**, *15*, 851–870.
- [21] C. Chang, J. D. Norris, H. Gron, L. A. Paige, P. T. Hamilton, D. J. Kenan, D. Fowlkes, D. P. McDonnell, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 8226–8239.
- [22] a) S. Y. Dai, M. J. Chalmers, J. Bruning, K. S. Bramlett, H. E. Osborne, C. Montrose-Rafizadeh, R. J. Barr, Y. Wang, M. Wang, T. P. Burris, J. A. Dodge, P. R. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7171–7176.
- [23] L. Tian, T. Heyduk, *Biochemistry* **2009**, *48*, 264–275.
- [24] A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 253–262.
- [25] a) X. Wang, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 808–813.