

# Detektion ligandeninduzierter Konformationsänderungen im Östrogenrezeptor\*\*

Svenja C. Mayer-Wrangowski und Daniel Rauh\*

**Abstract:** Kernrezeptoren spielen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine entscheidende Rolle und stellen wichtige Zielstrukturen in der modernen Wirkstoff-Forschung dar. Die Aktivität von Kernrezeptoren lässt sich durch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone und Wirkstoffe regulieren, die entweder als Agonisten oder als Antagonisten an den Rezeptor binden. Die Bindung dieser Liganden führt zu Konformationsänderungen des Rezeptors, die von entscheidender Bedeutung für dessen Aktivität sind. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Detektion von Konformationsänderungen des Östrogenrezeptors. Dieses FLiN-Assay-Verfahren („Fluorescent Labels in Nuclear Receptors“) basiert auf der Einführung eines Cysteins und anschließender Markierung des Rezeptors mit einem Thiol-reaktiven Fluorophor. Konformationsänderungen des Rezeptors führen zu Verschiebungen im Emissionsspektrum des Fluorophors. Neben der Differenzierung von Agonisten und Antagonisten ist FLiN für das Hochdurchsatz-Screening geeignet.

Der Östrogenrezeptor (ER) gehört zur Proteininfamilie der Kernrezeptoren („nuclear receptors“, NRs), die aus 48 Mitgliedern besteht. Diese ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen Funktionen, wie der Kontrolle der Zelldifferenzierung, der Homöostase, der Physiologie der Organe und der Embryonalentwicklung.<sup>[1]</sup> Darüber hinaus sind sie an pathologischen Prozessen, wie Diabetes, Krebs, Asthma, rheumatoide Arthritis oder Hormonresistenz, beteiligt.<sup>[2]</sup> Dies macht die NRs zu wichtigen pharmazeutischen Angriffspunkten und führte bereits zur Entwicklung einer Vielzahl niedermolekularer Verbindungen für die Behandlung diverser Erkrankungen. Der ER hat einen, für NRs charakteristischen, modularen Aufbau, bestehend aus einer N-terminalen Aktivierungsfunktion, einer zentralen DNA-bindenden Domäne und einer Scharnierregion, welche die Verbindung zur C-terminalen

ligandenbindenden Domäne (LBD) herstellt.<sup>[3]</sup> Letztere vermittelt die Bindung der Liganden, die Dimerisierung des Rezeptors und die Translokation in den Zellkern. Lipophile niedermolekulare Verbindungen können an die LBD binden und definierte Konformationsänderungen innerhalb der C-terminalen Helix 12 hervorrufen. Diese modulieren die Transkriptionsaktivität der Rezeptoren an deren Zielgenen.<sup>[4]</sup> Die Liganden spielen eine entscheidende Rolle für die Aktivität der Rezeptoren. Abhängig von der Konformation der Helix 12 werden verschiedene Koregulatorproteine rekrutiert, wodurch die Liganden als reine Agonisten, wie das natürliche Hormon 17 $\beta$ -Östradiol (E2), oder als selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs), wie Tamoxifen und Raloxifen, wirken können. Diese Wirkstoffe üben einen gebeabhangigen agonistischen oder antagonistischen Effekt aus.<sup>[5]</sup> Die Entschlüsselung der Zusammenhänge zwischen der Struktur eines Liganden und Konformationsänderungen des Rezeptors ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis mechanistischer Details und pharmakologischer Profile der Liganden. In Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie,<sup>[6]</sup> Koregulator-Wechselwirkungsassays<sup>[7]</sup> und Röntgenstrukturanalyse<sup>[8]</sup> konnte gezeigt werden, dass verschiedene Rezeptor-Ligand-Komplexe einzigartige Konformationen, mit unterschiedlicher Affinität gegenüber den einzelnen Koaktivator- und Korepressorproteinen, einnehmen und damit die Expression bestimmter Gruppen von Genen kontrollieren. Trotz Jahrzehntelanger Forschung auf dem Gebiet der NRs ist die Entdeckung neuer Liganden noch immer von großer Bedeutung für die biomedizinische Forschung und die Entwicklung neuer Wirkstoffe.<sup>[9]</sup> Als besonders vielversprechend gilt dabei die Entwicklung selektiver Liganden, die neben einem verbesserten therapeutischen Profil reduzierte Nebenwirkungen aufweisen. In diesem Zusammenhang sind Hochdurchsatzverfahren, die in der Lage sind, Konformationsänderungen der LBD zu detektieren und eine schnelle sowie kostengünstige Identifizierung neuer Liganden ermöglichen, für die moderne Wirkstoff-Forschung von großem Interesse.

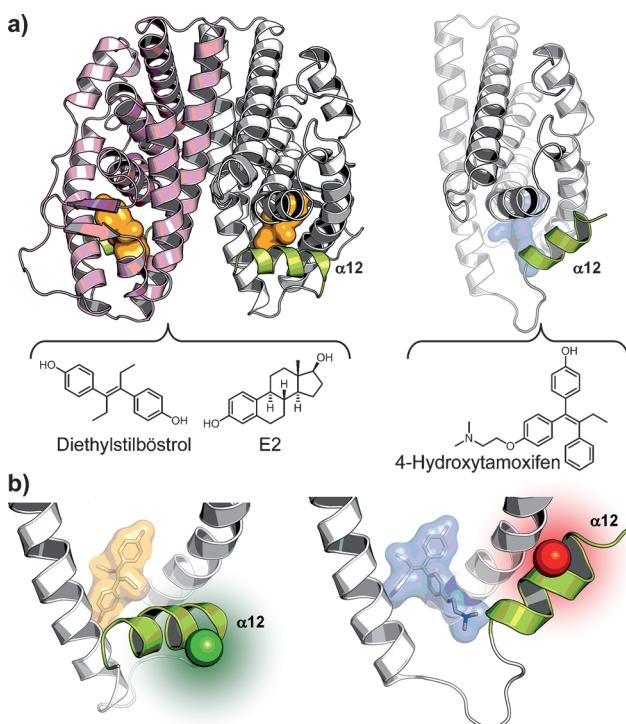
Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines fluoreszenzbasierten direkten Bindungsassays zur Identifizierung von Agonisten und Antagonisten des humanen ER $\beta$ , einer der beiden, auf verschiedenen Genen kodierten ER Isoformen. Obwohl ER $\alpha$  bisher das wichtigere therapeutische Zielmolekül darstellt, gewinnt ER $\beta$  zunehmend an Bedeutung bei der Entwicklung innovativer Wirkstoffe. Vor allem subtypselektive ER $\beta$ -Agonisten haben das Potenzial für die Entwicklung neuer Therapieansätze mit geringeren Nebenwirkungen.<sup>[10]</sup>

Das Assay-System basiert auf der Detektion von Konformationsänderungen in Helix 12, die bei der Bindung von

[\*] S. C. Mayer-Wrangowski, Prof. Dr. D. Rauh  
Technische Universität Dortmund  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
E-Mail: daniel.rauh@tu-dortmund.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) innerhalb des e:Med-Forschungs- und Förderkonzepts (grant no. 01ZX1303C). Wir bedanken uns bei Dr. Katrin Weise für die Hilfe bei den CD-Spektroskopie-Messungen, sowie bei Simone Eppmann und Andreas Arndt für die Unterstützung bei der Expression und Aufreinigung der Proteine. Wir danken Prof. Dr. Claus Czeslik und Dr. André Richters für hilfreiche Diskussionen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410148> zu finden.



**Abbildung 1.** Das Prinzip des FLiN-Assays zur Detektion von ER-LBD-Liganden. a) Die Bindung von Liganden (orange und blau) an die LBD des ER induziert verschiedene Konformationen der Helix 12 (grün hervorgehoben) (PDB-Einträge: 1ERD und 1ERT). Da keine Kokristallstrukturen von ER $\beta$  mit diesen Liganden bekannt sind, stammen die gezeigten Strukturen von ER $\alpha$ . Die LBDs beider Rezeptoren sind strukturell eng verwandt, und die Bindung von Agonisten und Antagonisten an ER $\beta$  stabilisiert vergleichbare Konformationen.<sup>[11]</sup> b) Mittels gezielter Mutagenese wurde ein Cystein in Helix 12 eingebracht und mit dem umgebungsempfindlichen Fluorophor Acrylodan markiert (grüne und rote Kugel). Konformationsänderungen der Helix 12 bei der Bindung von ER-Agonisten und -Antagonisten führen zu Veränderungen der Mikroumgebung des Fluorophors und beeinflussen dadurch dessen Emissionsspektrum.

Liganden an die LBD auftreten (Abbildung 1). Die räumliche Orientierung der Helix 12 ist ein entscheidender Faktor für den agonistischen oder antagonistischen Effekt eines Liganden. Im transkriptionsaktiven Zustand mit gebundenem Agonisten ist diese Helix 12 um etwa 90° angewinkelt, wodurch eine Bindungsstelle für Koaktivatorproteine gebildet wird. Im inaktiven Zustand mit einem gebundenen Antagonisten besetzt die gestreckte Helix 12 diese Bindungsstelle und verhindert so die Rekrutierung von Koaktivatorproteinen. Dieses, aus röntgenkristallographischen Studien gewonnene, statische Bild erklärt jedoch nur unzureichend die komplexen Vorgänge bei der Ligandenbindung.

Der hier entwickelte Bindungsassay mit Fluoreszenzmarkierungen an Kernrezeptoren („Fluorescent Labels in Nuclear Receptors“, FLiN) beruht auf Änderungen des Emissionsspektrums eines umgebungsempfindlichen Fluorophors, der die Konformationsänderungen im Rezeptor detektiert. Diese Assay-Technologie wurde anfangs für das Hochdurchsatz-Screening nach Typ-II- und Typ-III-Kinaseinhibitoren etabliert<sup>[12]</sup> und konnte seither erfolgreich weiterentwickelt und auf andere Proteine übertragen werden.<sup>[13]</sup>

Der FLiN-Assay unterscheidet verschiedene ligandeninduzierte Konformationen der Helix 12 und ist für die Detektion neuer Agonisten und Antagonisten des humanen ER $\beta$  im Hochdurchsatz-Format geeignet.

Zur ortsspezifischen Markierung der LDB des ER $\beta$  mit einem Fluorophor, wurde mittels gezielter Mutagenese ein Cystein innerhalb der flexiblen Helix 12 eingeführt. Ausgehend von Kristallstrukturen der humanen ER $\beta$ -LBD wurden dazu vier potenzielle Markierungspositionen gewählt (C478, D486C, L489C, N493C), die am Anfang oder innerhalb der Helix 12 lokalisiert sind (siehe Abbildung S1 für Details zum Konstrukt-Design). Die Kristallstrukturen lassen vermuten, dass ein Fluorophor an diesen Positionen bei der Bindung von Liganden, die eine gestreckte oder angewinkelte Helix 12 stabilisieren, eine Veränderung in seiner Mikroumgebung erfährt, ohne dabei die Ligandenbindung selbst zu beeinflussen.

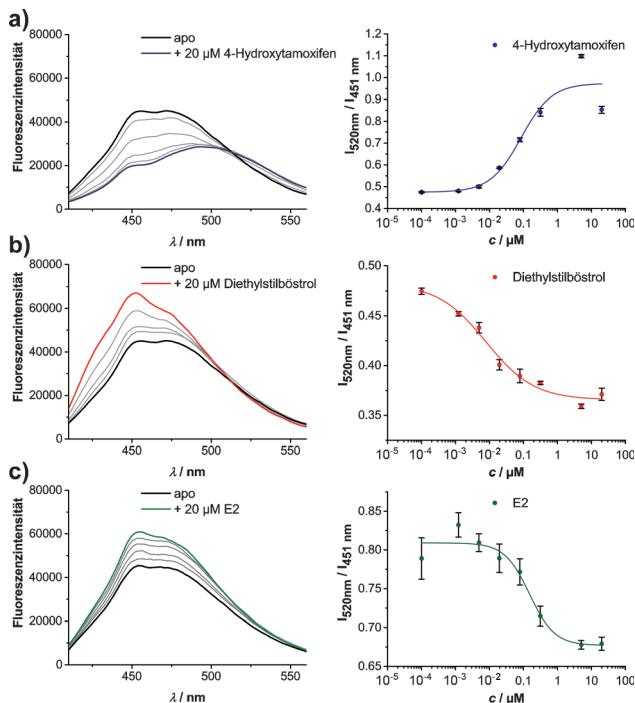
Um die einfache Markierung der FLiN-Konstrukte zu gewährleisten, wurden zwei oberflächenexponierte Cysteine aus der ER $\beta$ -LBD, ausgehend von einem Sequenz-Alignment verwandter LBD-Sequenzen aus einer BLAST<sup>[14]</sup>-Analyse, gegen ein Serin und Leucin getauscht (C366S und C478L).

Alle vier FLiN-Konstrukte wurden mit dem umgebungsempfindlichen Fluorophor Acrylodan markiert und getestet. Das Konstrukt mit der Fluorophormarkierung an L498C lieferte die stabilsten Signale (Z'-Bestimmungen für alle Konstrukte in Tabelle S1) und wurde für die Etablierung des Assays verwendet. Die erfolgreiche Markierung des ER $\beta$ -LBD(L498C)-FLiN-Konstrukt mit Acrylodan wurde mittels ESI-MS bestätigt (Abbildung S2).

Mittels CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die eingeführten Mutationen die Struktur und Stabilität des Proteins nicht negativ beeinflussen. Dazu wurden Spektren des FLiN-Konstrukt (L498C) und der Wildtyp-ER $\beta$ -LBD über einen großen Temperaturbereich aufgenommen. Die Spektren beider Proteine weisen einen hohen Anteil an alpha-helikalen Strukturen auf und sind mit anderen CD-Spektren der ER $\beta$ -LBD vergleichbar (Abbildung S3).<sup>[15]</sup>

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Mutationen im FLiN-Konstrukt (nicht markiert) auf die Aktivität des ER mit einem Fluoreszenzpolarisations-Assay überprüft (Abbildung S4). Dafür wurden die ER-Agonisten E2 und Diethylstilbostrol sowie die SERMs Raloxifen, Tamoxifen und 4-Hydroxytamoxifen als Testverbindungen ausgewählt. Sowohl der Wildtyp als auch die L498C-FLiN-Mutante der ER $\beta$ -LBD zeigten für alle Testverbindungen IC<sub>50</sub>-Werte im nanomolaren Bereich. Dies weist darauf hin, dass die eingeführten Mutationen keinen störenden Effekt auf die Bindung bekannter Liganden ausüben. Die für die LBDs ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen leicht über den mit demselben Assay-System ermittelten Werten für Vollängen-Wildtyp-ER $\beta$ . Die Werte des Vollängen-Rezeptors lagen im Bereich bisher publizierter relativer Bindungsaaffinitäten für ER $\beta$  (18 ± 2 nm für E2, 15 ± 0 nm für Diethylstilbostrol oder 73 ± 23 nm für Raloxifen, im Vergleich zu 1 nm–5.6 nm für E2,<sup>[16]</sup> 1.07 nm–4 nm für Diethylstilbostrol<sup>[16b,c,17]</sup> und 12 nm–557 nm für Raloxifen).<sup>[16c,18]</sup>

Anschließend wurde das Verhalten des markierten ER $\beta$ -FLiN-Konstrukt im FLiN-Assay-System in 384er-Mikroti-



**Abbildung 2.** FLiN-Assay im 384er-Mikrotiterplatten-Format. Das Acrylodan-Spektrum ändert sich mit steigenden Konzentrationen an a) 4-Hydroxytamoxifen, b) Diethylstilbostrol und c) E2. (Alle Spektren wurden geglättet, die entsprechenden Rohdaten sind in Abbildung S5 zu finden.) Durch Auftragung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten  $I_{520 \text{ nm}}/I_{451 \text{ nm}}$  gegen die logarithmische Ligandenkonzentration lässt sich der  $K_d$ -Wert bestimmen.

terplatten durch Messung der Emissionsspektren von Acrylodan ( $\lambda_{\text{ex}}: 386 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}: 410 \text{ nm}–560 \text{ nm}$ ) mit zunehmender Konzentration der Testverbindungen untersucht (Abbildung 2). Im ligandenfreien Zustand (apo) zeigten sich im Fluoreszenzspektrum ein Maximum bei 451 nm und ein weiteres lokales Maximum bei 478 nm. Die Zugabe des SERM 4-Hydroxytamoxifen führte zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsspektrums mit einer Intensitätsabnahme bei 451 nm und einer Verschiebung des sekundären Maximums von 478 nm zu 500 nm. Die Zugabe des Agonisten Diethylstilbostrol führte hingegen zu einer hypsochromen Verschiebung mit einem Anstieg der Intensität bei 478 nm. Für E2 konnte der gleiche, aber weniger stark ausgeprägte Trend nur unter Verwendung eines anderen Puffersystems ohne Zugabe von DTT beobachtet werden (siehe die Hintergrundinformationen). Die anderen Testverbindungen wurden von einem Wechsel des Puffersystems nicht beeinflusst.

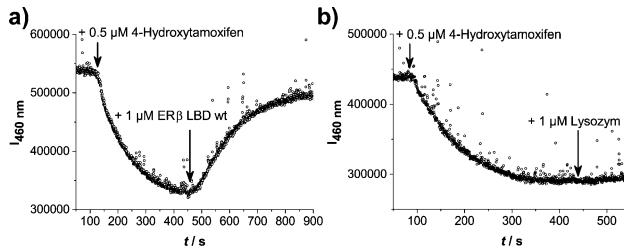
Dies lässt darauf schließen, dass der Fluorophor bei der Bindung verschiedener Liganden, in Abhängigkeit der Orientierung von Helix 12, unterschiedliche Veränderungen in seiner Mikroumgebung erfährt. Dabei entspricht eine bathochrome Verschiebung generell einer stärker lösungsmittellexponierten Umgebung.<sup>[19]</sup> Aus den Änderungen im Fluoreszenzspektrum können die Bindungsaffinitäten der Liganden bestimmt werden. Dazu wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $r = I_{520 \text{ nm}}/I_{451 \text{ nm}}$  des Acrylodan-Spektrums gegen die logarithmische Ligandenkonzentration aufgetragen.

Der Wendepunkt der resultierenden sigmoidalen Kurve entspricht dem  $K_d$ -Wert. Die verschiedenen Bindungsmodi der Testverbindungen führten zu verschiedenen Signalen im FLiN-Assay. Für den SERM 4-Hydroxytamoxifen nahm das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten mit steigender Konzentration zu, wohingegen die Zugabe von Diethylstilbostrol in einer Signalabnahme resultierte.

Für die Testverbindungen E2, Diethylstilbostrol, Raloxifen, Tamoxifen und 4-Hydroxytamoxifen wurden folgende  $K_d$ -Werte bestimmt:  $88 \pm 22 \text{ nm}$ ,  $15 \pm 5 \text{ nm}$ ,  $1.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ,  $3.5 \pm 2 \mu\text{M}$  und  $474 \pm 310 \text{ nm}$  ( $n=4$ ). Vergleichbare  $K_d$ -Werte aus der Literatur liegen bei  $0.4 \text{ nm}–2 \text{ nm}$  für E2.<sup>[16b, 20]</sup> Für die anderen Testverbindungen wurden bisher keine  $K_d$ -Werte für ER $\beta$  publiziert. Mit SPR-Messungen bestimmte  $K_d$ -Werte für die LBD aus ER $\alpha$  liegen bei  $0.009 \text{ nm}$  für Diethylstilbostrol,  $220 \text{ nm}$  für Tamoxifen und  $18 \text{ nm}$  für 4-Hydroxytamoxifen.<sup>[21]</sup> Damit sind die mit FLiN ermittelten Werte höher, zeigen aber den gleichen Trend wie die Ergebnisse von Experimenten zur kompetitiven Bindung. Diese Abweichungen könnten durch die Verwendung unterschiedlicher Proteinkonstrukte in den verschiedenen Assay-Systemen erklärt werden und spiegeln sich auch in den höheren  $K_d$ -Werten für das FLiN-Konstrukt in unseren Fluoreszenzpolarisations-Experimenten wider. Trotzdem eignet sich FLiN als Screening-Assay zur Detektion und Unterscheidung von Verbindungen, die die aktive oder inaktive Konformation des Rezeptors stabilisieren. Die mit FLiN ermittelten  $K_d$ -Werte waren über drei Proteinpräparationen konsistent (individuelle Expression, Aufreinigung und Markierung des Rezeptors).

Die Robustheit der mit dem FLiN-Assay gewonnenen Daten wurde durch Bestimmung des  $Z'$ -Faktor überprüft. Dazu wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $I_{520 \text{ nm}}/I_{451 \text{ nm}}$  für eine Negativkontrolle (DMSO) und eine Positivkontrolle (20  $\mu\text{M}$  Diethylstilbostrol oder 4-Hydroxytamoxifen) aus jeweils acht Messungen bestimmt. Dabei gelten Assay-Systeme mit  $Z' > 0.5$  als robuste Hochdurchsatz-Assays.<sup>[22]</sup> Mit  $Z' = 0.75 \pm 0.05$  für Diethylstilbostrol und  $0.81 \pm 0.09$  ( $n=5$ ) für 4-Hydroxytamoxifen liefert der FLiN-Assay valide Daten und eignet sich für die Detektion von ER $\beta$ -Agonisten und -Antagonisten im Hochdurchsatzformat.

Des Weiteren lassen sich durch FLiN-Messungen im Küvettenformat Assoziations- und Dissoziationskinetiken der Liganden aufnehmen (Abbildung 3). Die Bindung von 4-



**Abbildung 3.** Die Assoziation und Dissoziation der Liganden wurden durch zeitauf lösende Messung der Fluoreszenzintensität bei 460 nm in Küvetten untersucht. a) Die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen führte zu einer langsam Assoziation, die durch die Zugabe eines Überschusses an nichtmarkierter Wildtyp-ER $\beta$ -LBD komplett umgekehrt werden konnte. b) Die Zugabe von Lysozym als Negativkontrolle führte nicht zur Freisetzung des Liganden (DMSO-Kontrolle: siehe Abbildung S7).

Hydroxytamoxifen an den Rezeptor wurde über zeitauf lösende Messung der Fluoreszenzintensität von Acrylodan bei 460 nm verfolgt, da bei dieser Wellenlänge die größte Änderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten war (Abbildung S7). Die Zugabe der Testverbindung führte zu einer langsamen Abnahme der Fluoreszenzintensität, die der Assoziation von Rezeptor und Ligand entspricht. Durch Zugabe eines Überschusses an nichtmarkierter Wildtyp-ER $\beta$ -LBD konnte die Reaktion vollständig umgekehrt werden, was darauf schließen lässt, dass sich die Helix 12 nach Freigabe des Liganden komplett umlagert. Die Zugabe eines Überschusses an Lysozym als Negativkontrolle führte nicht zur Freisetzung des Liganden. Weitere kinetische Studien wurden für 4-Hydroxytamoxifen und Diethylstilbostrol durchgeführt (Abbildung S8).

Wir beschreiben hier die Entwicklung eines direkten Hochdurchsatz-Bindungsassays für die Identifizierung von Agonisten und Antagonisten des humanen ER $\beta$ . Der FLiN-Assay liefert robuste Daten und kann verschiedene, von den Liganden stabilisierte, Konformationen der LBD unterscheiden. Außerdem eignet sich der FLiN-Assay zur direkten Messung von Bindungskinetiken. Wir vermuten, dass sich das vorgestellte FLiN-Assay-Verfahren auch auf andere Kernrezeptoren übertragen lässt. So könnte FLiN auch für das Auffinden von Liganden der so genannten Waisen-Rezeptoren („orphan receptors“) geeignet sein, die von großem Interesse für die Wirkstoff-Forschung sind.<sup>[23]</sup>

**Stichwörter:** Direkter Bindungsassay · Fluoreszenzspektroskopie · Östrogenrezeptor · Wirkstoff-Forschung

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4379–4382  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4454–4457

- [1] N. Novac, T. Heinzel, *Curr. Drug Targets: Inflammation Allergy* **2004**, *3*, 335–346.
- [2] a) K. Wang, Y. J. Wan, *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 496–506; b) W. Shao, M. Brown, *Breast Cancer Res.* **2004**, *6*, 39–52; c) L. Di Croce, S. Okret, S. Kersten, J. A. Gustafsson, M. Parker, W. Wahli, M. Beato, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6201–6210; d) M. K. Hansen, T. M. Connolly, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2008**, *9*, 247–255; e) J. L. Staudinger, K. Lichti, *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 17–34.
- [3] a) R. V. Weatherman, R. J. Fletterick, T. S. Scanlan, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 559–581; b) S. Nilsson, S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, J. A. Gustafsson, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1535–1565.
- [4] I. G. Schulman, R. A. Heyman, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 639–646.
- [5] Y. Shang, M. Brown, *Science* **2002**, *295*, 2465–2468.
- [6] L. A. Luck, J. L. Barse, A. M. Luck, C. H. Peck, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *270*, 988–991.
- [7] H. E. Xu, T. B. Stanley, V. G. Montana, M. H. Lambert, B. G. Shearer, J. E. Cobb, D. D. McKee, C. M. Galardi, K. D. Plunket, R. T. Nolte, D. J. Parks, J. T. Moore, S. A. Kliewer, T. M. Willson, J. B. Stimmel, *Nature* **2002**, *415*, 813–817.

- [8] A. C. Pike, A. M. Brzozowski, R. E. Hubbard, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *74*, 261–268.
- [9] J. T. Moore, J. L. Collins, K. H. Pearce, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 504–523.
- [10] I. Paterni, C. Granchi, J. A. Katzenellenbogen, F. Minutolo, *Steroids* **2014**, *90C*, 13–29.
- [11] a) M. S. Malamas, E. S. Manas, R. E. McDevitt, I. Gunawan, Z. B. Xu, M. D. Collini, C. P. Miller, T. Dinh, R. A. Henderson, J. C. Keith, Jr., H. A. Harris, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5021–5040; b) B. R. Henke, T. G. Consler, N. Go, R. L. Hale, D. R. Hohman, S. A. Jones, A. T. Lu, L. B. Moore, J. T. Moore, L. A. Orband-Miller, R. G. Robinett, J. Shearin, P. K. Spearing, E. L. Stewart, P. S. Turnbull, S. L. Weaver, S. P. Williams, G. B. Wisely, M. H. Lambert, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5492–5505.
- [12] J. R. Simard, S. Klüter, C. Grütter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 394–396.
- [13] a) R. Schneider, C. Beumer, J. R. Simard, C. Grütter, D. Rauh, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6838–6841; b) R. Schneider, A. Gohla, J. R. Simard, D. B. Yadav, Z. Fang, W. A. van Otterlo, D. Rauh, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8400–8408; c) Z. Fang, J. R. Simard, D. Plenker, H. D. Nguyen, T. Phan, P. Wolle, S. Baummeister, D. Rauh, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *10*, 279–288.
- [14] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
- [15] M. E. Brandt, L. E. Vickery, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4843–4849.
- [16] a) G. G. Kuiper, J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg, J. A. Gustafsson, *Endocrinology* **1998**, *139*, 4252–4263; b) G. J. Parker, T. L. Law, F. J. Leno, R. E. Bolger, *J. Biomol. Screening* **2000**, *5*, 77–88; c) H. A. Harris, A. R. Bapat, D. S. Gonder, D. E. Frail, *Steroids* **2002**, *67*, 379–384.
- [17] C. P. Miller, M. D. Collini, B. D. Tran, H. A. Harris, Y. P. Kharode, J. T. Marzolf, R. A. Moran, R. A. Henderson, R. H. Bender, R. J. Unwalla, L. M. Greenberger, J. P. Yardley, M. A. Abou-Gharbia, C. R. Lytle, B. S. Komm, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1654–1657.
- [18] a) Z. Qin, I. Kastrati, R. E. Chandrasena, H. Liu, P. Yao, P. A. Petukhov, J. L. Bolton, G. R. Thatcher, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2682–2692; b) U. Schopfer, P. Schoeffter, S. F. Bischoff, J. Nozulak, D. Feuerbach, P. Floersheim, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1399–1401; c) T. A. Blizzard, J. D. Morgan II, R. T. Mosley, E. T. Birzin, K. Frisch, S. P. Rohrer, M. L. Hammond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 479–483.
- [19] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Bd. 3, 3. Aufl., Springer, New York, **2006**.
- [20] a) G. G. Kuiper, B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson, J. A. Gustafsson, *Endocrinology* **1997**, *138*, 863–870; b) E. Jisa, E. Dornstauder, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu, A. Jungbauer, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 953–961.
- [21] R. L. Rich, L. R. Hoth, K. F. Geoghegan, T. A. Brown, P. K. LeMotte, S. P. Simons, P. Hensley, D. G. Myszka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8562–8567.
- [22] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screening* **1999**, *4*, 67–73.
- [23] Y. Shi, *Drug Discovery today* **2007**, *12*, 440–445.

Eingegangen am 16. Oktober 2014,  
veränderte Fassung am 19. Dezember 2014  
Online veröffentlicht am 9. Februar 2015