

| Einleitung |

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Estrogenrezeptor

### 1.1.1 Allgemeines

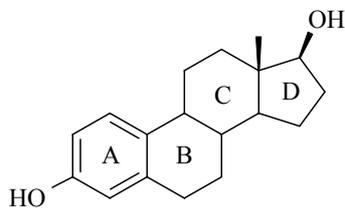
Estrogene üben eine Vielzahl verschiedener Effekte auf Wachstum, Differenzierung und Funktion verschiedener Gewebe des Menschen aus [Korach, 1, Turner, 2, Farhat, 3, Iafrati, 4]. Dazu gehören auch wichtige regulatorische Funktionen bei der Fortpflanzung und in den Geschlechtsorganen von Frauen und Männern, wie z. B. die Entwicklung und Funktion der weiblichen, sekundären Geschlechtsmerkmale [Muramatsu, 5]. In den so genannten „Nichtzielgeweben“ (z. B. Knochengewebe, kardiovaskuläres System, zentrales Nervensystem) sind Estrogene an protektiven Vorgängen beteiligt [Watanabe, 6]. Des Weiteren spielen Estrogene eine große Rolle bei der Proliferation von Krebs an Brustgewebe, Endometrium und Ovarien [Leclercq, 7].

Sämtliche Effekte der Estrogene werden über mindestens zwei Estrogenrezeptoren (ER) vermittelt. Der 1962 von Jensen [8] und Jakobsen entdeckte ER wurde 1986 von Green *et al.* aus menschlichen MCF-7-Brustkrebszellen geklont, wobei auch die Primärstruktur bestimmt wurde [Green, 9]. Dieser ER wird heute als ER $\alpha$  bezeichnet, da Kuiper 1996 einen weiteren Estrogenrezeptor (ER $\beta$ ) entdeckte [Kuiper, 10]. ER $\beta$  ist keine Splicevariante des Estrogenrezeptors  $\alpha$ , sondern ein unterschiedliches Genprodukt, da die codierenden DNA-Abschnitte auf einem anderen Chromosom lokalisiert sind [Enmark, 11].

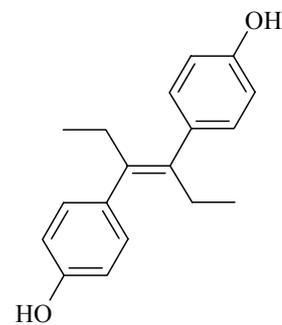
ER $\alpha$  und ER $\beta$  werden im ZNS, im kardiovaskulären System, im Knochen, im Urogenitaltrakt und in der Brust nebeneinander exprimiert. Im Uterus und in den Brustdrüsen wird allerdings überwiegend ER $\alpha$  gebildet. Ausschließlich ER $\alpha$  findet man in der Leber, wohingegen im Gastrointestinaltrakt nur ER $\beta$  nachgewiesen wurde [Gustafsson, 12]. Mittlerweile gilt es als sicher, dass ER $\alpha$  für andere biologische Funktionen verantwortlich ist als ER $\beta$ . So wird dem Estrogenrezeptor  $\alpha$  wegen seines dominanten Vorkommens in Brust und Uterus die größere Rolle bei Fortpflanzungsvorgängen zugeschrieben. In Bezug auf die Entwicklung eines Brusttumors ist zudem interessant, dass das Verhältnis von ER $\alpha$  zu ER $\beta$  im malignen Mammakarzinomgewebe gegenüber dem Verhältnis im gesunden Gewebe zu Gunsten von ER $\alpha$  deutlich ansteigt. Eventuell spielt die veränderte Expression eine signifikante Rolle in der Veränderung der

die veränderte Expression eine signifikante Rolle in der Veränderung der Estrogenabhängigkeit während der Entwicklung des Mammakarzinoms [Leygue, 13, Speirs, 14]. ER $\beta$  dagegen gilt als der Subtyp, der für die protektive Wirkung von Estrogenen sowohl auf Gefäße [Farhat, 3] als auch auf Prostata- [Adlercreutz, 15] und Kolonkrebs [Newcomb, 16] verantwortlich ist.

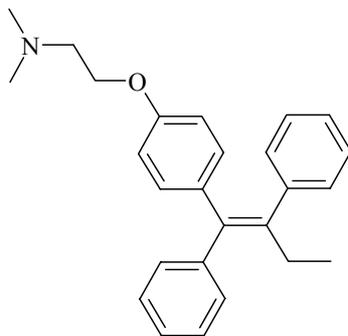
Neben dem physiologischen Liganden des ER, Estradiol (E2, Abb. 1.1), sind viele weitere am ER agonistisch wirksame Verbindungen, wie z. B. Diethylstilbestrol (DES), bekannt.



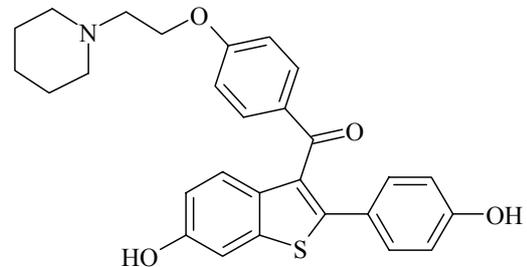
Estradiol



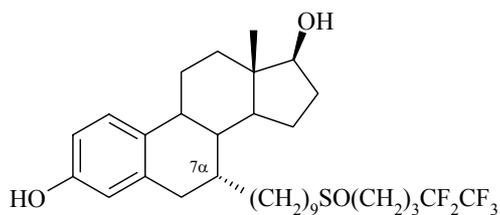
Diethylstilbestrol



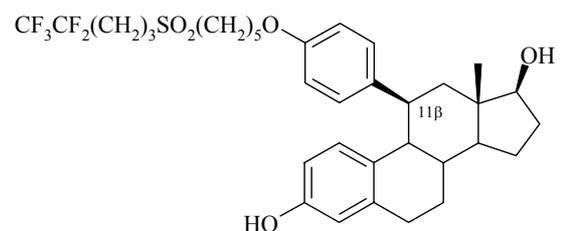
Tamoxifen



Raloxifen



ICI 164 384



RU 58 668

**Abb. 1.1:** Strukturformeln am ER aktiver Verbindungen.

Eine Gruppe weiterer Liganden des ER stellen die selektiven Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) dar. Verbindungen wie Tamoxifen (TAM) und Raloxifen (RAL) zeichnen sich durch eine gewebsspezifische Wirkung aus und können zur Therapie und Prophylaxe von Brustkrebs eingesetzt werden [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 17], da sie in der Brust als Antagonisten wirken. Auf Knochen, Fettstoffwechsel und Endometrium [Gottardis, 18] üben diese SERM dagegen eine estrogenartige Wirkung aus.

Rein antagonistisch wirksame Strukturen weisen häufig ein Steroidgerüst auf und verfügen über lange Seitenketten in 7 $\alpha$ - (ICI 164 384, [Gauthier, 19]) bzw. 11 $\beta$ -Position (RU 58 668, [van de Velde, 20]) des Steroids.

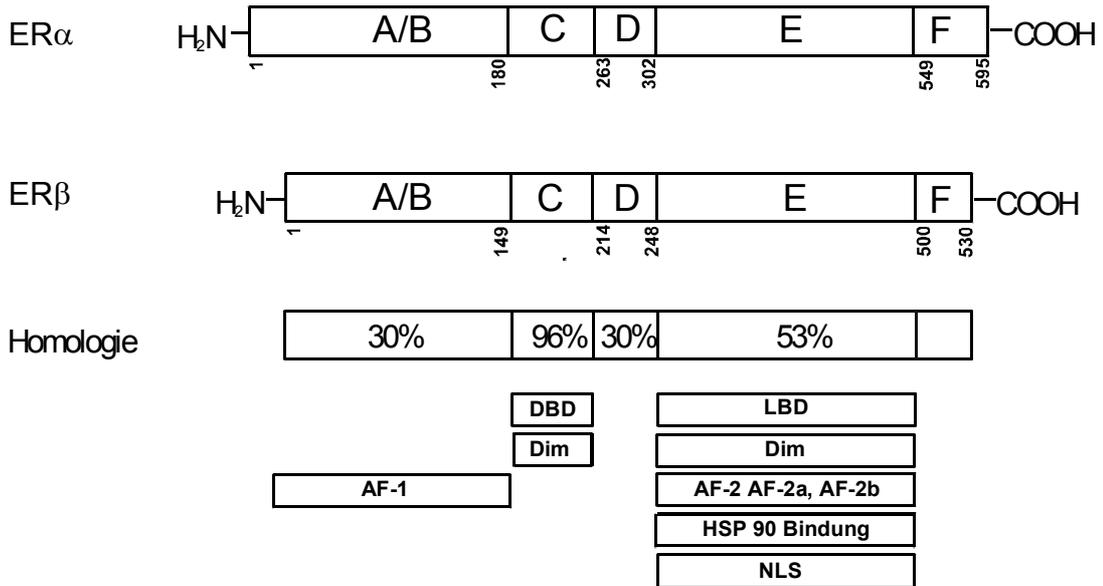
### 1.1.2 Der Aufbau der Estrogenrezeptoren

Beide Estrogenrezeptorsubtypen<sup>1</sup> sind kernständige Rezeptoren [Htun, 21]. Es handelt sich um ligandeninduzierbare Transkriptionsfaktoren aus der Klasse der Steroidhormonrezeptoren (SHR) [King, 22, Welshon, 23]. ER $\alpha$  ist ein Protein aus 595 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 66 kDa [Green, 9, Greene, 24]. ER $\beta$  besteht aus 530 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 59 kDa. Im allgemeinen sind SHR aus sechs funktionellen Domänen aufgebaut, die mit A - F bezeichnet werden, wobei die Domänen A und B zusammengefasst werden [Kumar, 25, 26]. Der schematische Aufbau der beiden ER ist in Abb. 1.2 dargestellt.

In den N-terminalen Regionen A/B findet man nur wenig Homologie zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Dort zeigen alle SHR einen sehr variablen Aufbau, der die Schwankungen in der Größe der einzelnen SHR verursacht. Hier sitzt auch AF-1, eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion. AF-1 aktiviert die Transkription, indem sie mit dem Präinitiationskomplex der Transkription oder Koaktivatoren in Wechselwirkung tritt [Giguere, 27, Godowski, 28]. Auch der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors hängt mit einer ligandenunabhängigen Aktivierung des ER über AF-1 zusammen [Weigel, 29, Aronica, 30, Bunone, 31]. Des Weiteren wird AF-1 für die partiell agonistische Wirkung von SERM wie TAM und RAL verantwortlich gemacht [McInerney, 32, Tzukunfterman, 33].

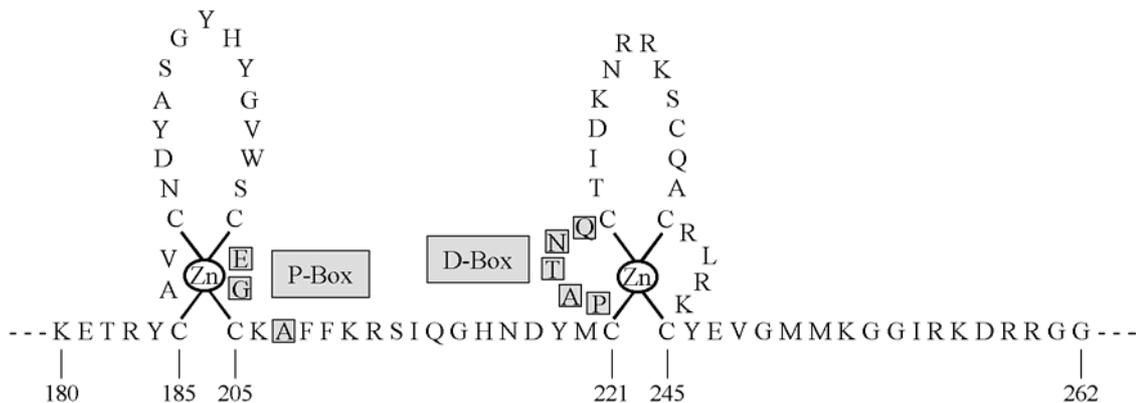
---

<sup>1</sup> Die Abkürzung ER bezieht sich im Folgenden auf beide Rezeptorsubtypen.



**Abb. 1.2:** Funktionelle Domänen der ER mit Angabe der Aminosäurenummern nach Green [34], Gronemeyer [35] und Tsai [36]; **NLS:** nuclear localization signal; **HSP90:** heat shock protein 90; **AF:** Aktivierungsfunktion; **DBD:** DNA binding domain; **LBD:** Ligand binding domain; **Dim:** Dimerisierung; Homologien nach Dutertre [37].

Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist in der zentralen Domäne C zu finden. Sie enthält acht Cysteinmoleküle, die an Zink koordiniert sind und zwei Zinkfinger ausbilden (Abb. 1.3). Diese sind für die Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb der Promoter der estrogenabhängigen Zielgene, sogenannter estrogen response elements (ERE), und für die Rezeptordimerisierung verantwortlich [Evans, 38, Luisi, 39, Freedman, 40]. Die Domäne C ist die am stärksten konservierte Region der SHR [Green, 41, Beato, 42]. ERα und ERβ weisen dort eine Homologie von 96% auf.



**Abb. 1.3:** Zinkfinger motive des humanen ERα nach Green und Chambon [43], Fuller [44] und Tsai [36]; Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgt im Ein-Buchstaben-Code.

Die in Abb. 1.3 hervorgehobenen Aminosäuren der P-Box (E, G, A) vermitteln die spezifische Erkennung der ERE-Sequenz [Tsai, 36, Mader, 45]. Mutationsstudien an diesen drei Aminosäuren führten bei Einführung der Glucocorticoidrezeptor-spezifischen Aminosäuren (G, S, V) zur Erkennung des GRE (glucocorticoid response element) durch den veränderten ER [Green, 46, Umesono, 47]. Durch die D-Box wird eine unspezifische DNA-Erkennung sowie die Rezeptordimerisierung gewährleistet [Tsai, 36, Mader, 48].

An die DNA-Bindungsdomäne schließt sich eine sogenannte hinge-Domäne D (hinge = Gelenk, Scharnier) an, die noch sehr wenig charakterisiert ist. Durch ihre Variabilität wird die auf die Hormonbindung folgende Rezeptortransformation ermöglicht. Sie stellt eventuell auch einen Angriffspunkt für Koaktivatoren dar [Jackson, 49].

In Domäne E befindet sich die Hormon- bzw. Ligandenbindungsdomäne (LBD), sie ist relativ groß und verfügt über eine funktionelle Komplexität. Neben der ligandenabhängigen AF-2 des ER beinhaltet sie eine ligandenunabhängige AF-2a [Norris, 50] und eine AF-2b [Jordan, 51]. Außerdem sind dort ein nuclear localization signal (NLS), eine Dimerisierungsregion und eine heat shock protein 90 (HSP90) bindende Region lokalisiert [Gronemeyer, 52, Parker, 53].

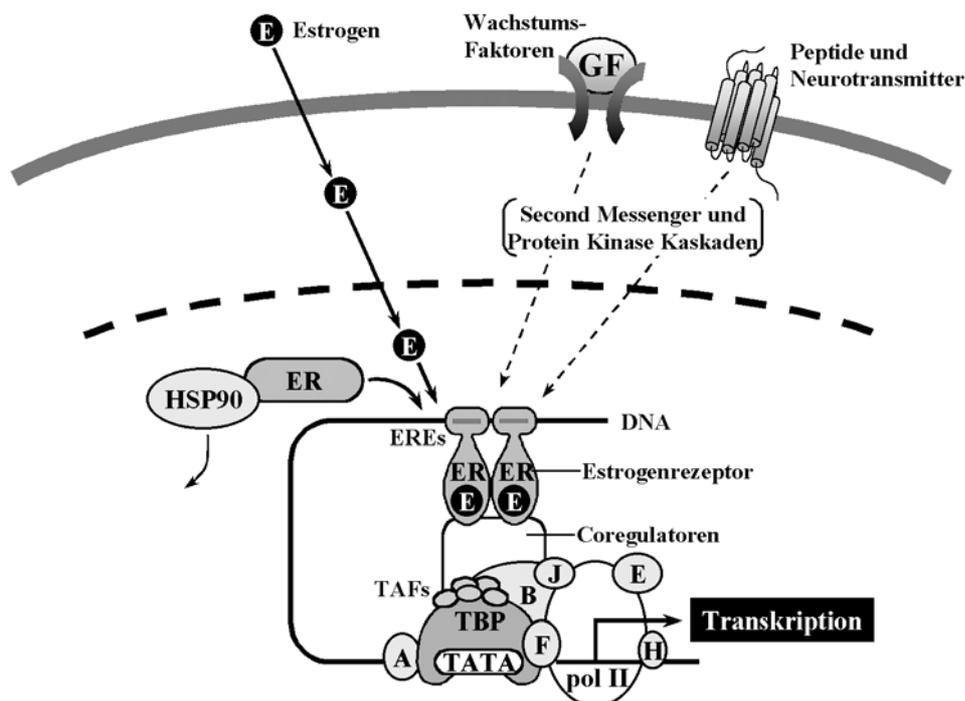
AF-1 und AF-2 können die Transkription unabhängig voneinander aktivieren. In den meisten Fällen wird jedoch ein synergistisches Zusammenwirken der beiden Aktivierungsfunktionen beobachtet [Tzukerman, 33, Berry, 54]. Durch dieses Zusammenwirken aktiviert der ER nach Bindung an ERE die Genexpression [Kraus, 55].

Die Homologie zwischen der LBD des ER $\alpha$  und des ER $\beta$  ist gering und liegt bei 53% [Duterte, 37]. Obwohl dies in etwa der Homologie zwischen den Ligandenbindungsdomänen des Glucocorticoid- und des Progesteronrezeptor, die mit Cortison und Progesteron verschiedene, physiologische Liganden besitzen, entspricht, haben ER $\alpha$  und ER $\beta$  Estradiol als physiologischen Ligand. Durch diese geringe Übereinstimmung in den LBD der beiden ER Subtypen ergibt sich die Möglichkeit für beide Rezeptoren selektive Liganden zu entwickeln (Kapitel 1.1.6).

Am C-terminalen Ende folgt die Domäne F, für die bis heute noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden konnte [Tsai, 36]. Jedoch scheint sie die Transaktivierungsstärke von AF-1 und AF-2 zu beeinflussen [Hansen, 56].

### 1.1.3 Rezeptortransformation und Genaktivierung

Zur Genaktivierung durch einen Liganden muss dieser die Zellmembran durchdringen und so in das Zytoplasma gelangen (Abb. 1.4). Von dort kann er über passive Diffusion durch einen Kanal bzw. eine Kernpore in den Zellkern gelangen. Die Aufnahme in den Zellkern kann auch mittels eines aktiven Transportes, der durch ein nuclear localization signal (NLS) im ER vermittelt wird, geschehen [Guichon-Mantel, 57].



**Abb. 1.4:** Modell der Transkriptionsaktivierung durch den ER nach Tsai [36] und Katzenellenbogen [58]; **TATA:** Basensequenz TATAAA innerhalb des Promoters; **ERE:** Estrogen Response Element; **HSP90:** heat shock protein 90; **TBP:** TATA-bindendes Protein; **TAF:** TBP-assoziierte Faktoren; **pol II:** RNA-Polymerase II; **A/B/E/F/H/J:** Transkriptionsfaktoren (TFII) der RNA-Polymerase II.

In seiner physiologisch inaktiven Form ist der ER im Zellkern an ein heat shock protein 90 assoziiert [Joab, 59, Renoir, 60, Sanchez, 61], das den Rezeptor bis zur Hormonbindung stabilisiert. Bindet ein Ligand an den inaktiven ER [Htun, 21] dissoziiert der Komplex aus ER und HSP90. Die Abspaltung des HSP90 ist für die Bildung eines funktionell aktiven ER allerdings nicht ausreichend [Bagchi, 62]: Die Ligandenbindung führt zu einer Phosphorylierung des Rezeptors, wodurch ein Konformationswechsel des ER ausgelöst wird. Der basale Phosphorylierungsgrad des ER steigt nach Bindung von Estrogenen bzw. Antiestrogenen auf das 3- bis 4-fache [LeGoff, 63]. Hierdurch nimmt die Affinität zu bestimmten DNA-Sequenzen und die Transaktivierungsstärke zu [Den-

ton, 64]. Der ligandenabhängige Konformationswechsel des ER ermöglicht die Dimerisierung des Rezeptors (Abb. 1.4), wobei Homodimere und Heterodimere aus ER $\alpha$  und ER $\beta$  gebildet werden [Kumar, 65, Jungblut, 66, Little, 67, 68]. Die Stabilität des Dimers ist dabei abhängig vom Liganden. Am isolierten ER $\alpha$  stabilisieren Antiestrogene das ER-Dimer stärker als Agonisten [Katzenellenbogen, 69]. *In vivo* wird das Dimer dagegen durch Agonisten besser stabilisiert [Khan, 70]. Diese Diskrepanz wird mit der Anwesenheit von Koaktivatoren (Kapitel 1.1.4) *in vivo* erklärt. Katzenellenbogen [69] konnte am isolierten ER eine Steigerung der Stabilität des Dimers durch Zugabe von Koaktivatoren zeigen. Dieser Effekt trat allerdings nur bei Agonisten auf.

Nach der Dimerisierung bindet das Dimer an korrespondierende DNA-Sequenzen (ERE) und moduliert unter Einwirkung von Koaktivatoren eine spezifische Genexpression [Tsai, 36, Klein-Hitpass, 71, Seiler-Tuyns, 72].

Auf die Bindung des ER-Dimers an das ERE folgt ein Zusammenwirken von mehreren Proteinen, den sogenannten Transkriptionsfaktoren, und deren Bindung an eine weitere DNA-Sequenz, die sogenannte TATA-Box [Tsai, 36]. Diese ist etwa 25 - 30 Basenpaare oberhalb des Startpunktes der Transkription lokalisiert.

Der Transkriptionsfaktor TFIID, der sich aus dem TATA-bindenden Protein (TBP) und den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammensetzt, bindet an die TATA-Sequenz innerhalb des Promoters [Greenblatt, 73]. Weitere Koordination mit TFIIB, TFIIF und RNA-Polymerase II [Buratowski, 74] führt zum minimalen Präinitiationskomplex der Transkription. TFIIB geht hierbei Wechselwirkungen mit DNA-Sequenzen ober- und unterhalb der TATA-Box, mit TBP, TFIIF, RNA-Polymerase II [Lee, 75, Nikolov, 76, Usheva, 77] und der AF-2 des ER ein [Ing, 78, Horwitz, 79]. Aus diesem Initiationskomplex heraus beginnt die RNA-Polymerase II mit der Bildung von m-RNA, die wiederum die Proteinexpression in den Ribosomen bewirkt.

#### **1.1.4 Koregulatoren und Wachstumsfaktoren**

In den letzten Jahren sind mindestens 19 unterschiedliche Koaktivatoren für den ER $\alpha$  identifiziert worden [Klinge, 80]. Dabei handelt es sich um Proteine, die direkt mit nukleären Rezeptoren interagieren und dadurch die Transkription steigern. Sie dienen als Brücke zwischen agonistgebundenem Rezeptor und den Transkriptionsfaktoren des Präinitiationskomplexes [Horwitz, 79, Glass, 81]. Viele Koaktivatoren verfügen über eine intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität [Struhl, 82]. HAT acetyliert

Lysinreste am N-Terminus der Histone 3 und 4 im Chromatin, was zu einer schwächeren Assoziation der Histone an die DNA führt. Die Bildung eines stabilen Präinitiationskomplexes wird gesteigert und die Transkriptionsaktivierung durch RNA-Polymerase II erleichtert [Sternglanz, 83, Pennisi, 84, Korzus, 85, Tsukiyama, 86, Wang, 87].

Allen Koaktivatoren ist gemeinsam, dass die Wechselwirkung zwischen ihnen und dem Agonist-ER-Komplex durch Wechselwirkungen von AF-2 der LBD des ER und der NR-Box des Koaktivators vermittelt wird. Die NR-Box besteht aus dem leucinreichen LXXLL-Motiv, wobei L für Leucin und X für weitere Aminosäuren steht [Ding, 88]. Die Kontaktoberfläche an der LBD des ER ist eine komplementäre Tasche, die durch die Helices 3, 4, 5 und 12 des ER gebildet wird [Brzozowski, 89, Bourget, 90, Renaud, 91, Wagner, 92, Shiau, 93]. Diese ist für ER $\alpha$  und ER $\beta$  nicht identisch [Cowley, 94]. Des Weiteren reagieren Koaktivatoren nur mit der an Agonisten gebundenen LBD des ER, nicht aber mit dem freien Rezeptor oder mit einem antagonistengebundenen ER.

Wie durch Transfektionsexperimente gezeigt werden konnte, sind Korepressoren in der Lage, die agonistische Wirkung von Antiöstrogenen wie Tamoxifen zu unterdrücken. Der Wirkmechanismus von Korepressoren, wie SMRT (silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors) und NCoR (Nuclear receptor CoRepressor) ist noch nicht geklärt [Jackson, 49, Hörlein, 95]. Fest steht, dass auch die Korepressoren über das LXXLL-Bindungsmotiv an die Koaktivatorbindungsstelle des ER binden. Sie dienen in Abwesenheit von Liganden dazu, einige nukleäre Rezeptoren im inaktiven Zustand zu halten. Korepressoren interagieren vor allem mit ungebundenen Rezeptoren. Die Assoziation wird verstärkt durch Zugabe von Rezeptorantagonisten [Pike, 96]. Der agonistgebundene Rezeptor interagiert dagegen nicht mit klassischen Korepressoren.

Durch die über verschiedene Signalwege regulierte Phosphorylierung des ER kann dessen Transkriptionsaktivität moduliert werden. Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) [Ignar-Trowbridge, 97], IGF-1 (insulin-like growth factor 1) [Aronica, 30], TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) [Smith, 98, Clarke, 99], Dopamin [Power, 100, 101] und cAMP [Aronica, 30, Ignar-Trowbridge, 102] können den ER dabei auch in Abwesenheit eines Agonisten aktivieren. TGF- $\beta$  (Kapitel 1.2) stellt dagegen einen wachstumshemmenden Faktor dar [MacGregor, 103]. Die Wirkung dieser Wachstumsfaktoren wird über ihre Rezeptoren vermittelt, der genaue Mechanismus der Regulierung der ER-Aktivität ist aber noch unbekannt [Tsai, 36, Hansen, 56, MacGregor, 103].

### 1.1.5 Bindungsmodus verschiedener Liganden an den Estrogenrezeptor

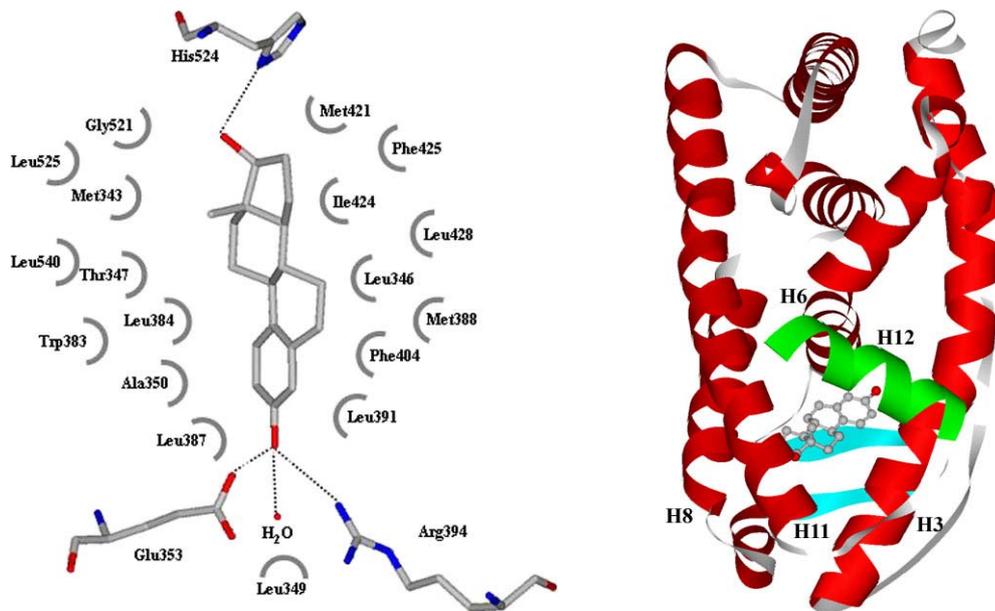
Mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturen der LBD von ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$ , die mit verschiedenen, agonistisch und antagonistisch wirksamen Substanzen kokristallisiert wurden, konnte der Wirkmechanismus zumindest teilweise aufgeklärt werden.

Bei agonistischer Wirkung wird der Ligand in eine hydrophobe Tasche des Rezeptors aufgenommen. Diese Tasche wird im Falle des ER $\alpha$  aus Teilen von Helix 3 (Met 342-Leu 354), Helix 6 (Trp 383-Arg 394), Helix 8 und der vorangehenden Schleife (Val 418-Leu 428) sowie Helix 11 (Met 517-Met 528) gebildet. Durch Helix 12 (Leu 539-His 547) wird sie verschlossen [Brzozowski, 89], wodurch die Koaktivatorbindungsstelle (AF-2) aus Teilen der Helices 3, 5, 6, 11 und 12 gebildet wird. Diese wird durch Wechselwirkung mit den Aminosäuren Glu 542 und Lys 362 stabilisiert. In dieser Konformation des ER können Koaktivatoren durch die spezifische Bindung eines helikalen LLXXL-Motivs (NR-Box) an die exponierte AF-2 binden.

Die Interaktionen von Estradiol (E2, Abb. 1.1) in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Estrogenrezeptor  $\alpha$  erfolgen sowohl durch Wasserstoffbrückenbindungen als auch durch hydrophobe Kontakte. Die phenolische OH-Gruppe des E2 geht dabei Wasserstoffbrücken zur Carboxylgruppe des Glu 353, zum Guanidiniumrest des Arg 394 und zu einem Wassermolekül ein (Abb. 1.5). Die Hydroxygruppe in 17 $\beta$ -Position bildet eine weitere Wasserstoffbrücke zum N3 des Imidazolrings des His 524 aus.

Die hydrophoben Wechselwirkungen finden hauptsächlich zwischen dem A-Ring, der Verbindungsstelle zwischen A- und B-Ring, dem D-Ring des E2 und den hydrophoben Seitenketten von Ala 350 und Leu 387 auf der  $\beta$ -Seite und Phe 404 und Leu 391 auf der  $\alpha$ -Seite des Moleküls statt. Der D-Ring tritt am distalen Ende der Bindungstasche mit Ile 424, Gly 521 und Leu 525 in Kontakt [Brzozowski, 89].

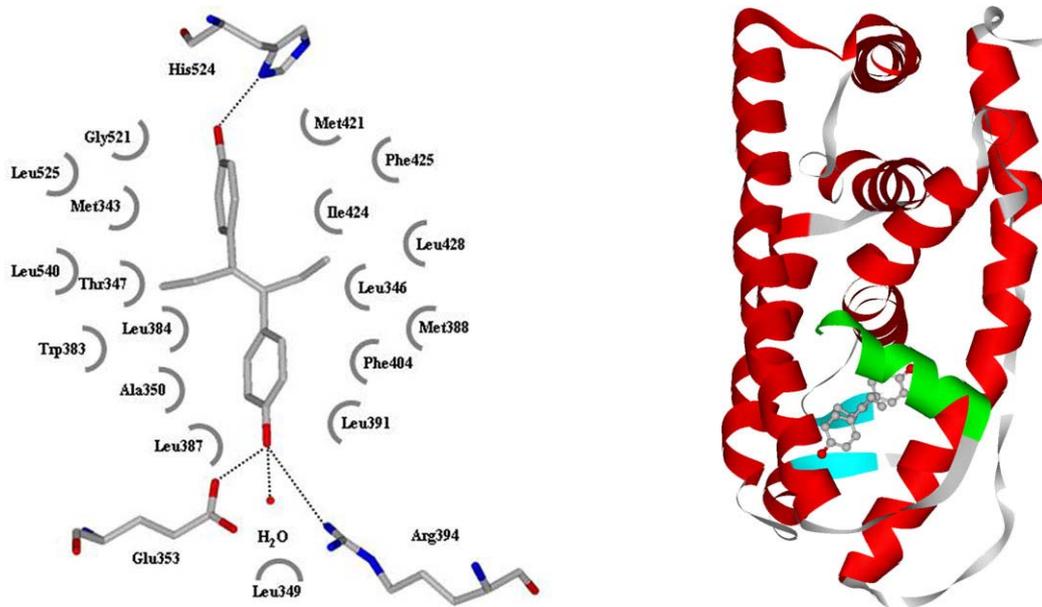
Vergleicht man die LBD von ER $\alpha$  und ER $\beta$  ergibt sich eine Homologie von nur 53 %. Im Bereich der Bindungsstelle für E2 ist die Homologie dagegen sehr viel höher. Die LBD des ER $\alpha$  unterscheidet sich von der des ER $\beta$  in 5 Å Entfernung von Estradiol in nur zwei Aminosäuren (Leu 384 und Met 421 des ER $\alpha$  sind beim ER $\beta$  durch Met 336 und Ile 373 ersetzt); daher ist E2 auch sehr ähnlich an die LBD des ER $\beta$  gebunden. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen E2 und ER $\beta$  erfolgen über Glu 305, Arg 356, einem Wassermolekül und His 475 [Pike, 104].



**Abb. 1.5:** Wechselwirkungen von E2 mit der LBD des ER $\alpha$  nach Brzozowski [89]; links: schematische Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakte); rechts: Röntgenkristallstruktur eines Monomeren, hellgrau im Vordergrund Helix 12.

In den E2/ER Komplexen verschließt Helix 12 die Ligandenbindungstasche, ohne selbst in Kontakt mit E2 zu treten. Agonistisch wirksame Verbindungen müssen analog zu E2 an den ER binden, um eine identische Ausrichtung der Helix 12 zu ermöglichen. Dazu müssen sie einen vergleichbaren Aufbau wie E2 besitzen. Um die wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu 353, Arg 394 und His 524 bilden zu können, müssen Verbindungen zwei Hydroxygruppen mit einen Abstand von ca. 10.9 Å (O-O-Abstand von E2) aufweisen. Ferner sollten sie eine planare Struktur haben. *E*-Diethylstilbestrol (Abb. 1.1) ist eine Verbindung die diese Voraussetzungen erfüllt.

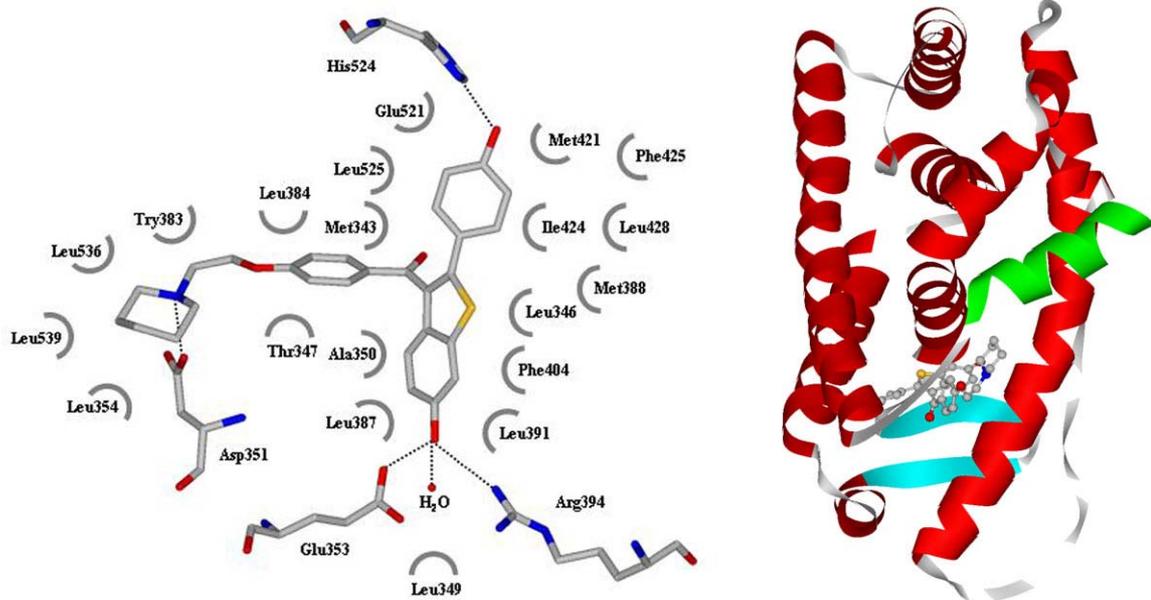
Von diesem nichtsteroidalen Agonisten ist ebenfalls eine Röntgenkristallstruktur, in der er an die LBD gebunden ist, aufgenommen worden [Shiau, 93]. DES bindet analog zu E2 an den ER $\alpha$  und es kommt zu Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer Hydroxygruppe und Glu 353, Arg 394 und einem Wassermolekül des ER (Abb. 1.6). Der O-O Abstand beträgt bei DES 12.1 Å und ist damit um 1.2 Å größer als der entsprechende Abstand bei E2. Trotzdem kann DES eine Wasserstoffbrücke zu His 524 bilden. Allerdings ist die Position der OH-Gruppe, die der OH-Gruppe des D-Rings von E2 entspricht, im Vergleich zu E2 um 1.7 Å verschoben. DES geht des Weiteren mehr hydrophobe Kontakte mit der LBD des ER ein. Daran sind auch die beiden Ethylseitenketten beteiligt, die in hydrophobe Taschen ragen, welche bei der Bindung von E2 nicht besetzt sind. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen werden zu Ala 350, Leu 384, Phe 404 und Leu 428 ausgebildet [Shiau, 93].



**Abb. 1.6:** Wechselwirkungen von DES mit der LBD des ER $\alpha$  nach Shiau [93]; links: schematische Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakte); rechts: Röntgenkristallstruktur eines Monomeren, hellgrau im Vordergrund Helix 12.

Auch von SERM, wie Raloxifen und 4-Hydroxytamoxifen (OHT), dem aktiven Metabolit von TAM, sind die Interaktionen mit dem ER aus Röntgenkristallstrukturen bekannt. Diese Moleküle unterscheiden sich von E2 und DES unter anderem durch basische Seitenketten, wodurch sie ein größeres Volumen als E2 bzw. DES haben. Trotzdem können SERM an den ER binden: Die Ligandenbindungstasche des ER besitzt ein Volumen von  $450 \text{ \AA}^3$  und ist damit fast doppelt so groß wie E2 ( $245 \text{ \AA}^3$ ) [Brzozowski, 89]. Sowohl RAL als auch OHT sind wie E2 über Wasserstoffbrücken zu Glu 353, Arg 394 und einem Wassermolekül an den Rezeptor gebunden (Abb. 1.7, Abb. 1.8). Eine Wasserstoffbrücke zu His 524 ist dagegen nur bei RAL möglich, da OHT keine entsprechende Hydroxygruppe besitzt.

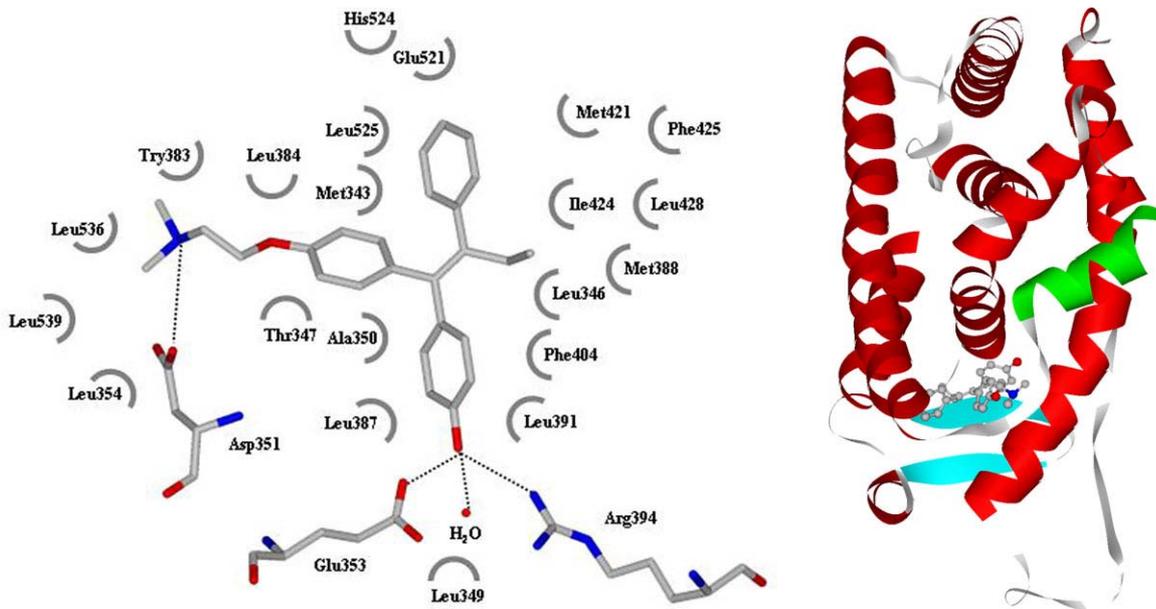
Über ihre basischen Seitenketten belegen diese beiden Verbindungen bei der Bindung an den ER zusätzlich Bereiche der Bindungstasche, die von E2 nicht genutzt werden. Bei RAL kommt es zu einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Piperidinstickstoff der Seitenkette und Asp 351, eine in einer Seitentasche der LBD des ER $\alpha$  lokalisierte Aminosäure. Bei OHT kommt es zu einer Salzbrücke zwischen dem Stickstoff der Dimethylaminogruppe der Seitenkette und Asp 351.



**Abb. 1.7:** Wechselwirkungen von RAL mit der LBD des ER $\alpha$  nach Brzozowski [89]; links: schematische Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakte); rechts: Röntgenkristallstruktur eines Monomeren, hellgrau im Vordergrund Helix 12.

Die basischen Seitenketten der SERM sind für die antiestrogene Wirkung von großer Bedeutung. Durch ihr Volumen und die Interaktion der Seitenkette mit Asp 351 wird Helix 12 in eine andere Position gedrängt als bei der Bindung von Estradiol. Sie ist nicht mehr in der Lage, sich wie ein Deckel über die Bindungstasche zu legen. Helix 12 kann an Stelle dessen mit ihren Resten Leu 540 bis Leu 544, die einer NR-Box ähneln (LLEML statt LXXLL), die hydrophoben Interaktionen der NR-Box-Peptide imitieren und selbst an die Koaktivatorbindungsstelle binden, wodurch das Koaktivator-Recruitment verhindert wird [Shiau, 93].

Asp 351 wurde aber auch als wichtiger Bindungspunkt für die agonistische Wirkung von OHT identifiziert. Nach einem Austausch von Asp 351 gegen Gly 351 durch Punktmutation verliert OHT die agonistische Wirkkomponente. An diesem ER-Mutanten ist OHT nur antagonistisch wirksam. Da AF-2 im OHT/ER Komplex nicht für die agonistische Wirkung von SERM verantwortlich sein kann, wurde eine weitere Aktivierungsfunktion (AF-2b) vorgeschlagen, die den Agonismus von OHT vermittelt [Jordan, 105].



**Abb. 1.8:** Wechselwirkungen von OHT mit der LBD des ER $\alpha$  nach Shiao [93]; links: schematische Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakte); rechts: Röntgenkristallstruktur eines Monomeren, hellgrau im Vordergrund Helix 12.

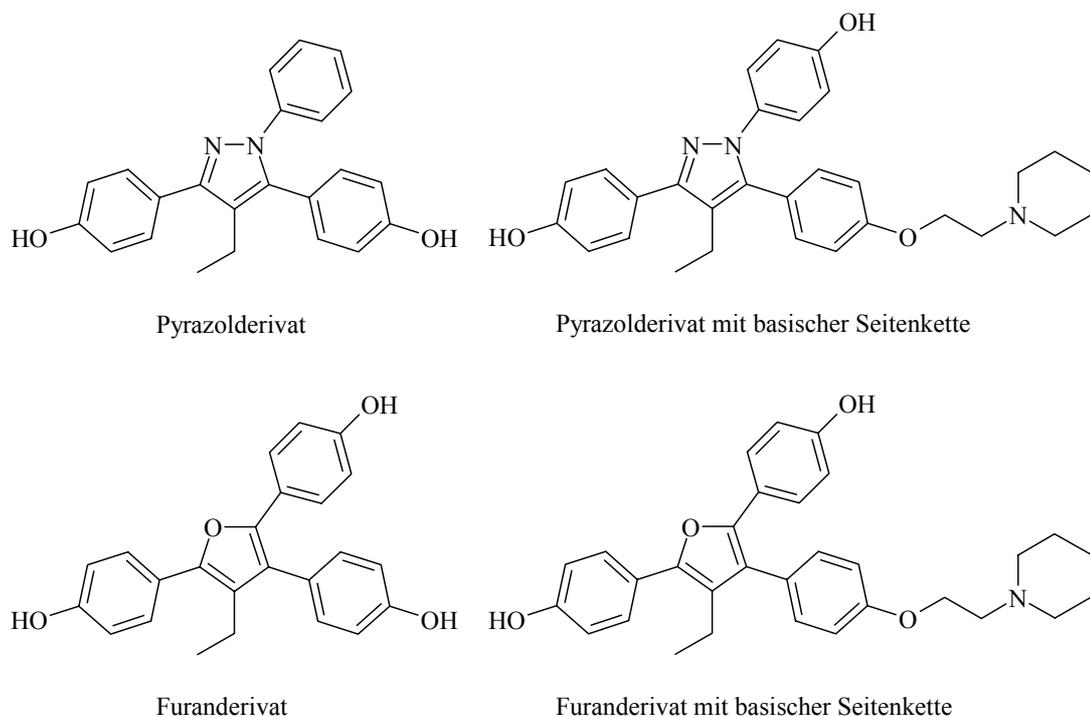
Echte Antagonisten am ER sind Verbindungen mit einem Steroidgrundgerüst und einer äußerst langen Seitenkette an 7 $\alpha$ - oder 11 $\beta$ -Position des E2-Grundgerüsts. Verbindungen wie RU 58 688 und ICI 164 384 (Abb. 1.1) zeigen im Gegensatz zu SERM keine agonistische Wirkkomponente am ER.

Durch Proteolyse- und Peptidbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass ICI 164 384 eine Rezeptorkonformation generiert, die sich von derjenigen, die durch SERM hervorgerufen wird, unterscheidet. Eine Röntgenkristallstruktur der mit ICI 164 384 kokristallisierten LBD des ER $\beta$  der Ratte wurde 2001 von Pike [96] aufgenommen. Das Estradiolgrundgerüst ist dort analog zu E2 and die LBD gebunden. Die Position der Helix 12 ist nicht zu erkennen, da durch die Größe und die Position der Seitenkette von ICI 164 384 eine Rezeptorkonformation hervorgerufen wird, die sich durch eine vollständige Destabilisierung dieser Helix auszeichnet.

### 1.1.6 Verbindungen mit selektiver Wirkung an ER $\alpha$ bzw. ER $\beta$

Estradiol hat, wie auch viele andere synthetische und natürliche vorkommende am ER wirksame Substanzen, zu beiden Rezeptorsubtypen ungefähr die gleiche Bindungsaffinität [Kuiper, 10, 106, Mosselman, 107].

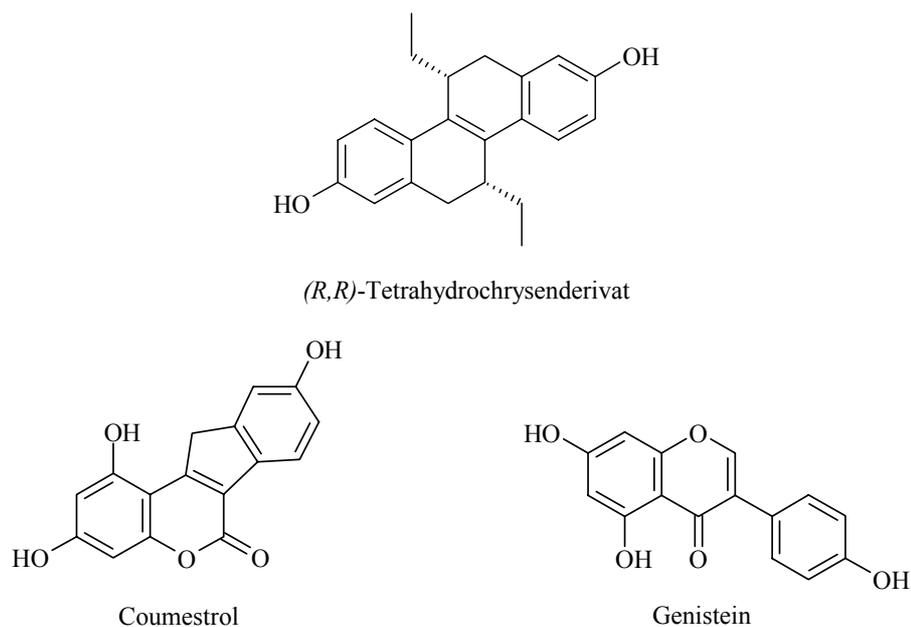
Erste synthetische nichtsteroidale Verbindungen, die Selektivität zu einem der beiden Subtypen zeigen, wurden 1999 beschrieben. Das Pyrazolderivat in Abb. 1.9 besitzt zehnmal höhere Bindungsaffinität zum ER $\alpha$  und bewirkt an diesem eine 120-fach höhere Transkriptionsaktivität als am ER $\beta$  [Sun, 108]. Auch Triarylfurane zeigen Selektivität zu ER $\alpha$ . Das in Abb. 1.9 abgebildete Furan besitzt eine 50-fach höhere Bindungsaffinität an ER $\alpha$  und zeigt nur an ER $\alpha$  Transkriptionsaktivierung [Katzenellenbogen, 109]. Sowohl aus Pyrazolen als auch aus Furanen konnte durch Einführung basischer Seitenketten, die in SERM wie TAM und RAL vorkommen, aus den agonistisch wirksamen Verbindungen Antagonisten ohne agonistische Wirkkomponente gewonnen werden (Abb. 1.9). Die Selektivität zu ER $\alpha$  bleibt auch nach dieser Modifikation erhalten, wobei sowohl Pyrazole als auch Furane an ER $\alpha$  ca. zehnmal stärker antagonistisch wirksam sind [Stauffer, 110, Katzenellenbogen, 111, 112].



**Abb. 1.9:** Strukturen ER $\alpha$ -subtypeselektiver Substanzen.

Sun [108] beschrieb 1999 mit einem (*R,R*)-Tetrahydrochrysenderivat (THC, Abb. 1.10) auch die erste ER $\beta$ -selektive Verbindung: THC hat eine 4-fach höhere Bindungsaffinität zum ER $\beta$ , wobei die unterschiedliche Wirkung an ER $\alpha$  und ER $\beta$  interessant ist. Das Chrysen ist ein reiner Agonist an ER $\alpha$ , wohingegen es an ER $\beta$  nur antagonistisch wirkt. Die antiestrogene Wirkung an ER $\beta$  wird durch einen sich von OHT und RAL unterscheidenden Mechanismus ausgeübt, da THC keine entsprechende basische, voluminöse Seitenkette besitzt. Bei diesem sogenannten „passiven“ Antagonismus kommt es daher nicht zu einer Verschiebung von Helix 12, sondern zur Stabilisierung nichtproduktiver Konformationen von Schlüsselaminosäuren in der Ligandenbindungstasche des ER $\beta$  durch THC [Shiau, 113].

Phytoestrogene wie Coumestrol und Genistein (Abb. 1.10) zeigen eine bis zu 20-fach höhere Affinität zum ER $\beta$  als zum ER $\alpha$  [Mäkelä, 114].



**Abb. 1.10:** Strukturen einiger Substanzen mit hoher Bindungsaffinität zum ER $\beta$ .

## 1.2 Der transformierende Wachstumsfaktor TGF- $\beta$

Die transformierenden Wachstumsfaktoren bilden eine Familie von über 40 strukturell ähnlichen Polypeptiden. Sie umfassen zahlreiche Unterfamilien, wie den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ), Activin und das Bone Morphogenetic Protein (BMP), die eine hohe Sequenzhomologie aufweisen und nahezu in allen zoologischen Spezies vorkommen.

Der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  wird von verschiedenen Zelltypen gebildet und reguliert Migration, Adhäsion, Vermehrung, Differenzierung und Tod der Zellen. Somit steuert TGF- $\beta$  eine Vielzahl physiologischer Prozesse von therapeutischem Interesse, wie z. B. die Angiogenese, die Wundheilung und Immunfunktionen [Gherardi, 115, Massagué, 116, 117].

Sämtliche Effekte von TGF- $\beta$  werden über spezifische membranständige Glykoproteinrezeptoren vermittelt, die wegen ihrer unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften in zwei Unterfamilien unterteilt werden (Typ-I und Typ-II-Rezeptor). Sie bestehen aus 500 bis 570 Aminosäuren und besitzen ein Molekulargewicht von 55 kDa (Typ-I) und 70 kDa (Typ-II). Beide Subtypen verfügen über Serin/Threonin-Kinase-Aktivität.

Bei der Signaltransduktion bindet TGF- $\beta$  zunächst direkt an einen TGF- $\beta$ -Typ-II-Rezeptor (Abb. 1.11, 1). Danach kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem gebildeten Komplex und dem Typ-I-Rezeptor (2), der dann in den Komplex integriert (3) und phosphoryliert (4) wird. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor phosphoryliert dann ein Rezeptor-reguliertes Smad-Protein (R-Smad) (5). Das R-Smad bindet anschließend an ein Co-Smad (Smad 4) (6). Dieser Smadkomplex wandert in den Zellkern (7) und bindet an Transkriptionsfaktoren (8), die die Genexpression regulieren (9) [Massagué, 116, Akhurst, 118, Zhu, 119].

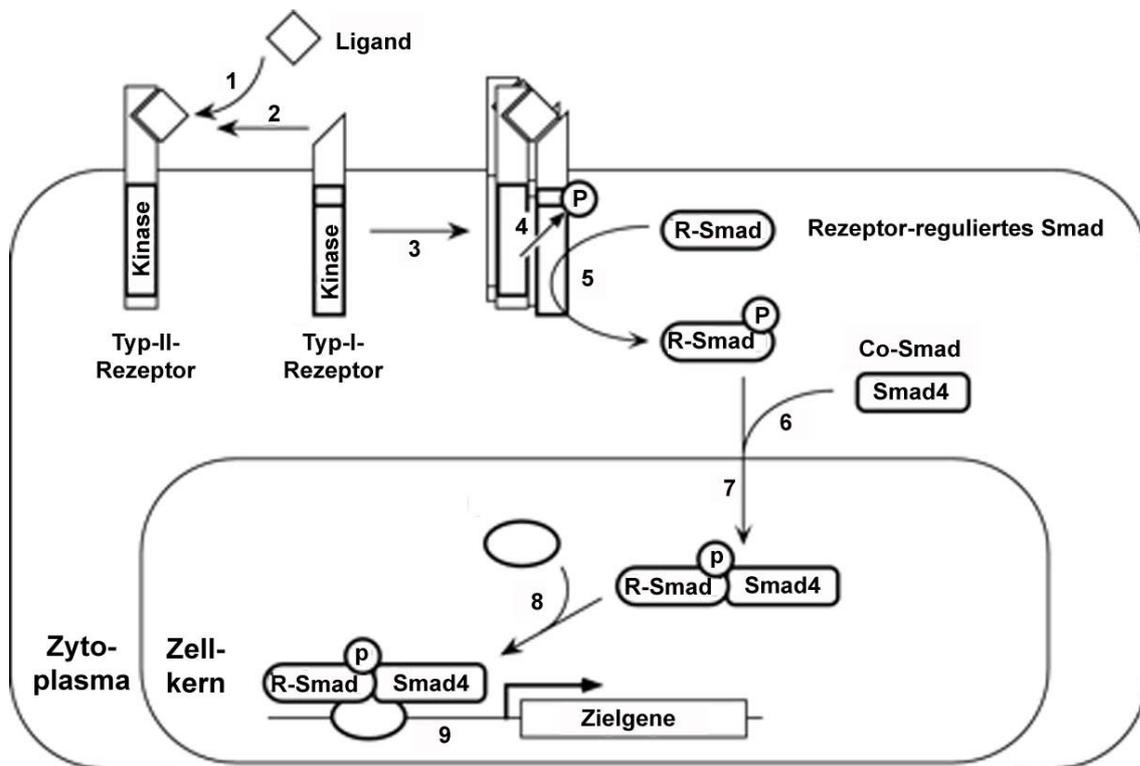


Abb. 1.11: TGF-β-Signalkaskade.

Durch Smad-Proteine werden die TGF-β-Signale letztlich bis in den Zellkern zu den entsprechenden Genen übertragen. Dabei werden drei Unterfamilien unterschieden:

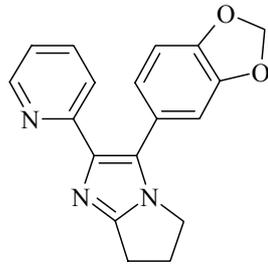
- Rezeptor-regulierte Smad-Proteine (R-Smads)
- Kooperative Smad-Proteine (Co-Smads)
- inhibitorische Smad-Proteine (I-Smads).

Inhibitorische Smad-Proteine wirken in den meisten Fällen antagonistisch zu R- und Co-Smads und schwächen die Wirkung von TGF-β ab. Sie unterbinden z. B. Wechselwirkung von R-Smads mit dem aktivierten Typ-I-Rezeptor und die Komplexbildung von R-Smads mit Co-Smads.

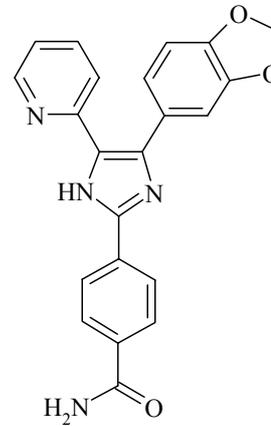
Auch andere Proteine können die TGF-β-Wirkung inhibieren. Das zytosolische Protein FKBP12 bindet an den Typ-I-Rezeptor und blockiert dadurch dessen Phosphorylierung durch den aktivierten Typ-II-Rezeptor [Chen, 120].

Erste nichtpeptidische Inhibitoren, die in die TGF-β-Signalkaskade eingreifen wurden im Jahr 2002 beschrieben [Callahan, 121]. Diese Verbindungen wurden ursprünglich als Inhibitoren der p38-Kinase entwickelt. Durch Variationen konnten daraus Verbindungen hergestellt werden, die nur am TGF-β-Typ-I-Rezeptor inhibitorisch wirken und

keine Wirkung an der p38-Kinase aufweisen. Die wirksamsten Verbindungen waren dabei ein Dihydropyrroloimidazol- und ein Triarylimidazolderivat (SB-431542, Abb. 1.12) [Callahan, 121, Laping, 122].



Dihydropyrroloimidazol



Triarylimidazol, SB-431542

**Abb. 1.12:** Inhibitoren am TGF- $\beta$ -Typ-I-Rezeptor (ALK 5).

Bei vielen Krankheiten spielt eine gestörte TGF- $\beta$ -Signaltransduktion eine wichtige Rolle. So wurde beispielsweise bei Autoimmunkrankheiten und bei Krebs ein verändertes Ansprechen auf TGF- $\beta$  unter Beteiligung von Smad-Proteinen nachgewiesen [Itoh, 123].

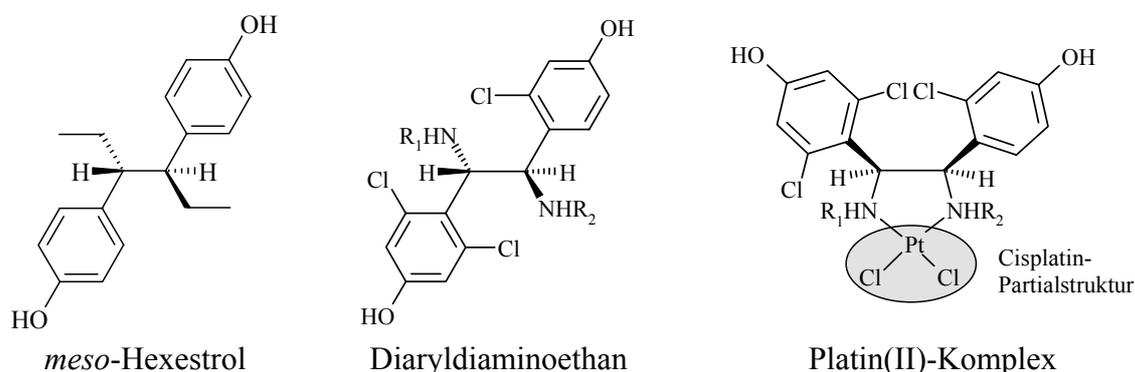
TGF- $\beta$  ist für die meisten Zellen ein Wachstumsinhibitor und unterdrückt somit auch das Tumorwachstum von Krebszellen [Zugmaier, 124]. Es wird aber auch berichtet, dass TGF- $\beta$  die Metastasierung von Tumorzellen fördert. In frühen Stadien des Tumors wird das Wachstum unterdrückt. In späteren Stadien kommt es zu genetischen und biochemischen Veränderungen in den Tumorzellen, und TGF- $\beta$  ist in der Lage das Tumorstadium zu stimulieren. Die Förderung der Invasion und Metastasierung durch TGF- $\beta$  ist dabei von größerem therapeutischem Interesse als die wachstumshemmende Rolle, da die meisten menschlichen Tumoren eine nach wie vor intakte TGF- $\beta$ -Signalübertragung aufweisen. Trotzdem müssen Therapieansätze die in die TGF- $\beta$ -Signalwege eingreifen sowohl die Förderung der Metastasierung als auch die Wachstumshemmung berücksichtigen [Akhurst, 118].

Der Einfluss einer Antiöstrogengabe auf die durch TGF- $\beta$  vermittelte Invasion und Metastasierung von Tumorzellen wurde an verschiedenen Zelllinien untersucht [Tong, 125]. Interessant sind dabei die Ergebnisse an den Brustkrebszellen MDA-MB 231 und

MCF-7. An der hormonunabhängigen Zelllinie MDA-MB 231 führt die Inkubation mit verschiedenen Antiestrogenen nicht zu einer Abnahme der Migrationsfähigkeit der Zellen, die durch TGF- $\beta$  stimuliert wurde. Bei estrogenabhängigen MCF-7 Zellen kommt es dagegen durch die Gabe von Antiestrogenen zu einer Abnahme der Migration. Diese wurde allerdings nur bei Inkubation mit dem reinen Antiestrogen ICI 182 780 beobachtet, die Behandlung mit dem SERM Tamoxifen führte nicht zu einer Inhibierung der Migration. Diese Inhibierung der Migration von ER-positiven Zellen durch Antiestrogene lässt einen Zusammenhang zwischen der TGF- $\beta$ -Signalkaskade und dem Estrogenrezeptor vermuten.

### 1.3 Problemstellung - Auswahl der Verbindungen

Die Arbeitsgruppe von Prof. Gust beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer am Estrogenrezeptor wirksamer Verbindungen. [1,2-Diamino-1,2-diarylethan]platin(II)-Komplexe wurden mit dem Ziel entwickelt, die estrogenen Eigenschaften des *meso*-Hexestrols [Wappes, 126] (Abb. 1.13) mit den zytostatischen Eigenschaften von Cisplatin zu kombinieren. Durch dieses „drug targeting“ sollte die Wirkung der zytotoxischen Platineinheit auf ER-haltige Tumoren ausgeweitet werden. Außerdem sollten die teilweise drastischen Nebenwirkungen des Cisplatin, wie nephrotoxische, myelotoxische und ototoxische Eigenschaften [Comis, 127, Günther, 128, Keller, 129] und das emetische Potential [Cubeddu, 130], reduziert werden.



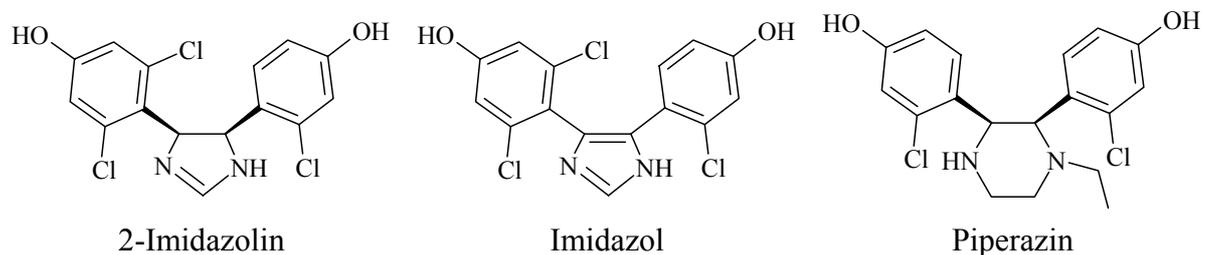
**Abb. 1.13:** Struktur von Hexestrol sowie eines Diaryldiaminoethans und eines Platin(II)-Komplexes.

Um eine Koordination eines Hexestrolderivates an Platin zu ermöglichen, wurden die beiden Ethylgruppen des Hexestrols durch Aminogruppen ersetzt und Diaryldiaminoethane erhalten (Abb. 1.13). Durch diesen Austausch gingen allerdings die estrogenen

Eigenschaften des Hexestrols zunächst verloren [von Angerer, 131, Schönerberger, 132]. Erst durch Erhöhung der Lipophilie der Diaryldiaminoethane durch Einführung von Halogenatomen wie Fluor bzw. Chlor in die Aromaten sowie *N*-Alkylierung, gelang es estrogen wirksame Ethylendiamine zu erhalten [Karl, 133, Gust, 134, 135].

Koordination dieser estrogen aktiven Neutralliganden an Platin führt zu Platin(II)-Komplexen, die eine veränderte Raumstruktur aufweisen (Abb. 1.13). Die relative Bindungsaffinität zum ER nimmt bei allen Platin-Komplexen im Vergleich zu den entsprechenden Diaminoethanen stark ab. Erstaunlicherweise sind die Platin(II)-Komplexe trotz verminderter Affinität zum ER stärker estrogen wirksam [Gust, 136].

Ausgehend von diesen zytotoxischen Platinkomplexen wurden strukturverwandte Verbindungen hergestellt, wobei der fünfgliedrige Platinchelatingring durch verschiedene Heterozyklen ersetzt wurde, um dadurch Estrogene ohne zytotoxische Eigenschaften zu erhalten. Diarylsubstituierte 2-Imidazoline, Imidazole und Piperazine (Abb. 1.14) wurden dabei als Leitstrukturen für weitere agonistisch wirksame Verbindungen identifiziert [Gust, 137].



**Abb. 1.14:** In der Arbeitsgruppe Gust auf estrogene Wirkung untersuchte Heterozyklen.

Auch diese Heterozyklen haben verglichen mit E2 nur eine geringe relative Bindungsaffinität zum ER. Wegen der veränderten Raumstruktur sind sie, wie auch die Platinkomplexe, nicht in der Lage ähnliche Wechselwirkungen mit der Ligandenbindungsdomäne des ER einzugehen. Estrogen wirksame Verbindungen lassen sich anhand ihrer Raumstruktur in zwei Gruppen einteilen:

- **Typ-I-Estrogene:** Agonistisch wirksame Verbindungen, die Estradiol strukturell ähnlich sind und somit einen ähnlichen Bindungsmodus am ER zeigen können. Dazu zählen z. B. *meso*-Hexestrol (HES), Diethylstilbestrol und 1,2-Diarylethylendiamine.

- **Typ-II-Estrogene:** Agonistisch wirksame Verbindungen, wie diarylsubstituierte Platinkomplexe, 2-Imidazoline, Imidazole und Piperazine, die nicht analog Estradiol an den ER binden können.

2-Imidazoline stellen die am stärksten wirksamen Verbindungen der in der Arbeitsgruppe Gust hergestellten Heterozyklen dar [Gust, 137, 138, 139]. In dieser Arbeit sollten daher Modifikationen an 2-Imidazolinen durchgeführt werden, wobei die Grundstruktur des 2-Imidazolinrings beibehalten werden sollte. Ziel war es weitere am Estrogenrezeptor aktive Verbindungen zu synthetisieren und pharmakologisch zu untersuchen. Zum einen sollte die agonistische Wirkung gesteigert werden. Da sich bei Piperazinen [Gust, 138] und Platinkomplexen [Gust, 136] die Einführung von Alkylsubstituenten positiv auf die estrogene Wirkung auswirkt, sollten die Effekte einer Alkylierung des Imidazolinrings an *N1* und *C2* sowie die Einbindung dieser beiden Atome in einen weiteren Ring untersucht werden. Die bisher untersuchten 4,5-Diaryl-2-imidazoline sind alle (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-konfiguriert. Die dazu diastereomeren (*4R,5R*)/(*4S,5S*)-konfigurierten 2-Imidazoline weisen eine veränderte Raumstruktur auf, deren Einfluss auf die estrogene Wirkung festgestellt werden sollte.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es agonistisch wirksamen Verbindungen in selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) bzw. Antagonisten zu überführen. Dazu sollten basische Seitenketten, die auch in SERM vorhanden sind, in die Moleküle eingeführt werden.

Als Problem aller Verbindungen mit 2-Imidazolinstruktur gilt die Hydrolyse zu ringoffenen Amiden [Watts, 140]. Daher sollte eine HPLC-Methode entwickelt werden, die es ermöglicht die Stabilität der synthetisierten 2-Imidazoline zu verfolgen. Eventuelle Hydrolyseprodukte sollten ebenfalls dargestellt werden und deren pharmakologische Wirkung ermittelt werden.

Durch eingehende Strukturuntersuchungen mit Hilfe von spektroskopischen Untersuchungen und Molecular Modeling Methoden sollte die Raumstruktur der hergestellten Verbindungen untersucht werden und die Ergebnisse zur Interpretation der pharmakologischen Untersuchungen herangezogen werden.

Aufgrund struktureller Ähnlichkeit einiger Strukturen zu inhibitorischen Verbindungen der TGF- $\beta$ -Kaskade (Kapitel 1.2) sollten mit ausgewählten Verbindungen erste Untersuchungen an der TGF- $\beta$ -Signalkaskade durchgeführt werden.