

## 1 Einleitung

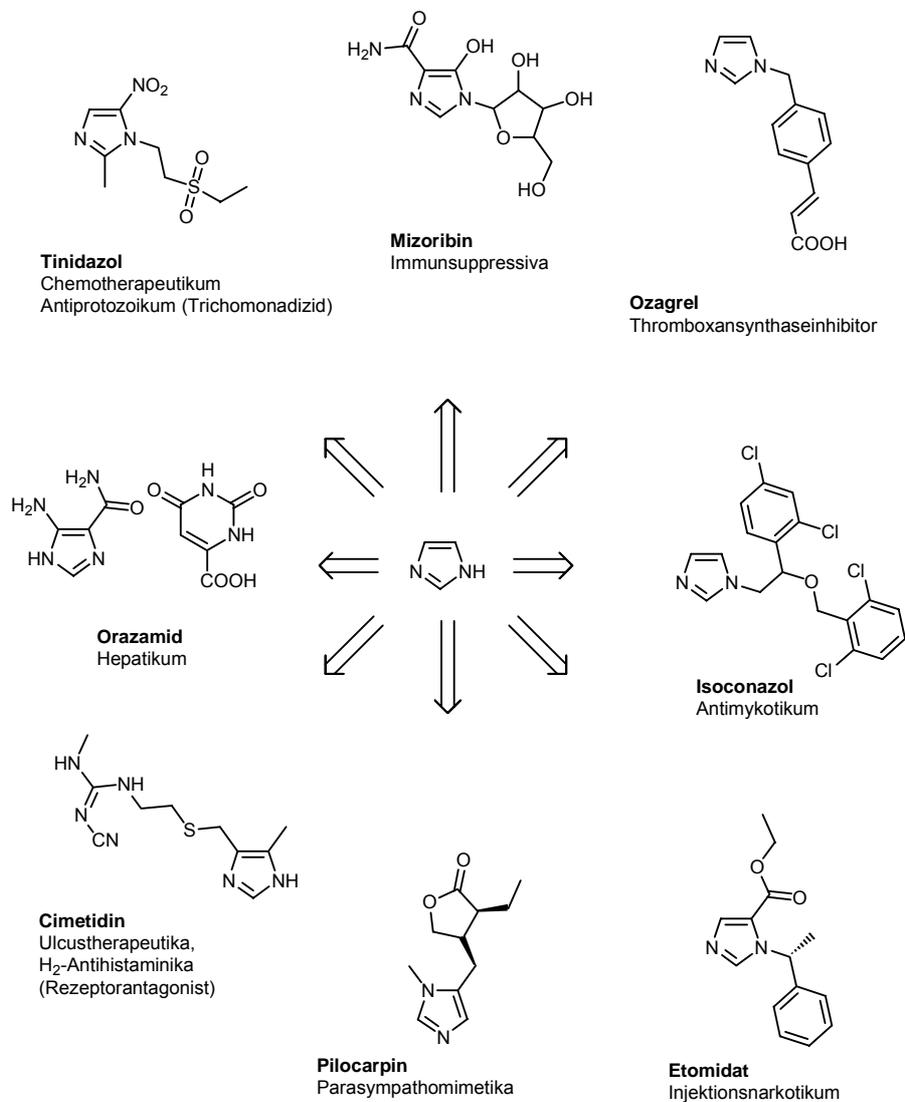
Bedingung dafür, dass eine Substanz eine Körperfunktion beeinflussen kann, ist die Kontaktaufnahme des Wirkstoffs mit den Strukturen des Körpers. Diese Erkenntnis geht auf Langley [1] 1878 und Ehrlich [2] 1913 zurück, der formulierte „die Körper wirken nicht, wenn sie nicht gebunden sind“. Diese Vorstellung hat neben dem von Emil Fischer 1894 [3] eingeführten Vergleich für die Passgenauigkeit eines Substrats zum katalytischen Zentrum eines Enzyms mit dem Bild von Schlüssel und Schloss zur Erklärung der Wirkung eines Arzneimittels beigetragen. Viele Arzneistoffe wirken als Inhibitoren von Enzymen bzw. als Agonisten oder Antagonisten von Rezeptoren. Rezeptorantagonisten und Enzyminhibitoren gehen eine Wechselwirkung mit der Bindungsstelle des endogenen Rezeptorliganden oder des Substrats ein und unterbinden die physiologische Funktion. Agonistische Substanzen entfalten ihre intrinsische Wirkung. Das Schlüssel-Schloss-Prinzip wurde von Linus Pauling [4] auf den Übergangszustand einer enzymatischen Reaktion übertragen. Koshland [5] formulierte die Theorie des „induced fit“, der induzierten Konformationsänderung des Proteinrezeptors im Anschluss an die Ligandenbindung. Inhibitoren und Liganden können nach dem Ort ihrer Bindung an der Zielstruktur in kompetitiv oder allosterisch wirkende Verbindungen eingeteilt werden. Man unterscheidet weiterhin nach der Art der Wechselwirkung zwischen reversiblen und irreversiblen Inhibitoren oder Liganden. Die Stärke einer Protein-Liganden-Wechselwirkung wird durch eine thermodynamische Gleichgewichtsgröße, die Bindungskonstante  $K_i$  beschrieben. Zu den wichtigsten Protein-Liganden-Wechselwirkungen zählen neben der kovalenten Bindung eine Reihe reversibler nicht-kovalenter Interaktionen zwischen dem Pharmakon und seinem Wirkort. Die elektrostatischen Interaktionen nehmen dabei neben der van der Waals-Bindung und den hydrophoben Wechselwirkungen breiten Raum ein. So treten Ion-Ion-Interaktionen zwischen Kat- und Anionen auf, so genannte Salzbrücken und Ion-Dipol-Wechselwirkungen zwischen ionischen Strukturen und solchen mit Partialladungen, z.B. Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen. Dagegen stellt die Wasserstoffbrückenbindung eine reine Dipol-Dipol-Interaktion dar, bei der zwei negative Partialladungen durch die positive eines Wasserstoffatoms überbrückt werden [6, 7, 8]. Welche der Interaktionen auftreten, liegt in der Struktur der Bindungsstelle und des Arzneistoffs begründet. Wasserstoffbrückenbindungen sind direktional, ihre Geometrie ist innerhalb enger Grenzen definiert. Die Atome mit negativer Partialladung nehmen Abstände von 2.8 - 3.2 Å ein. Hydrophobe Wechselwirkungen sind dagegen nicht gerichtet. Die elektrostatische Anziehung einer Salzbrücke wirkt in einem Abstand von 2.7 - 3.0 Å [6]. Die Assoziationsenergie die bei einer Protein-Ligand-Wechselwirkung frei wird, wird mit der freien Bindungsenthalpie  $\Delta G$  beschrieben, die sich aus einem enthalpischen  $\Delta H$  und einem entropischen  $T\Delta S$  Anteil zusammensetzt. Je nach Beitrag der beiden Terme zur

Bindungsenthalpie wird zwischen enthalpie- oder entropiegetriebener Bindung unterschieden. So ist der Beitrag der Bildung einer H-Brücke zur freien Bindungsenthalpie nicht konstant. Nicht nur der enthalpische Beitrag der Bindung ist von Bedeutung, sondern auch Desolvatationseffekte, die durch die Bindung des Liganden an der Bindungsstelle hervorgerufen werden. Die freigesetzten Lösungsmittelatome erhöhen den entropischen Term zu Gunsten einer stabilen Bindung. Die Protein-Ligand-Bindung führt ihrerseits zu einem Verlust an Freiheitsgraden und damit zur Absenkung der Entropie. Es resultiert eine geringere Bindungsenthalpie [6].

Es lassen sich eine Reihe von allgemeinen Aussagen zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen machen. Generell sind starke Protein-Ligand-Wechselwirkungen durch extensive lipophile Kontakte gekennzeichnet. Daher kommt der Suche nach unbesetzten Seitentaschen im Protein und deren Erfüllung durch ein entsprechendes Ligandendesign eine große Bedeutung zu. Die Einführung einer zusätzlichen H-Brücke führt nicht zwangsläufig zu einer höheren Bindungsaffinität, das „Vergraben“ einer polaren Funktion, ohne diese durch eine H-Brücke abzusättigen, aber fast immer zu einem Verlust der Bindungsaffinität. Jeder Ligand verdrängt Wassermoleküle aus der Bindungstasche bei der Proteinbindung. Da es Proteinbindestellen gibt, die nicht optimal solvatisiert werden können, können spezifische Liganden mehr H-Brücken ausbilden, als es den Wassermolekülen möglich ist. Die Bindungsaffinität solcher Liganden kann sehr hoch sein. Starre Liganden können durch den geringeren Verlust an inneren Freiheitsgraden sehr viel fester binden als flexible Strukturen. Im Allgemeinen tragen direkte Protein-Ligand-Wechselwirkungen, die nicht oder nur schlecht durch Wassermoleküle ersetzt werden können, stark zur Affinität bei [6].

Identische Grundstrukturen können durch unterschiedliche Substituenten für die jeweils benötigte Interaktion funktionalisiert werden. Der Austausch bestimmter Gruppen eines Moleküls gegen sterisch und elektronisch verwandte Gruppen wird als isosterer Ersatz bezeichnet. Bleibt dabei die biologische Wirkung weitestgehend erhalten, so spricht man von bioisosterem Ersatz. So kehren bestimmte Struktur motive in den verschiedensten Pharmakophoren wieder. So ist z.B. in einer Reihe von pharmakologischen Substanzen ein *1H*-Imidazol als Strukturelement [9] zu finden. In Schema 1 ist eine Auswahl von *1H*-Imidazol-tragenden Verbindungen gezeigt. Dabei können einem Strukturelement in verschiedenen Verbindungen unterschiedliche Funktionen zufallen, von der gezielten Änderung der dreidimensionalen Struktur und/oder der physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die Arzneistoffe kommen dabei aus den verschiedensten Anwendungsgebieten, z.B. als Antiprotozoikum, Antimykotikum, H<sub>2</sub>-Antihistaminika, Narkotikum oder Thromboxansynthaseinhibitoren. So unterschiedlich die Einsatzgebiete sind, so unter-

schiedlich ist auch die Art und Weise der Wirkmechanismen. Sie reicht von der nicht-kovalenten Interaktion mit Rezeptoren (Cimetidin) oder Enzymen (Ozagrel) bis hin zur Schädigung protozoaler DNA (Tinidazol) durch die Ausbildung kovalenter Bindungen. Nicht nur die gezielte Optimierung einer Leitstruktur führt zu einem *1H*-Imidazol als Bestandteil eines Pharmakophors, auch das Hauptalkaloid Pilocarpin aus *Pilocarpus jaborandus* trägt neben einem Butyrolactonring einen *1H*-Imidazolring. Erst durch die Protonierung im physiologischen Milieu entsteht ein mesomeriestabilisiertes Amidinium-Kation, das die Bindung zum postganglionären Muscarin-Rezeptor ermöglicht und die Wirkung des Pharmakophors entfaltet. In den vergangenen Jahren wurden für eine Vielzahl von Enzymen und Rezeptoren Liganden auch auf der Basis von *1H*-Imidazolen oder analogen stickstoffhaltigen fünfatomigen Heterocyclen entwickelt, darunter auch für den Estrogenrezeptor und die Cyclooxygenase.



Schema 1

## 1.1 *Der Estrogenrezeptor*

### 1.1.1 Allgemeines

Estrogene gehören neben Androgenen zu den Sexualhormonen, die mit Gluco- und Mineralocorticoiden sowie den Progestinen die Gruppe der Steroidhormone umfassen. Die endokrin wirksamen Estrogene sind an einer Vielzahl von Wachstums-, Differenzierungs- und Steuerungsprozessen als Signalüberträger auf die verschiedensten Gewebe des menschlichen Körpers beteiligt. Eine erste Untersuchung zur Verteilung von Tritium-markiertem  $17\beta$ -Estradiol (E2) im menschlichen Körper wurde von Jensen und Jacobsen [10] 1960 vorgenommen. Dabei wurden der Hypothalamus, der Uterus und die Vagina als Zielgewebe identifiziert. Diese Ergebnisse führten zum Verständnis der regulatorischen Funktion der Estrogene bei der Fortpflanzung und der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale der Frau [11]. Daneben wurden Estrogene in einer Reihe als „Nichtzielgewebe“ bezeichneten Organen des Körpers, wie dem kardiovaskulären System, zentralen Nervensystem oder dem Knochengewebe nachgewiesen, wobei sie zumeist an protektiven Vorgängen beteiligt sind [12]. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der Estrogene bei der Proliferation von Krebs in Geweben der Brust, den Ovarien und dem Endometrium aufgezeigt [13].

Jensen und Jacobsen beschrieben 1962 als erste die Interaktion von Estrogenen mit einem Rezeptorprotein [14]. Das später als Estrogenrezeptor  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) bezeichnete Protein wurde 1986 von Green [15] und Greene [16] aus humanen MCF-7 Zellen geklont und seine primäre Struktur aufgeklärt. 1995 wurde ein zweiter ER aus einer cDNA-Bibliothek einer Rattenprostata, die von Gustafsson beschrieben wurde, kloniert [17]. Dieser wurde als ER $\beta$  bezeichnet. Da gezeigt werden konnte, dass die codierenden DNA-Sequenzen für hER $\alpha$  auf dem Chromosom 6 und für hER $\beta$  auf dem Chromosom 14 liegen [18, 19], handelt es sich bei beiden hER um unterschiedliche Genprodukte und nicht um Splicevarianten eines Rezeptors. hER $\alpha$  wird vorwiegend in der Brustdrüse und dem Uterus, aber auch in der Leber exprimiert. In der Samenblase, der Prostata, den Eierstöcken und dem Gastrointestinaltrakt findet man dagegen vor allem hER $\beta$ . Im Kardiovaskularsystem, im Knochen, im ZNS, im Urogenitaltrakt und auch in der Brust liegen beide hER nebeneinander vor [20]. Dabei wurde beobachtet, dass beim Auftreten von Brusttumoren, sich das Verhältnis von hER $\alpha$  zu hER $\beta$ , im malignen Mammakarzinomgewebe zu Gunsten des hER $\alpha$  verschiebt [21, 22].

### 1.1.2 Aufbau der Estrogenrezeptoren

Die humanen Estrogenrezeptoren, hER $\alpha$  und hER $\beta$ <sup>1)</sup> gehören als Steroidhormonrezeptoren zu der Klasse der ligandeninduzierten Transkriptionsfaktoren [23, 24]. Obwohl es gelungen ist, in der Plasmamembran von MCF-7 Zellen [25, 26, 27] oder in der Plasmamembranfraktion von CHO-K1 Zellen, die mit cDNA von ER $\alpha$  und ER $\beta$  transient transfiziert wurden, den Rezeptor nachzuweisen [28, 29], wird der ER als ein kernständiger Rezeptor aufgefasst [30]. ER $\alpha$  ist aus 595 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 66 kDa [15, 16]. ER $\beta$  hingegen weist ein Gewicht von 59 kDa, bei 530 Aminosäuren auf [31]. Die Steroidhormonrezeptoren sind im Allgemeinen aus sechs Domänen (A - F) aufgebaut, wobei die Domänen A und B als funktionelle Einheit betrachtet werden [32, 33]. Der ER $\beta$  kann darüber hinaus noch in drei Varianten eingeteilt werden, ER $\beta$  long<sup>2)</sup> [31], ER $\beta$  short [18] und ER $\beta$  cx [34] (Abb.1).

Die sich am N-terminalen Ende befindende Region A/B weist für ER $\alpha$  und ER $\beta$  nur eine geringe Homologie von 30% zu einander auf. Dieser Bereich ist für die Interaktion mit der konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion (AF-1) verantwortlich. Sie aktiviert die Transkription, indem sie mit dem Präinitiationskomplex der Transkription oder den Koaktivatoren in Wechselwirkung tritt [35, 36]. Die ligandenunabhängige Aktivierung über AF-1 ist dabei eng mit dem Phosphorylierungsstatus des Rezeptors verbunden [37, 38, 39]. Insbesondere die Phosphorylierungsstellen Ser 118 in ER $\alpha$  [39, 40] und Ser 106 sowie Ser 124 in ER $\beta$  [41, 42] sind für die Aktivierung durch die Ras-MAP Kinase- (MAPK) Kaskade verantwortlich. Außerdem wird AF-1 für die partielle agonistische Wirkung von z.B. Tamoxifen (TAM) verantwortlich gemacht [43, 44].

Die sich anschließende Region C stellt die am höchsten konservierte Domäne zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  mit einer Homologie von 96% dar. Die Homologie zu anderen Steroidhormonrezeptoren wie hPR oder hRXR $\alpha$  beträgt 54% bzw. 53% [45, 46, 47]. Die Domäne ist für die Erkennung von bestimmten DNA-Abschnitten innerhalb des Promotors der estrogenabhängigen Zielgene, den so genannten „estrogen response elements“ (ERE) und für die Rezeptordimerisierung verantwortlich [48, 49, 50]. Die Erkennung der DNA-Sequenzen erfolgt durch zwei Zinkfinger, bei den jeweils vier Cysteinatome ein Zinkatom koordinieren. Dabei kommt es zur Ausbildung der P-Box, einer Gruppe aus den Aminosäuren E, G und A, die die spezifische Erkennung der ERE-Sequenz vermittelt [51, 52].

---

<sup>1)</sup> Im nachfolgenden Text wird der humane Estrogenrezeptor (hER) mit ER abgekürzt.

<sup>2)</sup> Im sich anschließenden Text wird die Variante des Estrogenrezeptors  $\beta$  ER $\beta$  long mit ER $\beta$  abgekürzt.

In Mutationsstudien wurden die drei Aminosäuren E, G und A durch die Glucocorticoidrezeptor-spezifischen Aminosäuren G, S und V ausgetauscht, sodass es zur Erkennung des GRE („glucocorticoid response element“) [53, 54] kam. Durch eine zweite Gruppe aus fünf Aminosäuren (P, A, T, N, O), der D-Box, wird eine unspezifische DNA-Erkennung sowie die Rezeptordimerisierung gewährleistet (Abb. 2) [51, 52].

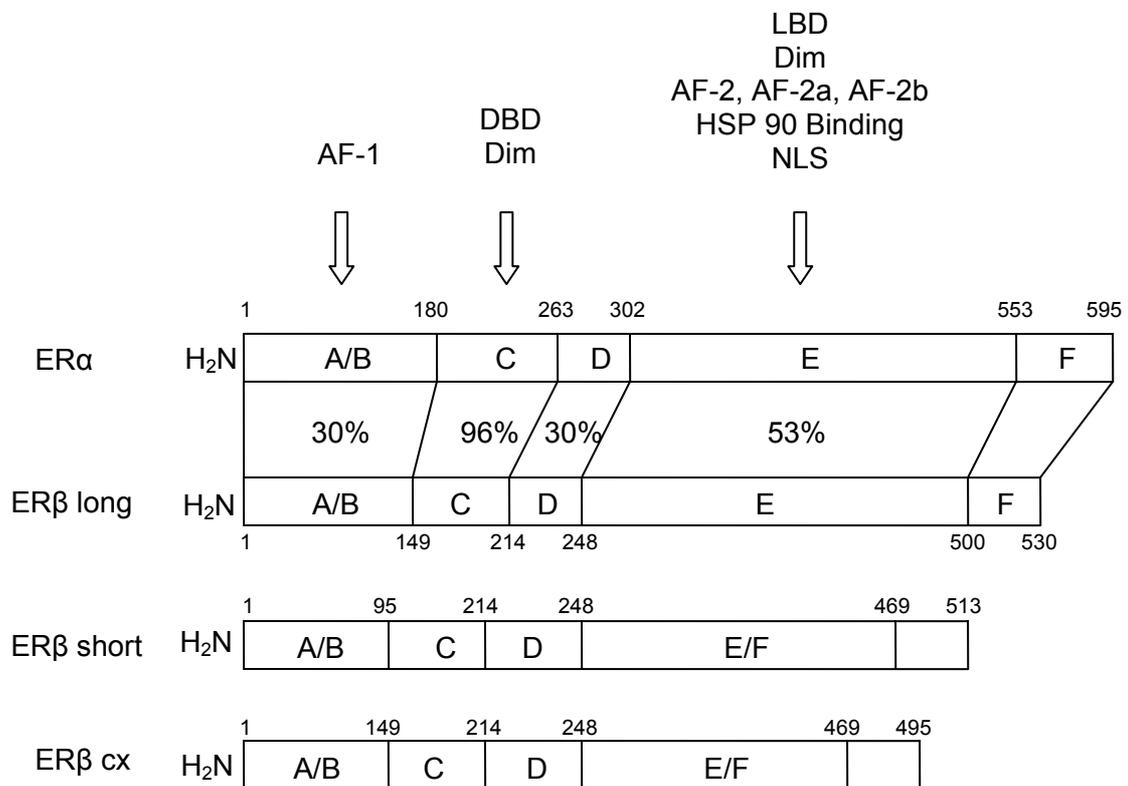


Abbildung 1. Domänen der ER mit Angabe der Aminosäurenummer für ERα [15, 16] und ERβ long [31], ERβ short [18] und ERβ cx [34] sowie der Homologie zwischen ERα und ERβ long und der funktionellen Strukturierung.

An die DNA-Bindungsdomäne (DBD) schließt sich die wenig charakterisierte „hinge“-Domäne D an. Sie ermöglicht die der Hormonbindung folgende Konformationsänderung des Rezeptors. In der Literatur ist sie aber auch als möglicher Angriffspunkt für Koaktivatoren beschrieben [55].

Die Ligandenbindungsdomäne (LBD), die Aminosäuresequenz E, vereinigt die meisten Funktionen aller Domänen auf sich. Neben der ligandenabhängigen Region AF-2 beinhaltet sie zwei ligandenunabhängige Bereiche AF-2a [56] und AF-2b [57] sowie ein „nuclear localization signal“ (NLS). Daneben gibt es noch einen Sequenzbereich zur Bindung des „heat shock protein“ (HSP90, Kap. 1.1.3) und zur Dimerisierung [58, 59]. Die Homologie in diesem Bereich beträgt zwischen ERα und ERβ 53%. Diese geringe Übereinstimmung

ermöglicht, obwohl der physiologische Ligand  $17\beta$ -Estradiol gebunden werden kann, die Entwicklung selektiver Liganden. Die Homologie zu hPR und hRXR $_{\alpha}$  beträgt nur noch 23% bzw. 27%.

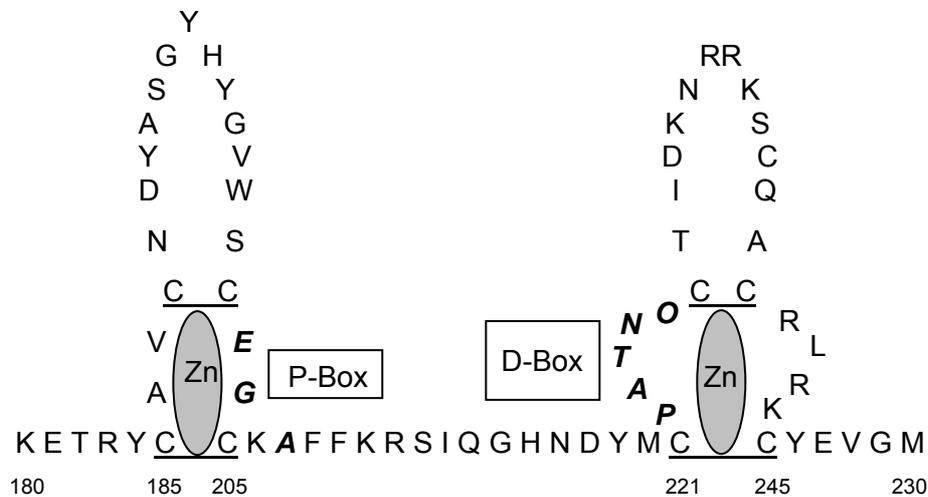


Abbildung 2. Zinkfingermotiv des humanen ER $_{\alpha}$  mit Regionen spezifischer (P-Box) und unspezifischer DNA-Erkennung (D-Box).

Die Aktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2 können zwar unabhängig voneinander die Transkription aktivieren, jedoch wird in den meisten Fällen ein synergistisches Zusammenwirken beobachtet [44, 60]. Durch dieses Zusammenwirken aktiviert der ER nach der Bindung an ERE die Genexpression [61].

Am C-terminalen Ende wird die Aminosäuresequenz durch die F Domäne abgeschlossen. Ihr konnte bisher keine eindeutige Funktion zugeordnet werden [51], sie scheint jedoch die Transaktivierungsstärke von AF-1 und AF-2 zu beeinflussen [62].

### 1.1.3 Rezeptortransformation und Genaktivierung

In der inaktiven Form, liegt der ER im Zellkern zur Stabilisierung an HSP90 assoziiert vor [63, 64, 65]. Daneben kann er aber auch an die Korepressoren SMRT oder NCoR gebunden werden. Der Ligand kann, nachdem er die Plasmamembran passiert hat, durch aktiven Transport, der durch NLS vermittelt [66] wird oder durch passive Diffusion in den Zellkern gelangen. Bindet der Ligand an dem Komplex aus ER und HSP90, so dissoziiert dieser [30]. Der neue ER-Liganden-Komplex wird seinerseits einer Phosphorylierung unterworfen, die eine Konformationsänderung des Rezeptors einleitet.

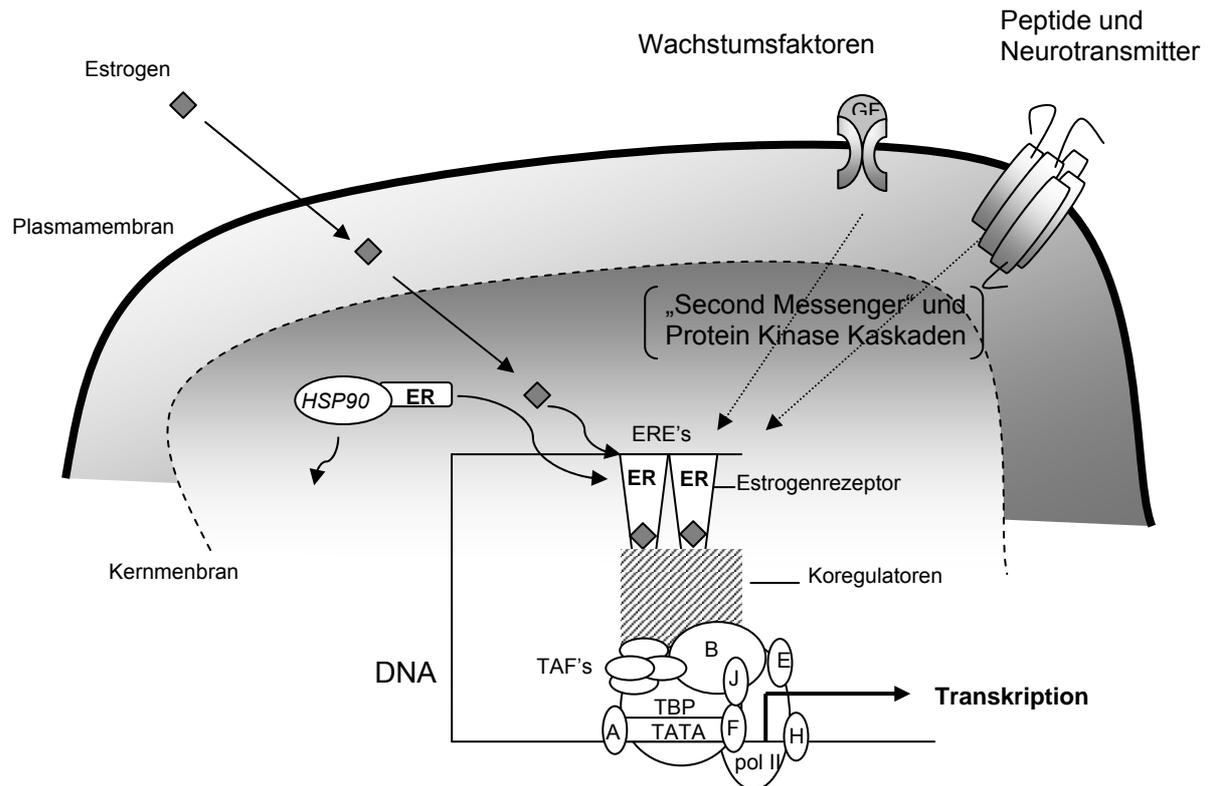


Abbildung 3. Modell der Transkriptionsaktivierung durch den Estrogenrezeptor (ER) nach Katzenellenbogen [69] und Tsai [51]. TATA: Basensequenz TATA innerhalb des Promoters; ERE: „estrogen response element“; HSP90: „heat shock protein 90“; TBP: TATA-bindendes Protein; TAF: TBP-assoziierte Faktoren; pol II: RNA-Polymerase II; A, B, E, F, H, J: Transkriptionsfaktoren (TFII) der Polymerase II.

Der gegenüber dem Grundzustand drei- bis viermal höhere Phosphorylierungsgrad [67] des mit den Liganden assoziierten ER erhöht die Affinität zu bestimmten DNA-Sequenzen und seine Transaktivierungsstärke. Die Konformationsänderung stellt die Voraussetzung für die Dimerisierung des ER dar [68]. Es werden sowohl Homo- als auch Heterodimere aus ER $\alpha$  und ER $\beta$  ausgebildet. Unter Einwirkung von Koaktivatoren binden die Rezeptor-Dimere an ihre korrespondierenden DNA-Sequenzen (ERE) und lösen die Transkription aus. Abbildung 3 zeigt das Modell der Transkriptionsaktivierung nach Katzenellenbogen [69] und Tsai [51]. Neben der DNA-Sequenz des ERE bindet der Komplex aus ER-Dimer und einer Reihe weiterer Proteine an eine als TATA-Box bezeichnete weitere DNA-Sequenz, die 25 - 30 Basenpaare oberhalb des Startpunkts der Transkriptionssequenz lokalisiert ist [51]. Dazu bildet sich ein Proteinkomplex aus einem TATA-bindenden Protein (TBP) und mehreren TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammensetzt und als Transkriptionsfaktor TFIID bezeichnet wird. Er bindet innerhalb des Promotors an die TATA-Sequenz [70]. Durch weitere Koordination mit TFIIB, TFIIF und RNA-Polymerase II [69] bildet sich der minimale

Präinitiationskomplex der Transkription. Der Faktor TFIIB geht dabei keine Wechselwirkungen mit der AF-2 des ER [73, 74] ein, sondern mit TBP, TFIIF, der RNA-Polymerase II [70, 71, 72] sowie der DNA ober- und unterhalb der TATA-Box. Die RNA-Polymerase synthetisiert aus diesem Initiationskomplex heraus die mRNA, die in die Translation in den Ribosomen einmündet.

Neben dem klassischen Modell der E2-ER-Komplex-aktivierten Genexpression durch die Bindung des ER $\alpha$ -Dimers an das „estrogen response element“ durch die synergistische Wirkung aus AF-1 und AF-2 [61] wurde auch eine Transkriptionsaktivierung durch ER $\beta$  am Zielgen, vermittelt durch ERE, beobachtet [18, 75]. Darüber hinaus konnte die Signaltransduktion über den AP-1 Bereich eines Reporterkonstrukts mit einem E2-ER $\alpha$ -Komplex vermittelt werden. Der entsprechende E2-ER $\beta$ -Komplex war inaktiv [76]. Mit Wirkstoff-ER $\beta$ -Komplexen wurde eine Genaktivierung an der AP-1 site induziert [76 - 78]. Daneben wurde eine weitere expressionsinduzierende Wirkung verschiedener Gene durch eine ER-Sp1-Protein-Interaktion mit GC-reichen Sequenzen des Promotors beobachtet. Es zeigte sich, dass die Interaktion nur durch die AF-1 Region im ER $\alpha$  vermittelt wird [79] (Abb. 4).

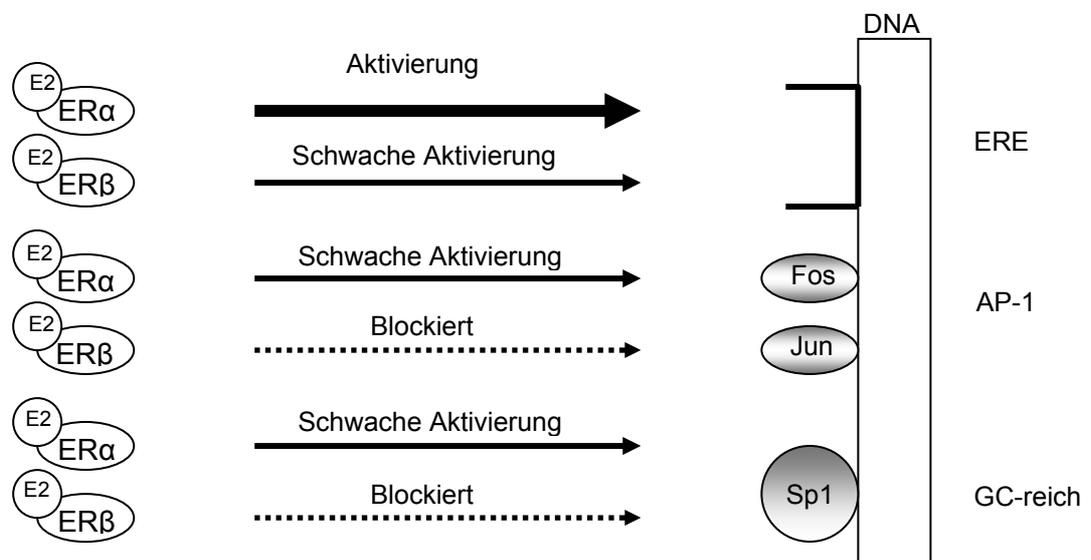


Abbildung 4. Möglichkeiten der Signaltransduktion nach der Bindung des 17 $\beta$ -Estradiols an ER $\beta$  oder ER $\alpha$ .

#### 1.1.4 Koregulatoren und Wachstumsfaktoren

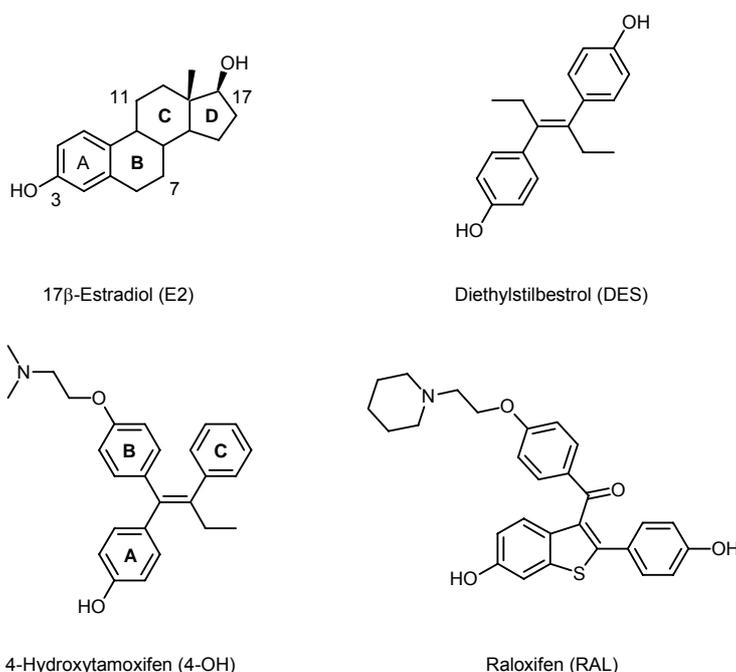
Für den ER $\alpha$  sind in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Koaktivatoren identifiziert worden [80]. Dabei handelt es sich um Proteine, die direkt mit den kernständigen Rezeptoren in Wechselwirkung treten können und dadurch die Transkription steigern [74]. Sie dienen als Bindeglied zwischen Rezeptor mit gebundenem agonistisch wirkenden Ligand und den Transkriptionsfaktoren des Präinitiationskomplexes [74, 81]. Viele Koaktivatoren zeichnen eine intrinsische Histonacyltransferase (HAT)-Aktivität [82] aus. Histonacyltransferase acyliert Lysinreste am N-terminalen Ende der Histone 3 und 4 im Chromatingerüst. Dies schwächt die Assoziation der Histone zur DNA, die Bildung des Präinitiationskomplexes wird erleichtert und die Transkriptionsaktivierung durch die RNA Polymerase II ermöglicht [83, 84, 85, 86, 87]. Die Wechselwirkung zwischen einem Agonist-ER-Komplex und den Koaktivatoren wird auf Seiten des ER durch die AF-2 der LBD und bei den Koaktivatoren durch die NR-Box vermittelt [88]. Die NR-Box ist eine leucinreiche Sequenz mit dem Motiv LXXLL. Die Kontaktoberfläche der LBD wird durch die Helices 3, 4, 5 und 12 gebildet [89, 90, 91, 92, 93]. Sie unterscheidet sich für ER $\alpha$  und ER $\beta$  [94]. Die Koaktivatoren reagieren nicht mit einem un- oder antagonistisch gebundenem ER.

Eine Gruppe von Mediatoren, die als Korepressoren bezeichnet wird, wie z.B. „silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors“ (SMRT) oder „nuclear receptor corepressor“ (NCoR) binden ebenfalls über das LXXLL-Motiv der Koaktivatorenbindungsstelle des ER und halten den ER, aber auch andere nukleäre Rezeptoren bei Abwesenheit eines Liganden im aktivierten Zustand. Die Korepressoren können mit den Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung treten und durch einen bisher noch nicht verstandenen Mechanismus [55, 95] die agonistische Wirkung von Antiestrogenen wie Tamoxifen unterdrücken. Die Assoziation zwischen Korepressoren und Rezeptor erfolgt vor allem mit dem ungebundenen ER und wird durch die Entfernung der Helix 12 oder durch die Zugabe von Rezeptorantagonisten [96] verstärkt. Im Gegensatz zum antagonistengebundenen Rezeptor interagieren die klassischen Korepressoren nicht mit einem Komplex aus Agonist und Rezeptor.

Die Transkriptionsaktivität wird durch die Phosphorylierung des ER moduliert. Die Phosphorylierung ihrerseits wird durch verschiedene Signalwege gesteuert. Wachstumsfaktoren wie z.B. „epidermal growth factor“ (EGF) [97 - 102], „insulin-like growth faktor 1“ (IGF-1) [38], „transforming growth factor  $\alpha$ “ (TGF $\alpha$ ) [98, 99], Dopamin [100, 101] und cAMP [38, 101] können den ER in Abwesenheit eines Agonisten aktivieren.

### 1.1.5 Liganden des Estrogenrezeptors

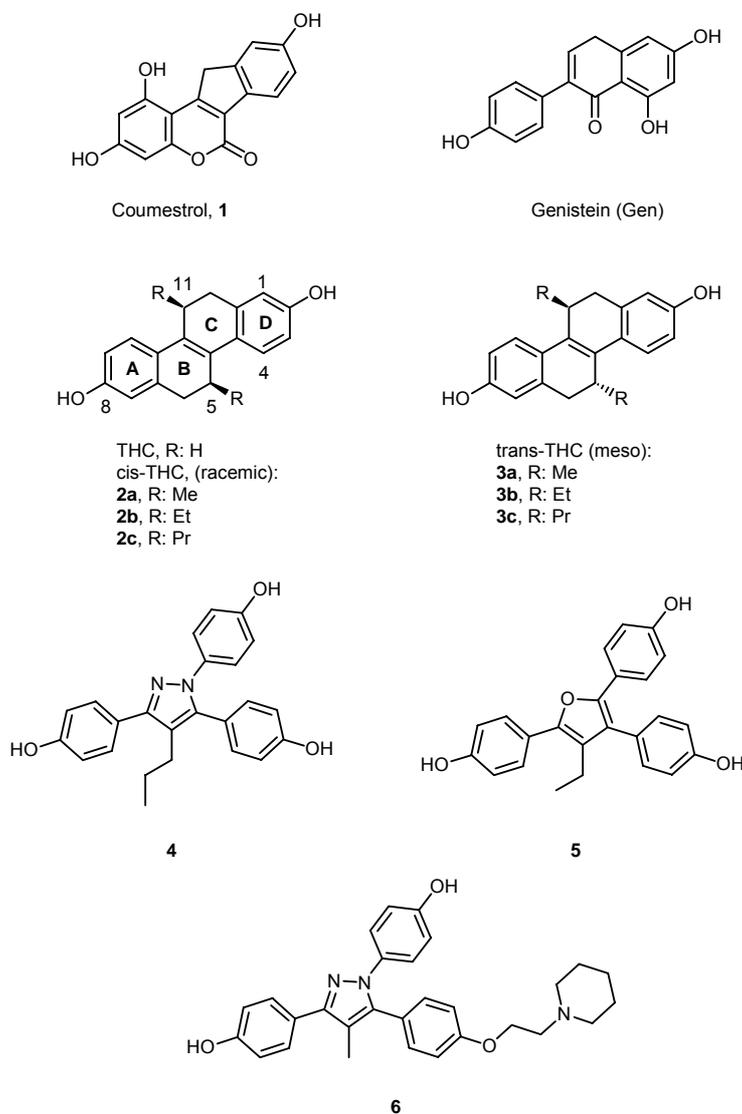
Neben dem physiologischen Ligand des Estrogenrezeptors 17 $\beta$ -Estradiol (E2) sowie seinen Metaboliten wie z.B. Estron, sind viele weitere agonistisch wirksame Verbindungen bekannt, z.B. Diethylstilbestrol (DES). E2 [17, 18] besitzt ungefähr die gleiche Bindungsaffinität zu beiden Rezeptorsubtypen. Aber auch für viele natürliche und synthetische estrogenwirksame Substanzen konnte keine Rezeptorselektivität nachgewiesen werden [103]. Eine weitere Gruppe von Liganden, die selektiven Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM), zeichnen sich durch eine Gewebsspezifität aus. So z.B. 4-Hydroxytamoxifen (4-OH) der aktive Metabolit des Tamoxifens (TAM), der in der Behandlung und der Prävention von Mammatumoren eingesetzt wird. Er wirkt wie Raloxifen (RAL), in der Brust als Antiestrogen, auf Knochen, Fettstoffwechsel und Endometrium üben sie dagegen eine estrogenartige Wirkung aus. Raloxifen wird zur Behandlung und zur Prophylaxe der Osteoporose eingesetzt (Schema 2).



Schema 2

Natürlich vorkommende Phytoestrogene wie Coumestrol (**1**) oder Genistein (Gen) haben eine Subtypspezifität [104]. So zeigen **1** und Gen eine bis zu 20-fach höhere Affinität zum ER $\beta$  als zum ER $\alpha$ . Eine besonders interessante Substanzklasse stellen die 5,11-Dialkyl-5,6,11,12-tetrahydrochryse (**2a – c**, **3a - c**) [105, 106] dar, die je nach Enantiomer und Kettenlänge der Alkylfunktion unterschiedliche Affinitäten und agonistische bzw. antagonistische Wirkung besitzen. Das (5*R*,11*R*)-Enantiomer, die Verbindung **2b**, hat eine 6-fach höhere Bindungsaffinität zum ER $\beta$ , wobei es am ER $\beta$  ein reiner Antagonist ist. Am

ER $\alpha$  ist es ein reiner Agonist. Das (5*S*,11*S*)-Enantiomer **3b** zeigt dagegen eine 16-fach höhere Affinität zum ER $\beta$  bei niedrigeren Absolutwerten. In den letzten Jahren wurden hoch selektive nicht-steroidale Substanzen entwickelt, die ihre subtypenselektive Wirkung sowohl bei der Bindungsaffinität als auch in der Transkriptionsaktivierung zeigen. Zu ihnen gehören z.B. triarylierte 1*H*-Pyrazole (**4**) [107, 108] und Furane (**5**) [109]. Das 1*H*-Pyrazolderivat **4** besitzt einen Quotienten der ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Affinitäten von 390, das Furan **5** von 48. Bei der Transkriptionsaktivierung zeigen sie beide eine agonistische Wirkung. Durch die Einführung einer Piperidinylethoxy-Seitenkette an einem analogen 1*H*-Pyrazol (**6**) wurde eine antagonistische Wirkung, bei einer 220-fach höheren Affinität zum ER $\alpha$  erzielt [110, 111, 108] (Schema 3). Ähnliches wurde auch für das Furan beobachtet [112].



Schema 3

### 1.1.6 Interaktion zwischen dem physiologischen Ligand E2 und der LBD des ER

Die Lage und Orientierung des physiologischen Liganden E2 in der Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors wurde 1997 von Brzozowski [89] durch Kokristallisation der LBD des ER $\alpha$  mit E2 aufgeklärt. Die Hydroxylgruppe in der Position 3 ist dabei in Richtung der Aminosäuren Glu 353 und Arg 394 orientiert und bildet mit beiden sowie einem inkorporiertem Wassermolekül Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Hydroxylgruppe in der 17 $\beta$ -Position bildet eine weitere Wasserstoffbrücke zum Imidazolring des His 524 aus. Der Gonangrundkörper geht mit den apolaren Gruppen sowohl auf der  $\alpha$ -, als auch auf der  $\beta$ -Seite van der Waals-Wechselwirkungen ein. Die Ligandenbindungstasche ist dabei im ER $\alpha$ -E2-Komplex durch die Helix 12 verschlossen. Sie tritt mit den Helices 3, 5, 6 und 11 in Kontakt (Abb. 5). Die Helix 12 hat aber selbst keinen Kontakt zum Liganden. Die präzise Ausrichtung der Helix 12 ist die Voraussetzung für die Ausbildung einer kompetenten AF-2 Region. Sie ist verantwortlich für die Transkriptionsaktivierung und die Interaktion mit den Koaktivatoren [93]. Der Verlust dieser Region durch Mutation führt zu einem funktionsunfähigen Rezeptor.

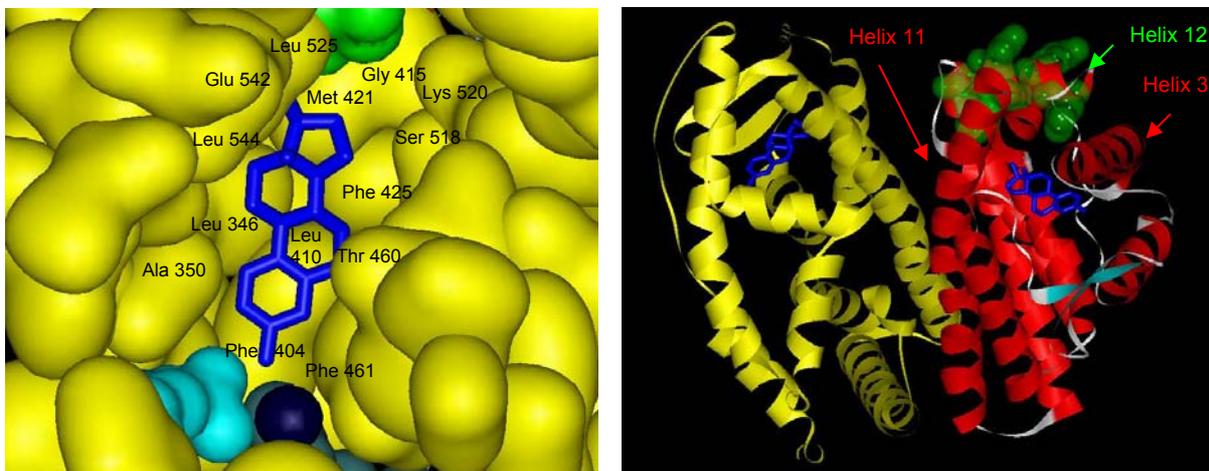


Abbildung 5. 17 $\beta$ -Estradiol (E2) in der Ligandenbindungsdomäne (LBD, gelb) des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) nach Brzozowski [89]. Es treten Wasserstoffbrückenbindungen von den Hydroxylgruppen in den Positionen 17 $\beta$  und 3 zum His 524 (grün) bzw. Glu 353 (türkis) und Arg 394 (grau) sowie einem Wassermolekül (dunkelblau) auf (links). ER $\alpha$ -Dimer (gelb/rot) mit E2 (blau). Die Helix 12 (grün) verschließt die LBD und tritt mit der Helix 3 in Kontakt. Die Helix 11 bildet das Verbindungsstück zum zweiten ER $\alpha$  (rechts).

### 1.1.7 Nicht-steroidale Agonisten

Der nicht-steroidale Agonist Diethylstilbestrol bindet analog dem E2 in der Bindungstasche des ER $\alpha$  [93]. Obwohl der O-O Abstand der phenolischen Hydroxylgruppen im DES 1.2 Å länger ist als der entsprechende Abstand im E2, kommt es dennoch zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum His 524 sowie Glu 353 und Arg 394. DES geht aufgrund der zwei Phenole mehr hydrophobe Wechselwirkungen mit der LBD des ER $\alpha$  ein als E2. Darüber hinaus erfüllen die Ethylgruppen hydrophobe Seitentaschen der LBD, die nicht dem E2 zugänglich sind. Diese Taschen liegen ober- und unterhalb der Molekülebene des E2. Auch bei diesen Liganden verschließt die Helix 12 die Bindungstasche (Abb. 6).

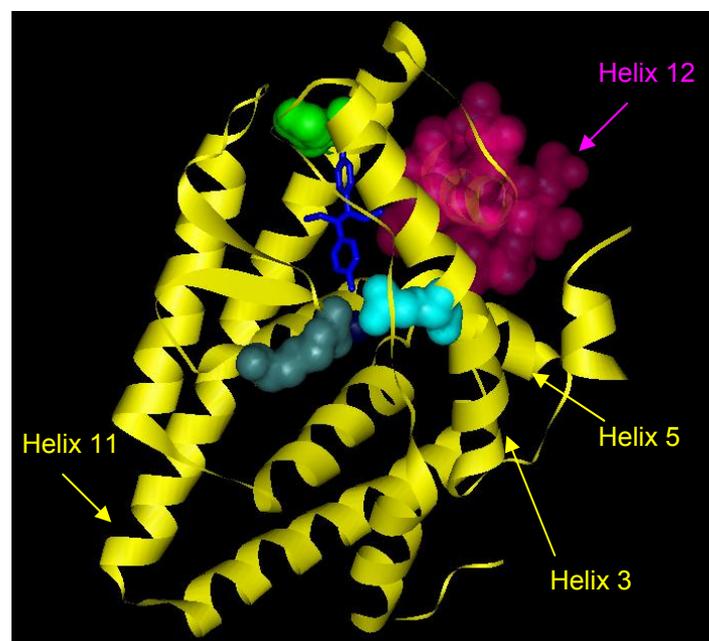


Abbildung 6. Orientierung des nicht-steroidalen Agonisten Diethylstilbestrol (DES) in der LBD im ER $\alpha$  nach der Röntgenkristallstruktur von Shiao [93]. Es treten Wasserstoffbrückenbindungen von den phenolischen Hydroxylgruppen zu His 524 (grün) bzw. Glu 353 (türkis) und Arg 394 (grau) sowie einem Wassermolekül (dunkelblau) auf. Die Helix 12 (violett) verschließt die LBD und tritt mit der Helix 3 und 5 in Kontakt.

### 1.1.8 „Aktive“ antagonistische Wirkung

1998 gelang es Shiao [93] eine Röntgenkristallstruktur des kokristallisierten 4-Hydroxytamoxifen in der LBD des ER $\alpha$  anzufertigen. Auch hier erfolgt die Bindung von 4-OH analog E2 bzw. DES über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen von der phenolischen Hydroxylgruppe des A-Rings zu den Aminosäuren Glu 353, Arg 394 sowie

einem Wassermolekül. Da der **C**-Ring keine Hydroxylgruppe trägt, wird auch keine H-Brücke zum His 524 ausgebildet. Die Affinität sowie die Orientierung von 4-OH werden im Weiteren durch die Seitenkette am **B**-Ring bestimmt. Die Dimethylaminofunktion bildet mit der Carboxylatgruppe des Asp 351 eine Salzbrücke aus. Die flexible Ethoxy-Seitenkette ermöglicht eine Vielzahl von van der Waals-Kontakten zu den umliegenden Aminosäuren (Abb. 7). Der **C**-Ring ragt, aufgrund der fast um 90° gedrehten Ethylgruppe am Ethen im Vergleich zur Ethylgruppe des DES, tiefer in die Bindungstasche, als die analoge Phenolgruppe des DES [93].

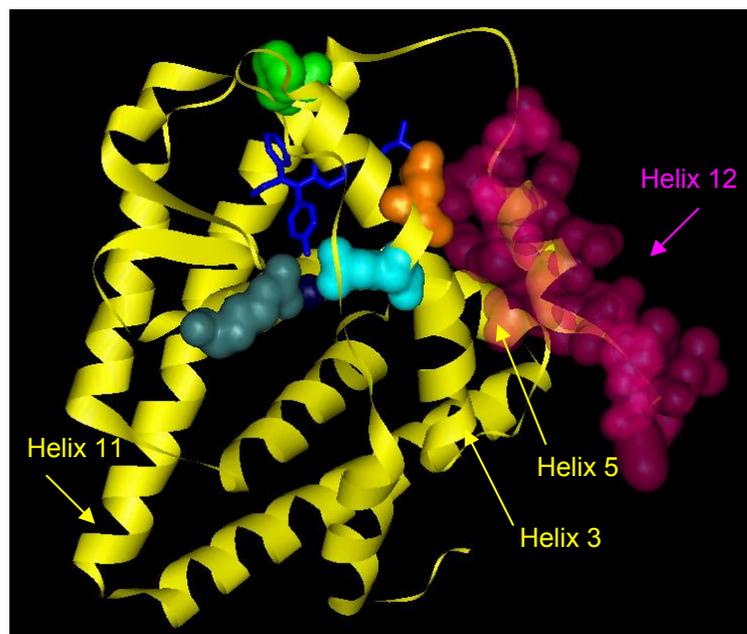


Abbildung 7. Röntgenkristallstruktur des kokristallisierten 4-Hydroxytamoxifen (4-OH, blau) in der LBD des ER $\alpha$  nach Shiau [93]. Es treten Wasserstoffbrückenbindungen von der phenolischen Hydroxylgruppe des **A**-Rings zu den Aminosäuren Glu 353 (türkis), Arg 394 (grau) sowie einem Wassermolekül (dunkelblau) auf. His 524 (grün) bildet keine H-Brücke mehr aus. Die Helix 12 (violett) verschließt nicht mehr die Bindungstasche und interagiert mit der Koaktivatorbindungsstelle. Salzbrücke zwischen Asp 351 (orange) und N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

Die antiestrogene Wirkung des Komplexes aus 4-OH und ER $\alpha$  beruht auf der Dimethylaminoethoxy-Seitenkette. Ihr Volumen und ihre Interaktion mit Asp 351 verhindert, dass die Bindungstasche durch die Helix 12 verschlossen wird [113]. Dieses Ergebnis konnte durch Mutationsexperimente untermauert werden [114]. Dadurch wird die Ausbildung einer funktionstüchtigen AF-2 Region verhindert. Darüber hinaus interagiert die Helix 12 in ihrer neuen Position mit der Koaktivatorbindungsstelle des ER $\alpha$ . Die Fähigkeit eines Liganden eine partialagonistische Wirkung zu entfalten wird durch die vom ihm verursachte Abschirmung von Asp 351 bestimmt.

### 1.1.9 „Reiner“ Antagonismus

Eine Reihe von Verbindungen zeichnet sich dadurch aus, dass ausschließlich eine antagonistische Wirkung vermittelt wird. Sie sind charakterisiert durch ein steroidales Grundgerüst und tragen in den Positionen 7 $\alpha$  oder 11 $\beta$  eine 15-atomige Kette bzw. para-alkoxylierte Aryle als Seitenkette. Die Seitenkette muss keine basische Funktion enthalten. Zu diesen Verbindungen zählen RU 39 411, RU 58 668, ICI 182 780 (Faslodex) und ICI 164 384. Pike klärte 2001 die Röntgenkristallstruktur von ICI 164 384 in der LBD des ER $\beta$  der Ratte auf [96]. Der ER $\beta$  der Ratte ist grundsätzlich analog zum humanen ER $\beta$  aufgebaut. Es werden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Glu 260 und Arg 301 von der Hydroxylgruppe in der Position 3 aus sowie von der OH-Gruppe in 17 $\beta$  zu His 430 gebildet. Die Seitenkette ragt über die für Antagonisten wichtige Seitentasche hinaus und nimmt die Position der Helix 12 ein (Abb. 8). Dabei geht das ternäre Amin der Seitenkette eine Bindung mit der Koaktivatorbindungsstelle ein und verhindert die stabile Orientierung der Helix 12.

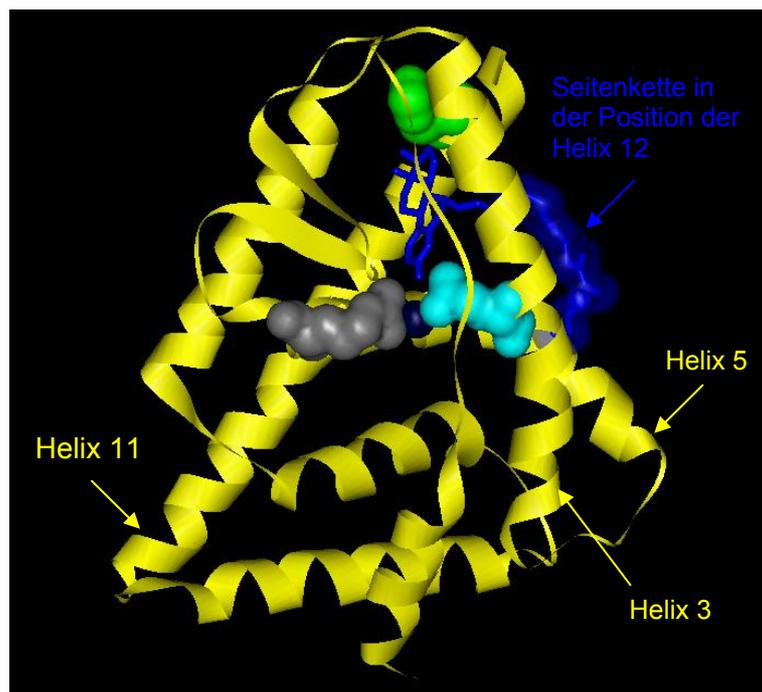


Abbildung 8. Kokristallisierte LBD des ER  $\beta$  der Ratte mit ICI 164 384 (blau) [96]. Es kommt zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Glu 260 (türkis), Arg 301 (grau) und His 430 (grün). Die Seitenkette in der Position 11 $\beta$  reicht über die Seitentasche hinaus (blaue Kalotten) und verdrängt die Helix 12 aus ihrer Position.

Die Ausbildung einer kompetenten AF-2 Region [96] ist nicht möglich. Darüber hinaus wird diskutiert, ob nun freiliegende Aminosäuren mit Korepressoren interagieren können [115]. Des Weiteren wurde festgestellt, das ICI 164 384 die Rezeptordimerisierung beeinflusst [116].

### 1.1.10 „Passiver“ Antagonismus

Alle bisher betrachteten antagonistisch wirkenden Verbindungen zeichnen sich im Gegensatz zu dem physiologischen Ligand E2 und nicht-steroidalen Liganden, wie z.B. DES, durch eine Seitenkette aus. Wie in den Röntgenkristallstrukturen von antagonistisch wirksamen Verbindungen in der LBD des ER in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, z.B. an 4-OH-ER $\alpha$  [93], RAL-ER $\alpha$  [89] oder ICI 164 384-ER $\beta$  [96], ragt die Seitenkette aus der E2-Bindungstasche durch eine Öffnung zwischen den Helices 3, 5, 6 und 11 in eine weitere Kavität der LBD. Die Helix 12 wird dadurch gehindert, ihre agonistgebundene Konformation anzunehmen. Während die Helix 12 bei der Interaktion mit 4-OH und RAL Wechselwirkungen mit der Bindungsstelle der Koaktivatoren eingeht und dort die NR-Box Interaktion imitiert, bindet die Seitenkette von ICI 164 384 direkt an der Koaktivatorbindungsstelle. Vor diesem Hintergrund nimmt das (5*R*,11*R*)-Enantiomer des 5,11-cis-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol (**2b**) eine besondere Stellung ein, es verhält sich am ER $\alpha$  als Agonist und in der Interaktion mit dem Subtyp  $\beta$  als Antagonist [117, 105]. Dabei verfügt es über keine den Verbindungen 4-OH, RAL und ICI 164 384 analoge Seitenkette. In der Röntgenstrukturanalyse zeigte sich, dass **2b** im ER $\alpha$  [106] eine dem E2 analoge Position in der LBD einnimmt. Dabei wurden die zu erwartenden Wasserstoffbrücken von der Hydroxylgruppe an Ring **A** zu Glu 353 und Arg 394 sowie einem Wassermolekül und aus der Position 8 zu His 524 ausgebildet. Die Helix 12 nimmt die gewohnte agonistgebundene Konformation ein. In der LBD des ER $\beta$  [106] dagegen wurde keine Interaktion der Hydroxylgruppe in der Position 8 mit dem His 524 analogen His 475, sondern zu Gly 472 vorgefunden. H-Brücken zu Glu 305 (Glu 353) und Arg 346 (394) treten aber weiterhin auf. Das gesamte Tetrahydrochrysenengerüst ist jedoch durch die sterische Interaktion der Ethylgruppe am Ring **B** um 5 Å in Richtung der Seitentasche des Asp 351 ( $\beta$ -Kanal) verschoben. Daraus resultiert eine Verschiebung der Aminosäuren um Leu 476 und Met 479, sodass eine konstruktive Wechselwirkung mit der Helix 12 nicht mehr möglich ist. Die Helix 12 nimmt keine agonistgebundene Konformation ein, sie bindet aber auch nicht an die Koaktivatorbindungsstelle. Eine ähnliche Stellung nimmt die Helix 12 im Genistein-ER $\beta$ -Komplex ein [118]. Das weniger sterisch gehinderte dimethylierte **2a**-Derivat verhält sich dagegen am ER $\beta$  als partieller Agonist [105].

## 1.2 Die Cyclooxygenase

### 1.2.1 Allgemeines

Die Cyclooxygenase (Prostaglandinendoperoid-H-Synthase) stellt ein zentrales Enzym im Arachidonsäurestoffwechsel dar. Es katalysiert die Konversion der Arachidonsäure (AA) mit  $O_2$  zu  $PGH_2$ .  $PGH_2$  ist die Vorstufe der biologisch aktiven Prostacycline (6-oxo- $PGF_{1\alpha}$ , 6-oxo- $PGE_1$ ), Prostaglandine ( $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGD_2$ ) und Thromboxane ( $TxA_2$ ,  $TxB_2$ ). Die Cyclooxygenase besitzt neben der eigentlichen Cyclooxygenase-Aktivität noch eine glutathionabhängige Hydroperoxidase-Aktivität (Abb. 9). Beide Aktivitäten werden durch Häm vermittelt. Die Freisetzung der Arachidonsäure erfolgt aus den Membranphospholipiden durch hydrolytische Spaltung der Esterbrücken an der C(2)-Position. Diese Reaktion wird durch die hochmolekulare, cytosolische und  $Ca^{2+}$ -abhängige Phospholipase  $A_2$  vermittelt [119, 120].

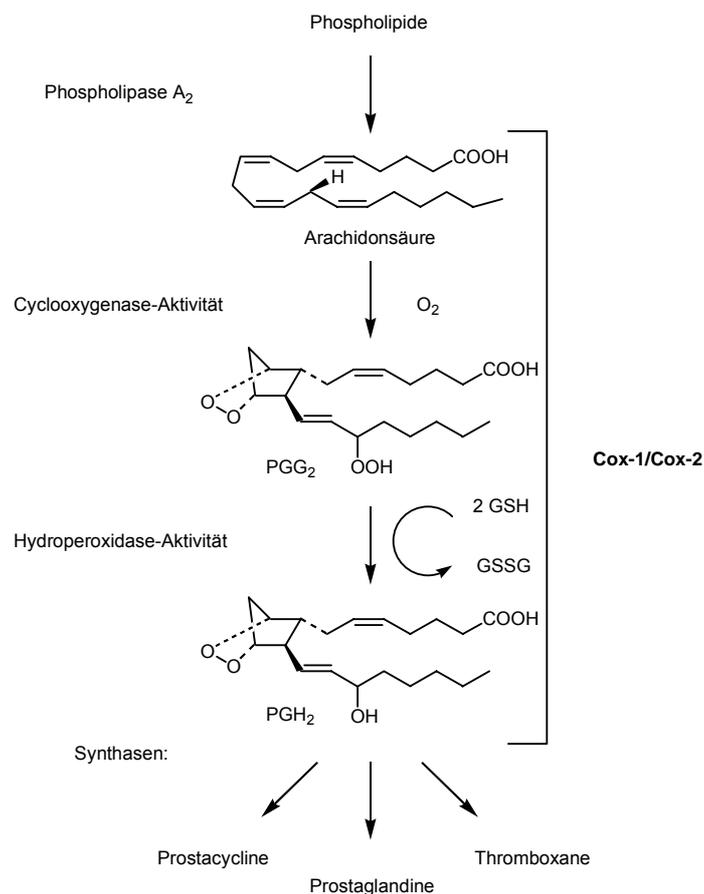


Abbildung 9. Cyclischer Weg des Arachidonsäurestoffwechsels. Arachidonsäure wird durch Lipasen aus den zellulären Membranen freigesetzt und durch die Cyclooxygenase- und Hydroperoxid-Aktivität der Cox zum  $PGH_2$  verstoffwechselt. Die Oxidation von Glutathion (GSH) zu GSSG liefert die benötigten Elektronen für die Reduktion der Hydroperoxidgruppe.  $PGH_2$  wird durch Synthesen zu Prostacyclin ( $PGI_2$ ), Prostaglandinen und Thromboxan ( $TxA_2$ ) weiter metabolisiert.

Die Lipase ist an cytosolischen Grenzflächen wie dem endoplasmatischen Reticulum (eR) oder der Kernmembran assoziiert. Die nicht-pankreatische,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Typ II Phospholipase  $A_2$  setzt AA dagegen aus der Plasmamembran frei. Die Phospholipaseaktivität setzt als Reaktion auf die Stimulation des Zielgewebes durch relevante Cytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone ein [119].

### 1.2.2 Cyclooxygenase-1 und -2

Bis 1989 war nur eine Form der Cyclooxygenase (Cox-1) bekannt, die als konstitutiv betrachtet wird. Zu dieser Zeit wurde von Simmons [121] eine neue, durch die Entdeckung der korrespondierenden mRNA in v-src-transformierten Hühnerembryofibroblasten, Cyclooxygenase cDNA identifiziert. Unabhängig davon isolierten Kujubu und Herschman [122] 1991 eine cDNA aus 3T3 Fibroblasten nach Phorbol esterbehandlung. Das darin codierte Protein besitzt eine 60% Homologie zur Isoform 1 und wird als induzierbare Form, Cox-2 bezeichnet. Es unterscheidet sich bei starker struktureller Ähnlichkeit durch ein anderes Expressionsmuster und abweichende zellphysiologische Funktionen. Der Grund für das Auftreten von zwei Isoformen ist unbekannt. Cox-1 und Cox-2 werden häufig in den gleichen Zellen coexprimiert, greifen aber möglicherweise in Abschnitte von einander unabhängiger Prostanoidbiosynthesen ein. Die Induzierung von Cox-2 ist in verschiedenen Geweben gleich schnell. Sie schwankt zwischen 2 - 6 h für Fibroblasten [123, 124, 125, 126], Monocyten [127], ovariäre Follikel [128] u.a. Obwohl Cox-2 als induzierbar eingestuft wird, erfolgt die Expression von Cox-2 im Gehirn [129], den Testis [130], im trachealen Epithel [131] und der Macula densa der Nieren [132] kontinuierlich. Dabei kann eine „up“- und „down“-Regulierung durch verschiedene Faktoren, aber auch im Zusammenspiel mit Arzneistoffen wie Dexamethason herbeigeführt werden [133, 134]. Die Gene für Cox-1 und Cox-2 sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Das Cox-1-Gen umfasst rund 22 Kilobasenpaare und enthält 11 Exons, es besitzt keine TATA-Box. Das Cox-2-Gen wird durch ein acht Kilobasenpaare langes Gen codiert. Die Basensequenz enthält zehn Exons [135]. Die Cox-2-Expression kann auf verschiedenen Signalwegen induziert werden. Dazu gehören Proteinkinasen A und C, Tyrosinkinasen, bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide [136, 137, 138], Serum [139, 124], „epidermal growth factor“ (EGF) [140],  $\text{TGF}\alpha$  [141], Interferon- $\gamma$  [142], „tumor necrosis factor“ (TNF) [143, 144, 145] u.a. Eine Vielzahl von Enhancersequenzen sind im Cox-2-Genpromoter identifiziert worden. So ist in bovinen Endothelialzellen eine CEBP $\beta$  Region für die Cox-2-Induzierung durch Lipopolysaccharide und Phorbol ester [146] verantwortlich. Die gleiche Region vermittelt in MC3T3-E1 Zellen, ausgelöst durch  $\text{TNF}\alpha$ , die Cox-2-Induzierung [147]. Daneben wurde auch

eine E-Box beschrieben [148], die essentiell für die luteinisierende und gonadotropin-releasing Hormon stimulierte Transkription ist. Die E-Box bindet auch „upstream“-stimulierende Transkriptionsfaktoren. In Fibroblasten wurde ein cAMP „response element“ als src-Mediator der Cox-2-Expression identifiziert [149].

### 1.2.3 Lokalisation

Bei der Cyclooxygenase handelt es sich um ein membranassoziiertes, glycosyliertes Homodimer. Es interagiert durch hydrophobe Regionen amphipathischer Helices mit einem Lipidmonolayer der Lipiddoppelschichten [150]. Beide Monomere besitzen eine Membran-Bindungs-Domäne (MBD) aus jeweils vier kurzen Helices [151, 152, 153]. An der Bildung der ovinen Cox-1-MBD sind die Aminosäurereste 70 - 117 beteiligt. Beide Isoformen sind an der zum Lumen weisenden Oberfläche des eR sowie in der Nachbarschaft der äußeren Kernhülle [154] gebunden. Aber auch auf der inneren Kernmembran wurden sie nachgewiesen [153].

### 1.2.4 Cyclooxygenase- und Hydroperoxidase-Aktivität

Beide Isoformen katalysieren die Cyclooxygenase- und Peroxidasereaktion mit der Reduktion des PGG<sub>2</sub> zum PGH<sub>2</sub>. Die Enzyme besitzen die gleiche Wechselzahl für die Cyclooxygenase-Aktivität mit  $\approx 3500$  mol Arachidonsäure/min/mol des Dimer [155, 156] sowie die identische  $K_m$ -Konstante vom  $\approx 5$   $\mu$ M [156, 157] für die Arachidonsäure. Abgesehen von einigen untergeordneten Abweichungen bei der Peroxidasereaktion [158, 159, 160] und der Substratspezifität der Fettsäuren [161], kann im wesentlichen von einem identischen Mechanismus ausgegangen werden. Die Cyclooxygenasereaktion beginnt mit der Abstraktion des 13-*pro*-(S)-Wasserstoffs der Arachidonsäure zum Arachidonylradikal [162]. Gefolgt wird dieser Schritt von der sequenziellen Sauerstoffaddition an C(11) und C(15) zum PGG<sub>2</sub>. Im Anschluss erfolgt die Reduktion der Hydroxyperoxidgruppe am C(15) zum Alkohol (PGH<sub>2</sub>). Die Regionen der Cyclooxygenase- und Peroxidase-Aktivität sind dabei räumlich voneinander getrennt. Der Elektronentransfer bei beiden Reaktionen wird über ein Häm vermittelt. Durch eine Vielzahl von proteinchemischen [119], UV-vis [163, 164] und EPR-spektroskopischen [165, 166, 167, 168] sowie röntgenkristallographischen Untersuchungen [150] wurde für die ovine Cox-1 folgende Vorstellung vom Zusammenspiel der beiden Aktivitäten entwickelt [119]. Danach wird die Hämgruppe auf der Peroxidseite durch Alkyl- oder Nitritperoxide oxidiert [160]. Das Häm seinerseits oxidiert das benachbarte

Tyr 385 [165, 150, 169], welches als Radikal den 13-*pro(S)*-Wasserstoff der Arachidonsäure abstrahiert. Nach der Addition der zwei Sauerstoffmoleküle liegt das Tyr wieder als Radikal vor [170, 171, 172]. Das Eisen ( $\text{Fe}^{4+}$ ) liegt während des Oxidationsvorgangs in der Oxyferryl-Form [173, 174] vor. Zur Reduktion der Peroxidgruppe wird das ungepaarte Elektron des Tyr auf das Porphyrin, hier als Protoporphyrin IX (PPIX) dargestellt, übertragen, wodurch das entsprechende Radikalkation  $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}]^{+\bullet}$  entsteht. Das Protoporphyrin IX Radikalkation wird durch die Aufnahme eines Elektrons zum ungeladenen Protoporphyrin IX  $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}]$  reduziert. Durch die Aufnahme eines weiteren Elektrons wird auch das Eisen von der Oxidationsstufe IV zur Oxidationsstufe III reduziert, wobei der Sauerstoff abgegeben wird. Der Komplex  $[\text{PPIX-Fe}^{3+}]$  kann wieder zum Radikalkation  $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}]^{+\bullet}$ , durch die Hydroxyperoxidgruppe des  $\text{PGG}_2$ , oxidiert werden (Abb. 10).

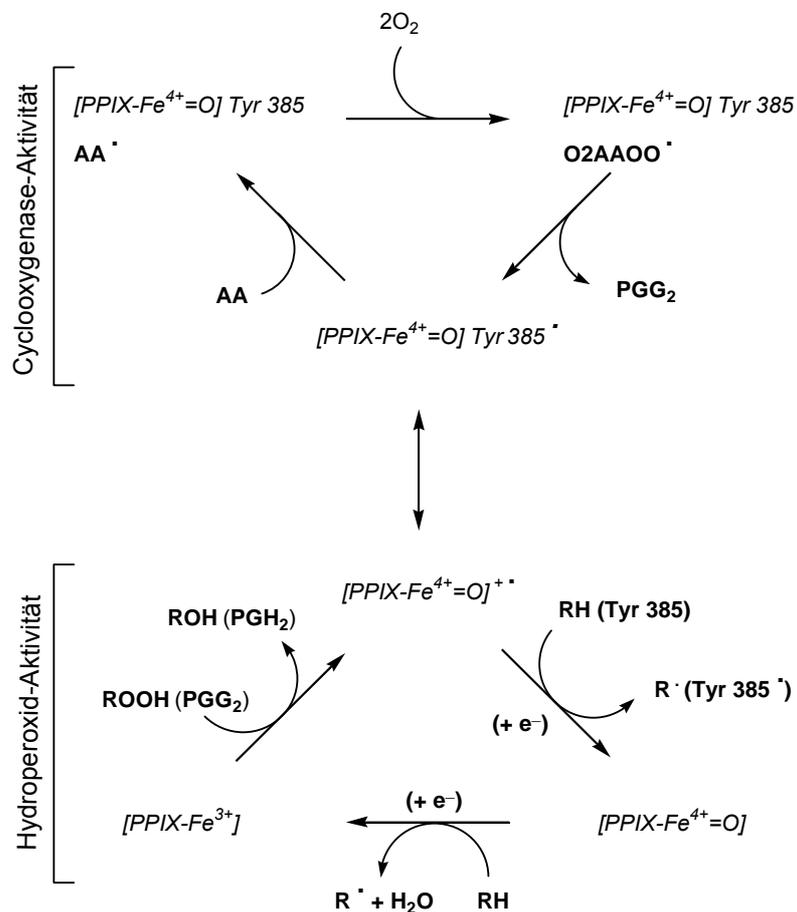
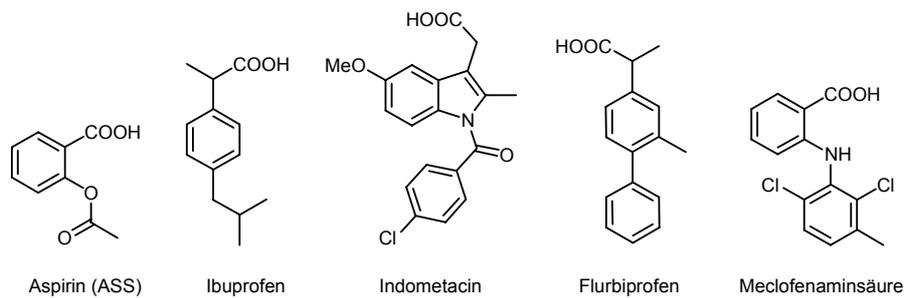


Abbildung 10. Modell der Peroxidase und Cyclooxygenasekatalyse mit einem Komplex aus einem Protoporphyrin (PPIX) und Eisen (Fe) als Hämmodell. Eine zentrale Rolle nimmt das Tyr 385 ein, das als Radikal (Tyr 385<sup>•</sup>) ein Proton aus der Arachidonsäure (AA) abstrahiert und damit die O<sub>2</sub>-Addition sowie die Cyclooxygenierung ermöglicht. Das entstandene PGG<sub>2</sub> wird durch denselben Protoporphyrin-Eisen-Komplex ( $[\text{PPIX-Fe}^{3+}]$ ), hier mit reduziertem Eisen, zum PGH<sub>2</sub> reduziert [173, 174, 170, 171, 172, 175, 176, 153].

### 1.2.5 Interaktion der Cyclooxygenase mit „Nonsteroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs)

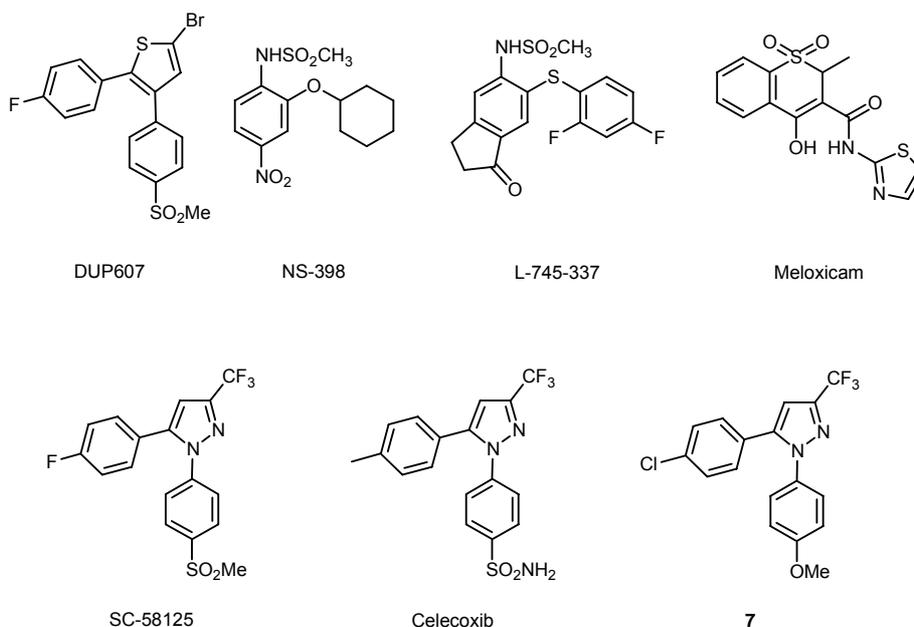
Corticosteroide inhibieren Phospholipase A<sub>2</sub>, drosseln so die Freisetzung von Arachidonsäure und wirken hemmend auf den Prostanoidstoffwechsel. „Nonsteroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs) konkurrieren direkt mit der Arachidonsäure um die Bindung an der Cyclooxygenasebindungsstelle und inhibieren so die Cyclooxygenase-Aktivität, sie haben aber nur einen geringen Effekt auf die Peroxidase-Aktivität [119]. Die Bindungsstelle befindet sich in einem Kanal der mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet und auf das Zentrum der großen globulären Domäne gerichtet ist [150]. In der Bindungstasche der Cox-1 kommt der Aminosäure Arg 120 eine Schlüsselrolle zu. Sie bildet eine Salzbrücke zur Carboxylatgruppe des Arachidonats sowie einiger NSAID's [177] aus. Der Wasserstoff am C(13) der Arachidonsäure wird in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tyr 385 (ovariales Cox-1, Tyr 371 humanes Cox-2) fixiert [150, 173, 174]. Ein zweites Tyr, Tyr 355 auf der gegenüberliegenden Seite vom Arg 120, wird u.a. für die Stereospezifität der Cox gegenüber den NSAID's verantwortlich gemacht [150, 173]. In Röntgenkristallstrukturuntersuchungen [178] wurde das Ser 530 der ovariellen Cox-1 als Acetylierungsstelle des Aspirins identifiziert. Dies konnte durch Mutationsstudien verifiziert werden [170]. Die kovalente Modifikation verschließt den Zugang zur Cyclooxygenasebindungsstelle der Cox, sie führt zu einer permanenten Inaktivierung des Enzyms [170, 179, 180]. Dies erklärt auch den lang anhaltenden Effekt von ASS auf Thrombocyten im Blutkreislauf, die anders als andere Zellen keine neue Cyclooxygenase mehr bilden. In der Cyclooxygenase-2 wird das korrespondierende Ser 516 acetyliert [181]. Dadurch wird ebenfalls die Konversion der Arachidonsäure zum PGG<sub>2</sub> verhindert, nicht jedoch zur 15-(R)-Hydroxyeicosa-5,8,11,13-tetraensäure [179]. Aber auch Cox-2-selektive kovalentbindende Inhibitoren (APHS) sind in der Literatur beschrieben [182]. Aspirin stellt dabei ein Extremfall der Inhibierung dar. Das Gegenstück zur kovalenten Bindung ist die reversible kompetitive Inhibierung z. B. durch Ibuprofen [157, 183]. Eine wichtige Gruppe von NSAID's sind die als zeitabhängig reversibel bezeichneten Inhibitoren wie Indometacin, Flurbiprofen und Meclofenamat [119, 157, 183, 184] (Schema 4). Diese Inhibitoren bilden mit der Cox einen Komplex aus, der in wenigen Sekunden bis Minuten eine Konformationsänderung erfährt und den eigentlich kompetitiv und reversibel gebundenen Inhibitor nur sehr langsam wieder freisetzt (Minuten bis Stunden) [119, 184]. Die ersten NSAID's zeigten an beiden Enzymen der Cox-1 und -2 eine kompetitive Inhibierung an der Cyclooxygenase-Bindungsstelle. Diese Verbindungen sind effektive antiinflammatorische Substanzen, zeigen aber auch eine ulkusbildende Wirkung [185]. Da Cox-2 entscheidend an entzündlichen Prozessen beteiligt ist, aber nicht im Magen auftritt, wurden Cox-2-selektive Inhibitoren entwickelt. Diese Verbindungen zeichnen sich

durch eine antiinflammatorische und analgetische Wirkung aus und zeigen dabei keine gastrointestinale Toxizität [186, 187].



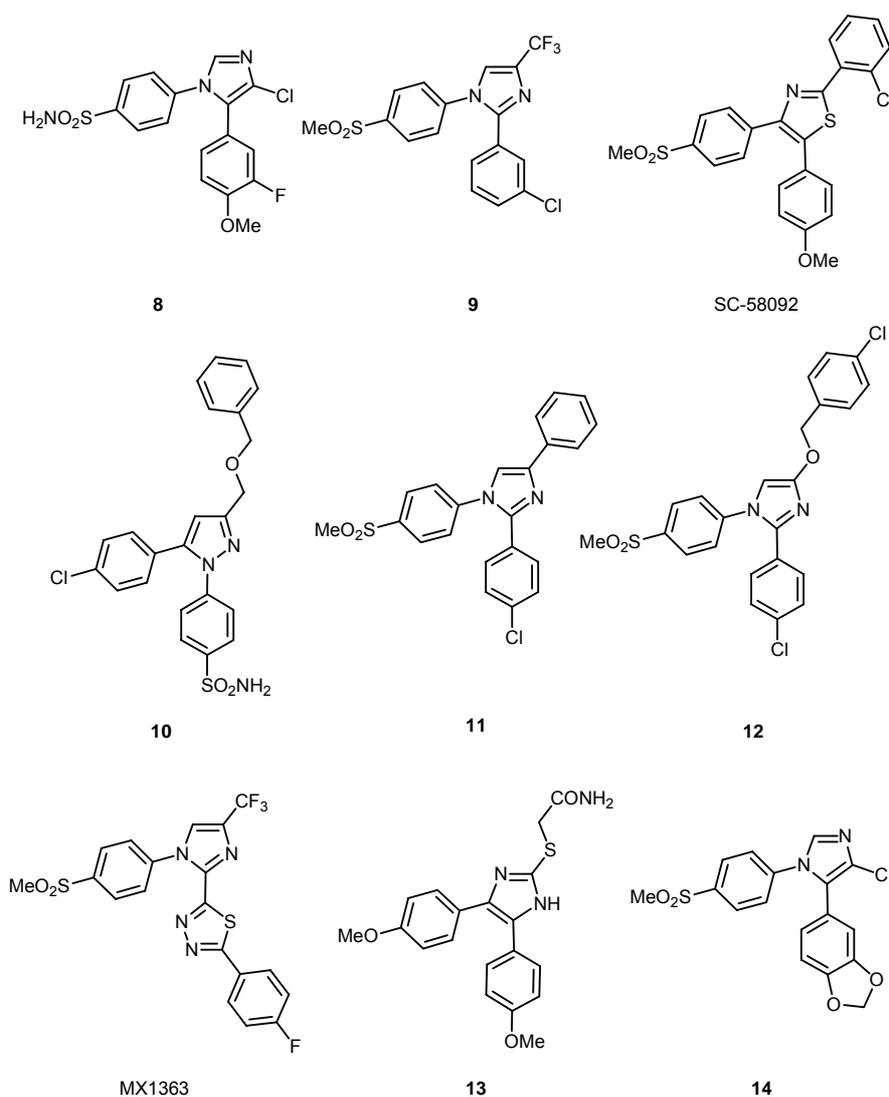
Schema 4

Diese Cox-2-selektiven Inhibitoren wirken reversibel und zeitabhängig [171, 175, 188]. Zu dieser Gruppe gehören DuP697 [188], SC-52125 [171], L-745-337 [187], NS-398 [172] und Meloxicam [185] (Schema 5). All diese Verbindungen zeichnen sich an Cox-1 durch eine nur geringe inhibitorische Wirkung aus. Für die unterschiedliche Wirkung wird das Val in der Position 509 im Cox-2-Bindungskanal verantwortlich gemacht [175]. Die korrespondierende Aminosäure in der Cox-1 ist ein Ile. Das Ile wird ursächlich für die nicht zeitabhängige Inhibierung an Cox-1 angeführt [171, 175]. In neueren Untersuchungen wird in der Cox-2 das Ser 530 für die zeitabhängige Inhibierung durch Nimesulid und Piroxicam verantwortlich gemacht [189].



Schema 5

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von hoch Cox-2-selektiven Inhibitoren auf der Basis von diarylierten *1H*-Pyrazolen entwickelt (SC-58125, Celecoxib). Dabei zeigte sich, dass alle Cox-2-selektiven Inhibitoren eine Sulfonsäure oder ein Sulfonsäureamid tragen (SC-58125, Celecoxib). Bei Sulfoxiden und Sulfiden geht die selektive Wirkung verloren. Während für Celecoxib noch ein  $IC_{50}$ -Verhältnis von 375 (Cox-1/Cox-2) ermittelt wurde, so zeigt Verbindung **7** bei Verlust der Sulfonamidgruppe ein Verhältnis  $9.3 \times 10^{-5}$  [190]. Dabei ist auch entscheidend, an welchem Arylring sich die Sulfonamidgruppe befindet. Für das analoge Fluorderivat (p-F  $\rightarrow$  p-Me) zum Celecoxib wurde eine sehr starke Cox-2-Selektivität gemessen ( $IC_{50}$ -Verhältnis von 622 Cox-1/Cox-2). Tauscht man dagegen die Sulfonamidfunktion gegen das Fluoratom aus, so verringert sich das  $IC_{50}$ -Verhältnis von Cox-1 zu Cox-2 auf acht [190]. Darüber hinaus wurde auch eine Reihe von Cox-2-selektiven Inhibitoren mit einem *1H*-Imidazol (**8**, **9**, **11**, **12**, MX1363, **14**) als zentrales Strukturelement dargestellt (Schema 6).



Schema 6

Dabei wurden sowohl 1,4,5- (**8**, **14**) [191, 192, 193], 2,4,5- (**13**) [194] als auch 1,2,4-trisubstituierte (**9**, **11**, **12**, MX1363) [191] *1H*-Imidazole untersucht. Hierbei wurde auch auf das klassische Strukturelement der CF<sub>3</sub>-Gruppe zugunsten eines dritten Arylrings (**11**) bzw. eines Phenylmethoxyrests (**10**, **12**) [191, 190] oder eines Chlorsubstituenten (**8**, **14**) [191, 192, 193] verzichtet. Auch das dem *1H*-Imidazol analoge Thiazol SC-58092 wurde als Inhibitor identifiziert [195]. Für die Verbindung SC-58092 wurde eine protektive Wirkung auf die Cyclooxygenase gegenüber der proteolytischen Trypsinspaltung festgestellt [196].

Bei den Inhibitoren wurden auch 1,3-Benzodioxole (**14**) als funktionelle Gruppe eingesetzt. Die Elektronendonatoren modulieren sowohl die Selektivität [190], nehmen aber auch Einfluss auf die Halbwertszeit der Verbindungen [192].

Für das *1H*-Imidazol **8** [192] wurde ein Bindungsmodus, in der Cyclooxygenase-Bindungsstelle der Cox-2 formuliert, bei dem der Arylring in Position C(5) in Richtung des Tyr 385 und des Ser 530 orientiert ist. Die beiden Aminosäuren sind dabei durch ein Wassermolekül verbrückt. Der Stickstoff N(3) geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Arg 120 und einem Wassermolekül ein. Das Sulfonamidmotiv formt H-Brücken zum Glu 192, Arg 513 und Phe 518.

Kalgutkar und Marnett [197] gelang es 2000 durch Derivatisierung des Indometacins Cox-2-selektive Inhibitoren herzustellen. Für die Ester- und Amidderivate wurden IC<sub>50</sub>-Werte von bis zu 0.04 µM bestimmt. Es wurden Cox-1/Cox-2-Verhältnisse von bis zu >1700 ermittelt.

Die einzige Verbindung mit einer Cox-1-selektiven Wirkung in Schema 6 ist das *1H*-Imidazol **13**. Für diese Verbindung wurde ein IC<sub>50</sub> von 0.45 µM [194] bestimmt. Neben den hier genannten Verbindungen sind noch eine Reihe weiterer Strukturen mit einer *1H*-Imidazolteilstruktur auf ihre inhibitorische Wirkung an den Isoformen der Cyclooxygenase untersucht worden. So z.B. Benzimidazole mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0.01 - 1.0 µM bei Hemmung an Cox-2 [198]. Aber auch *1H*-Imidazole mit Pyridyl- und Thiazolgruppen als Arylersatz an C(2) [199] oder *1H*-Imidazole mit Morpholin-1-ylalkyl-, 4-Fluorphenyl- und 4-Pyridyl- oder 4-Isochinolylsubstituenten in den Positionen N(1), C(4) und C(5), beide als Cox-2-Inhibitoren [200]. Aber auch für Verbindungen wie 1-(3,3-Diphenyl-2-propenyl)-*1H*-imidazolen wurde neben einer Thromboxan A<sub>2</sub> Synthase Inhibierung, eine Cox-hemmende Wirkung beschrieben [201]. Daneben wurden in der Literatur noch weitere *1H*-Imidazole beschrieben [202, 203, 204, 205]. Auch Verbindungen auf der Basis von Oxazolen wurden synthetisiert und auf ihre inhibitorische Wirkung an der Cyclooxygenase untersucht [206].

### 1.2.6 Cox-Inhibitoren und Tumorwachstum

Viele Autoren berichten über den Einfluss von Cox-Inhibitoren auf das Wachstum und die Synthese von Signalstoffen bei verschiedenen Tumorarten. Cox-Überexpression wurde in einer Vielzahl von Brusttumoren nachgewiesen [207]. In malignen Zelllinien wurde ein hoher PGE<sub>2</sub>-Spiegel gefunden, dabei gelang es, die PGE<sub>2</sub>-Produktion und Cox-Expression durch den Zusatz von Interleukin-1 $\alpha$  in Brustfibroblasten zu induzieren [208]. Darüber hinaus konnte ein antiproliferativer Effekt von Salicylat, dem Metaboliten des Aspirin, auf Brustkrebszelllinien beobachtet werden [209]. Dabei wurde an MDA-MB 231 Zellen das Auftreten von Apoptose und an MCF-7 Zellen sowohl eine apoptotische als auch nekrotische Wirkung festgestellt, in Konzentrationen von 5 - 10 mM. Es konnte auch eine Reduzierung der Interleukine-6 und -11 auf der Ebene der Proteine als auch der mRNA durch Salicylat und Indometacin beobachtet werden.

An Cox-2-überexprimierenden Lungenkrebszelllinien MOR-P und H-460 konnte für den selektiven Inhibitor NS-398 als auch für das unselektive Indometacin eine cytotoxische Wirkung nachgewiesen werden. Bei den mit Indometacin behandelten Zellen trat dabei Apoptose auf, die anscheinend über Cytochrom c- und AIF-Freisetzung mit anschließender Caspase-Aktivierung vermittelt wurde [210].

Am besten untersucht ist die Wirkung von NSAIDs auf Colonkarzinomzellen, so z.B. von ASS auf SW480 Zellen, das neben einem antiproliferativen Effekt auch eine Apoptose auslösende Wirkung ausübt [211]. Aber auch der Einsatz von NSAIDs in der Prävention von Colonrectalkarzinomen ist Gegenstand der Forschung [212]. Daneben zeigen selektive und nicht-selektive NSAIDs auch eine deutliche Hemmung der Angiogenese an endothelialen Zellen [213]. Des Weiteren konnte an Nitrosamin-induzierten Blasenkrebs in der Ratte eine antiproliferative Wirkung durch Celecoxib [214] festgestellt werden. Aber auch das *R*-Enantiomer des Flurbiprofen zeigte eine Inhibierung der Progression beim Prostatakrebs am Tiermodell der Maus [215].