

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Brustkrebs und seine Therapie

Tumorerkrankungen stellen in den westlichen Industrieländern zurzeit die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Kreislaufsystems dar. Unter dem Begriff Krebs werden mehr als 100 verschiedene Krankheiten zusammengefasst, die von der Entstehung und dem ungehemmten Wachstum entarteter Zellen gekennzeichnet sind [1]. Die Ursachen für dieses Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod sind vielfältig und erst zum Teil bekannt, da der Steuerung der Zellfunktion ein komplexes Ineinandergreifen verschiedener Signalwege zugrunde liegt. Brustkrebs ist die häufigste bösartige Tumorerkrankung bei Frauen (Lebenszeitrisiko ca. 12%), an der jährlich weltweit etwa 502.000 Patientinnen sterben [2, 3]. Deshalb kommt seiner Erforschung und der Auffindung neuer Behandlungsstrategien eine wichtige Rolle zu.

Ein Großteil aller Mammakarzinome, ca. 80%, weist ein hormonabhängiges Wachstum auf. Bei ihnen fördern Estrogene, deren physiologische Rolle in der Steuerung von Zellwachstums- und Differenzierungsprozessen liegt, durch die Aktivierung ihres Rezeptors die Entwicklung und das Wachstum des Tumors [4, 5, 6, 7]. Die Aufklärung dieses Zusammenhangs begann 1896 mit Beobachtungen von Beatson. Dieser beschrieb erstmals eine Brustkrebsremission bei prämenopausalen Frauen nach Ovariectomie [8], was bis zur Etablierung medikamentöser Alternativen eine wichtige Behandlungsmöglichkeit blieb. In den 1960er Jahren wurde die Schlüsselrolle des Estrogenrezeptors (ER) bei der Wachstumsregulierung von Brusttumoren erkannt [9, 10, 11], dessen Struktur Mitte der 1980er Jahre aufgeklärt wurde. Der ER stellt eine wichtige Zielstruktur für die Entwicklung neuer antitumorwirksamer Arzneistoffe dar [12, 13].

In der Hormontherapie wird versucht, estrogene Effekte auf unterschiedliche Weise zu verhindern und damit Tumorentstehung und -wachstum entgegenzuwirken. Heute werden dazu Antagonisten oder SERMs (**s**elective **e**strogen **r**eceptor **m**odulators) eingesetzt, die durch Blockade des ER die Transkription estrogenabhängiger Gene verhindern, sowie Aromataseinhibitoren, die die Synthese des physiologischen Estrogens 17 β -Estradiol (E2) unterdrücken. Eine weitere interessante Möglichkeit könnte die Reduktion der Menge an aktivierbarem ER darstellen, die durch gezielte Induktion des Rezeptorabbaus (down-Regulierung, Kapitel 1.2.5) ausgelöst werden kann. Sie gehört zu den neuen Forschungsschwerpunkten und ist derzeit noch nicht durch Wirkstoffe steuerbar.

Eine neue Zielstruktur für antitumoraktive Wirkstoffe stellt die Cyclooxygenase (vor allem die induzierbare Isoform COX-2) dar, deren Expression bei vielen Brusttumoren unab-

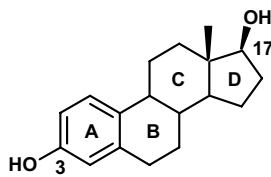
hängig vom Estrogenrezeptorstatus deutlich erhöht ist. Eine gesteigerte COX-Aktivität wird dabei mit einem Kontrollverlust des Zellzyklus, einer verringerten Apoptose oder der erhöhten Invasivität von Tumorzellen in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die COX-2 auch bei hormonabhängigen Brusttumoren aktivierend auf das Tumorgeschehen wirkt. Der Einsatz von COX-Hemmern stellt somit eine neue Therapiemöglichkeit sowohl zur Behandlung estrogenabhängiger als auch estrogenunabhängiger Brusttumoren dar.

1.2 Der Estrogenrezeptor

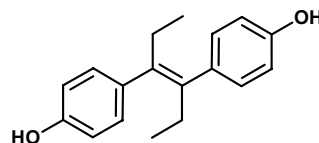
1.2.1 Liganden des Estrogenrezeptors

Eine große Vielfalt unterschiedlicher Substanzen ist in der Lage, am ER zu binden. Neben E2 sind auch nichtsteroidale Verbindungen wie Diethylstilbestrol (DES), triarylierte Fünfringsysteme wie 2-Ethyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazol (**1**) oder Phytoestrogene bekannt, die die Transkription estrogenabhängiger Gene aktivieren (Abbildung 1-1).

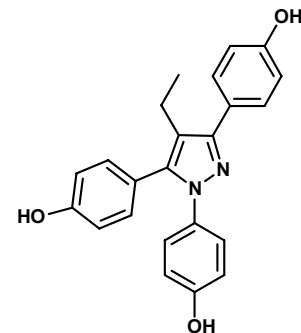
Estrogene



17β-Estradiol (E2)

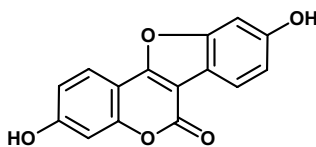


Diethylstilbestrol (DES)

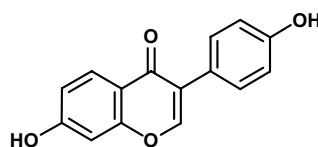


1

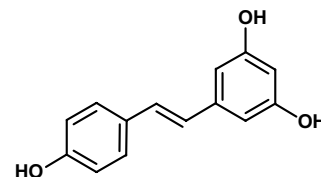
Phytoestrogene



Coumestrol



Genistein (GEN)



trans-Resveratrol

Abbildung 1-1: Natürlich vorkommende und synthetische ER-Agonisten.

Neben diesen ER-Agonisten sind aber auch Liganden bekannt, die gewebespezifisch agonistische oder antagonistische Eigenschaften aufweisen. Diese als SERMs bezeichneten Verbindungen weisen eine basische Seitenkette auf. Sie wirken am Brustgewebe als Antagonisten, während sie auf den Knochen- und Fettstoffwechsel sowie auf das Endometrium estrogenartig wirken. Auch für Phytoestrogene konnten solche modula-

torischen Wirkungen gezeigt werden. Darüber hinaus sind reine Antagonisten bekannt, die über eine äußerst lange Seitenkette verfügen (Abbildung 1-2).

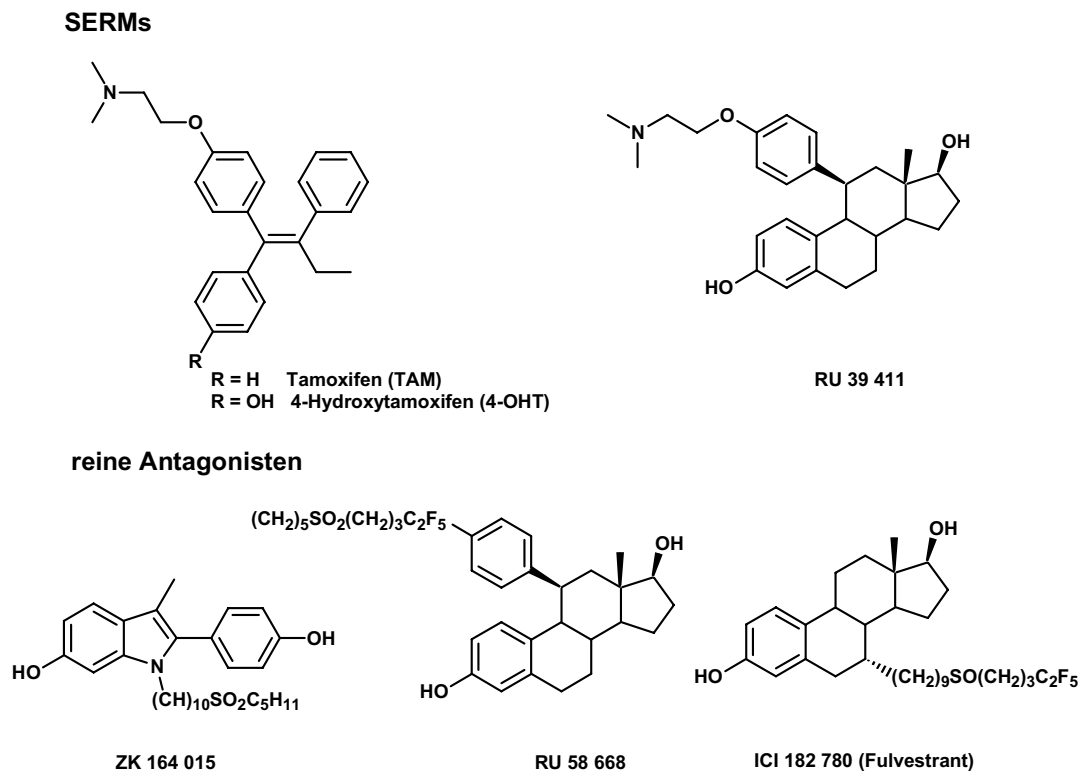


Abbildung 1-2: Synthetische SERMs und reine Antiestrogene.

1.2.2 Charakterisierung der Estrogenrezeptorsubtypen

Der Estrogenrezeptor ist als Steroidhormonrezeptor (SHR) ein kernständiger liganden-induzierbarer Transkriptionsfaktor [14]. 2001 konnte er jedoch erstmals auch in der Plasmamembran von humanen MCF-7-Brustkrebszellen sowie später in vielen weiteren Geweben nachgewiesen werden (Kapitel 1.2.4) [15, 16, 17]. Membran- und kernständige ER sind Produkte derselben Gene [18].

Derzeit sind zwei kernständige humane Estrogenrezeptoren¹ (hER) – ER α und ER β – bekannt, deren codierende DNA auf Chromosom 6 (ER α) und Chromosom 14 (ER β) lokalisiert sind [19]. Der 1962 von Jensen und Jakobsen [5] entdeckte ER α konnte 1986 von Green aus MCF-7-Zellen geklont und seine Primärstruktur aufgeklärt werden [20, 21]. Zehn Jahre später gelang Kuiper die Isolierung und Identifizierung eines weiteren Estrogenrezeptors (ER β) aus der Prostata von Ratten und dem menschlichen Hoden [22, 23].

¹ hER wird im Folgenden als ER bezeichnet.

ER α und ER β weisen eine unterschiedliche Gewebeverteilung auf, was für verschiedene physiologische Funktionen spricht. Während in den Brustdrüsen, im Uterus, aber auch in den Nieren und der Leber überwiegend ER α exprimiert wird, kommt ER β vor allem in der Prostata, in den Hoden, im Lungengewebe, in der Blase und im Gastrointestinaltrakt vor. Im Knochengewebe, im Kardiovaskularsystem, im ZNS, im Urogenitaltrakt und in den Eierstöcken werden beide Subtypen nebeneinander gebildet [24]. Im malignen Mammakarzinomgewebe steigt die Expression von ER α gegenüber ER β deutlich an [25, 26, 27], wobei sich dieses Verhältnis in therapieresistenten Tumoren häufig umkehrt [28]. Deshalb scheint ER α neben der Steuerung des reproduktiven Systems auch in der Tumorgenese estrogenabhängiger Mammakarzinome eine große Bedeutung zu besitzen. ER β scheint vor allem die regulatorische Wirkung der Estrogene auf den Knochenstoffwechsel und das Kardiovaskularsystem zu vermitteln [29].

1.2.3 Aufbau des Estrogenrezeptors

Das ER α -Protein besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66 kDa [19, 21]. ER β long² ist aus 530 Aminosäuren (59 kDa) aufgebaut. Von beiden Subtypen konnten Splicevarianten identifiziert werden, deren physiologische Bedeutung jedoch derzeit weitgehend unbekannt ist [30, 31, 32, 33].

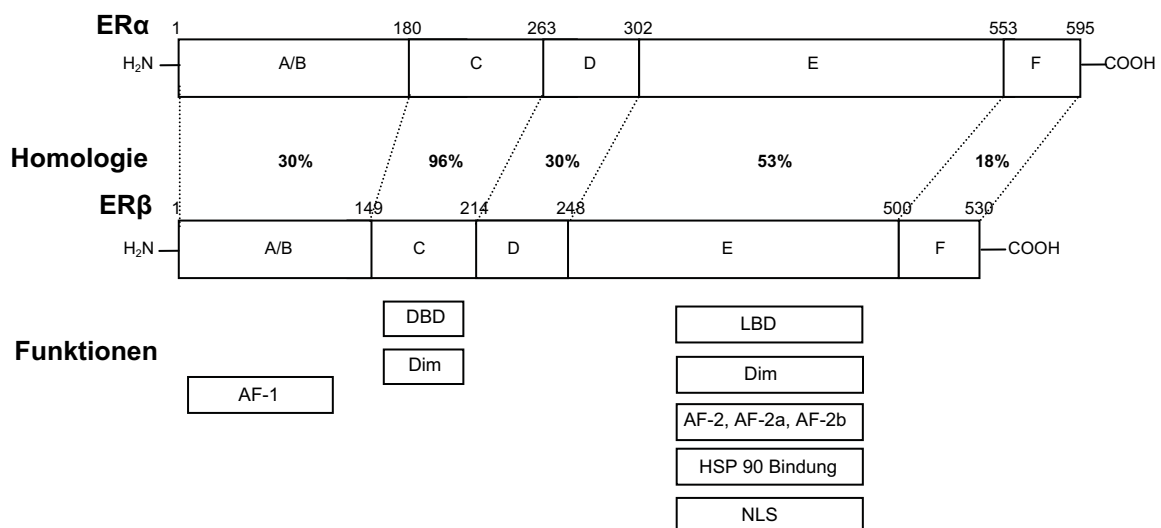


Abbildung 1-3: Funktionelle Domänen des ER nach Green [34], Gronemeyer [35] und Tsai [36] unter Angabe der Subtyphomologien nach Dutertre [37] und Nummerierung der Aminosäuren. **NLS:** nuclear binding signal; **HSP90:** heat shock protein 90; **AF:** activation function; **DBD:** DNA binding domain; **LBD:** ligand binding domain; **Dim:** dimerisation region.

² Physiologisch am häufigsten vorkommende Splicevariante, die im nachfolgenden Text als ER β bezeichnet wird.

Wie bei allen SHR lassen sich jeweils sechs funktionelle Domänen A - F unterscheiden, wobei die Domänen A und B zu einer Funktionseinheit zusammengefasst werden [38, 39]. In den einzelnen Domänen besteht unterschiedlich große Homologie zwischen den ER-Subtypen (Abbildung 1-3). In der N-terminalen Domäne A/B befindet sich die Aktivierungsfunktion AF-1. Ihre Aktivität wird ligandenunabhängig vor allem von Wachstumsfaktoren über die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren wie Ser118 gesteuert (Kapitel 1.2.4) [40, 41, 42, 43, 44, 45]. Deshalb wird die Aktivierung von AF-1 (sowie AF-2b der Domäne E) für die agonistische Wirkung von SERMs in bestimmten Geweben (siehe Kapitel 1.3.3) verantwortlich gemacht [46, 47, 48].

Die sich anschließende Domäne C enthält die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die über ein Zinkfingermotiv verfügt. Darunter versteht man die tetrahedrale Koordination von jeweils vier der insgesamt acht Cysteinreste um ein Zinkion, wodurch es zur charakteristischen Anordnung benachbarter Aminosäuresequenzen kommt, die als P- und D-Box bezeichnet werden (Abbildung 1-4). Die P-Box, eine Gruppe aus drei Aminosäuren E, G und A, dient zur spezifischen Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb des Promotors der estrogenabhängigen Zielgene, den EREs (estrogen response elements) [36, 49]. Die D-Box, die aus fünf Aminosäuren gebildet wird (P, A, T, N, Q), ist an der Vermittlung der Rezeptordimerisierung und am Aufbau unspezifischer DNA-Kontakte beteiligt [50, 51, 52]. Aufgrund der hohen Homologie zwischen ER α und ER β in dieser Domäne (96%) können beide ER an dieselben DNA-Sequenzen binden.

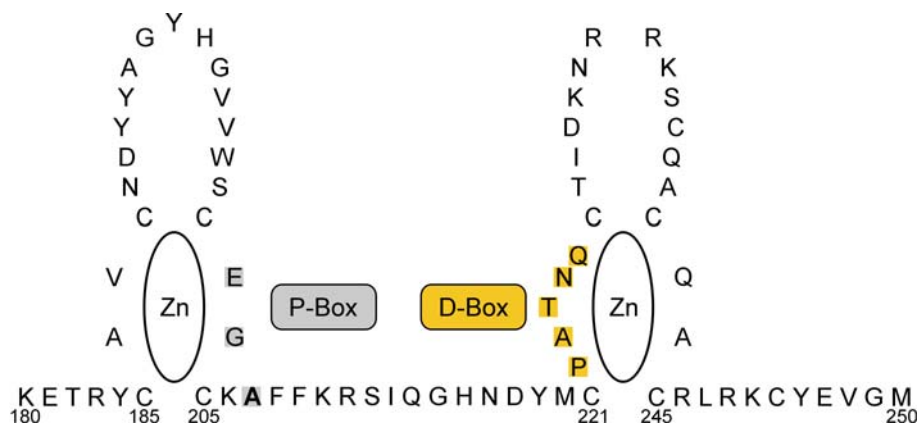


Abbildung 1-4: Zinkfingermotiv des humanen ER α nach Ruff [53], Green [54], Fuller [55] und Tsai [36] mit spezifischer (P-Box, grau) und unspezifischer (D-Box, gelb) NA-Erkennung. Die Aminosäuren sind nummeriert und im Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

Die bisher wenig charakterisierte „hinge“-Domäne D (hinge = Gelenk) dient als Linkerpeptid zwischen Domäne C und E. Sie scheint die Konformationsänderung des Rezeptors nach Ligandenbindung zu beeinflussen und wird außerdem als möglicher Angriffspunkt für Koaktivatoren diskutiert [56].

Die Domäne E verfügt über eine große funktionelle Komplexität. Hier befinden sich die Ligandenbindungsdomäne (LBD), eine HSP90-bindende Region, ein NLS, eine Dimerisierungsregion und die Aktivierungsfunktion AF-2 [57, 58]. Diese wird ligandenabhängig vor allem durch die Interaktion mit Kofaktoren aktiviert, jedoch konnten auch zwei ligandenunabhängige Bereiche AF-2a [59] und AF-2b [60] identifiziert werden. AF-1 (Domäne A/B) und AF-2 agieren in den meisten Zellen synergistisch [47, 48, 61], können aber auch unabhängig voneinander aktiviert werden [62, 63, 64]. Die LBD wird aus 12 α -Helices (H1-H12) gebildet, die in einer dreiteiligen „sandwich“-Struktur [65] angeordnet sind. Sie wird von H1 und H3 bzw. H7 und H10 auf jeweils gegenüberliegenden Seiten begrenzt. Verschlossen wird die LBD einerseits von einer β -Faltblattstruktur und andererseits von H12, die an der Ausbildung der AF-2-Region maßgeblich beteiligt ist. Trotz der geringen Homologie zwischen den Subtypen (53%) unterscheiden sich ER α und ER β im Bereich der E2-Bindungsstelle in nur zwei Aminosäuren (konservativer Austausch von Met421 und Leu384 in ER α gegen Ile373 und Met336 in ER β), was zu vergleichbaren Bindungsaffinitäten von E2 an beiden Subtypen führt.

Das C-terminale Ende (Domäne F) scheint sowohl an der Steuerung des Rezeptorabbaus (Rezeptorregulierung, Kapitel 1.2.5) als auch an der Inhibierung der Rezeptordimerisierung und dem „cross-talk“ mit anderen Signalwegen beteiligt zu sein [66, 67, 68].

1.2.4 Transkriptionsaktivierung

Bei Abwesenheit hormoneller Stimuli unterliegt der ER, ähnlich wie andere kernständige Rezeptoren, einem kontinuierlichen Transport zwischen Zellkern und Zytosol. Zur nukleoplasmatischen Translokation interagiert er über sein NLS mit Transportproteinen, wobei immunocytochemische Untersuchungen gezeigt haben, dass die Zellkernfraktion überwiegt [69]. Durch Assoziation mit HSP90 [70, 71, 72] sowie weiteren Begleitproteinen (p23, Immunophilin) wird seine Transaktivierungsstärke unterdrückt, seine Fähigkeit, Liganden zu binden, jedoch wesentlich erhöht. Diffundiert ein Ligand in die Zelle und bindet am ER, kommt es zur Dissoziation dieses Multiproteinkomplexes und zur Auslösung von Phosphorylierungsprozessen [73], die zu einer umfassenden Konformationsänderung des gesamten ER-Moleküls führen. Dadurch kommt es zur Bildung von Homodimeren (ER α /ER α bzw. ER β /ER β) oder Heterodimeren (ER α /ER β) mit hoher Transaktivierungsstärke, wobei ER β -Homodimere die geringste Aktivität besitzen [74, 75, 76, 77, 78]. Im Zellkern binden die ER-Dimere über ihr Zinkfingermotiv mit unterschiedlicher Affinität an die korrespondierenden DNA-Sequenzen (EREs). Sie werden von einer invers wiederholten Basenabfolge (AGGTCA und TGACCT) der EREs erkannt [79, 80, 81, 82]. Infolge der Wechselwirkungen zwischen dem Liganden-Rezeptor-Komplex und der DNA

(EREs) kommt es zur Rekrutierung von Kofaktoren und Aktivierung des Transkriptionsapparats. Dabei binden Transkriptionsfaktoren (TF) an die TATA-Box (25-30 Basenpaare vom Startpunkt entfernt) und es kommt zur Assoziation der RNA-Polymerase II (Präinitiationskomplex) [83, 84, 85]. Unter Beteiligung weiterer Koaktivatoren und Transkriptionsfaktoren interagiert der Präinitiationskomplex mit DNA-Sequenzen ober- und unterhalb der TATA-Box sowie mit der AF-2-Region des Estrogenrezeptors [86, 87, 88, 89]. Aus diesem Initiationskomplex heraus beginnt die RNA-Polymerase II mit der mRNA-Synthese (Abbildung 1-5).

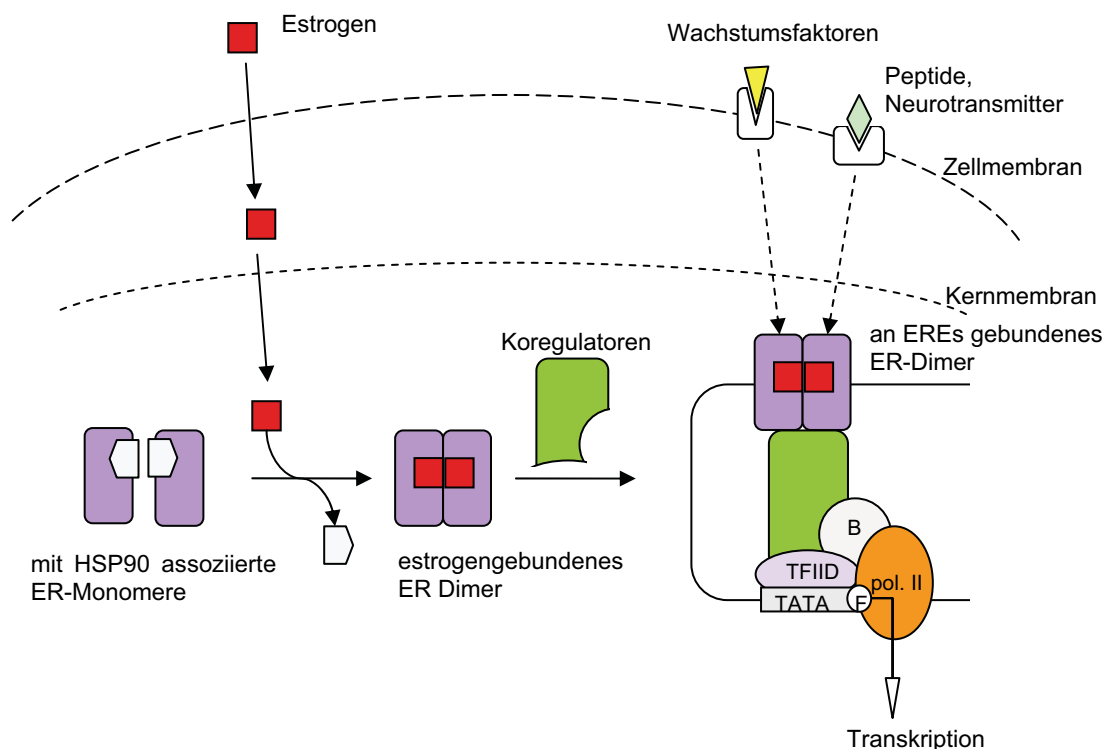


Abbildung 1-5: Klassisches genomisches Modell der Transkriptionsaktivierung nach Tsai [36] und Katzenellenbogen [89]. **TATA:** Basen-Sequenz TATA innerhalb des Promotors, **pol. II:** RNA-Polymerase II, Transkriptionsfaktoren: **TFIID:** aus TBP (TATA-bindendes Protein) und TAFs (TBP-assoziierte Faktoren), **B:** TFIIB, **F:** TFIIF.

Kofaktoren lassen sich unterteilen in Koaktivatoren, die die Transkription steigern und Korepressoren, die hemmende Effekte auf die Rezeptoraktivität ausüben [90, 91, 92]. Bisher wurden über 20 dieser Proteine entdeckt, die gewebespezifisch exprimiert werden [93]. Da sie an enzymatisch gesteuerten Kompaktierungs- und Dekompaktierungsprozessen im Chromatingerüst beteiligt sind, welche die Grundlage jeder Transkription sind, besitzen sie eine wichtige Bedeutung. Viele Koaktivatoren wie SRC-1 (**steroid receptor coactivator-1**) verfügen dazu über eine intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität [94, 95] und führen durch Acetylierung von Lysinresten an den N-Termini der Histone 3 und 4 zur Relaxierung des Chromatingerüsts und damit zur Abschwächung der Histonassoziation an die DNA. Darüber hinaus können sie auch andere Koaktivatoren

bzw. Transkriptionsfaktoren acetylieren oder rekrutieren. Die meisten Koaktivatoren interagieren außerdem über eine Reihe leucinreicher LxxLL-Motive (NR-Box, L = Leucin, x = beliebige andere Aminosäure) mit der AF-2-Region der LBD, treten aber auch untereinander in Wechselwirkung [96, 97, 98]. Damit steigern sie die Stabilität des Präinitiationskomplexes [98, 99] und erleichtern die Transkriptionsaktivierung durch die RNA-Polymerase II [100, 101]. Bei Abwesenheit von Agonisten oder Assoziation des ER mit Antagonisten interagieren Koaktivatoren nicht mit dem Rezeptor [102, 103, 104].

Im Gegensatz dazu führen Korepressoren mithilfe ihrer Histondeacetylase-Aktivität (HDAC) zur Kompaktierung des Chromatins und erschweren dadurch die Anlagerung von ER-Dimeren [105, 106]. Die am besten untersuchten Korepressoren SMRT (**s**ilence **m**ediator for **r**etinoic and **t**hyroid hormone receptors) und NCoR (**n**uclear receptor **c**orepressor) interagieren über ein LxxLL-Motiv bei Abwesenheit von Agonisten oder Anwesenheit von Antagonisten [107] mit dem Rezeptor und stabilisieren seinen inaktiven Zustand. Darüber hinaus sind auch Korepressoren wie REA (**r**epressor of **E**R activity) bekannt [108], die mit Koaktivatoren wie SRC-1 um die Bindung an den ER-Agonist-Komplex konkurrieren [109, 110, 111].

Während die Bindung von Agonisten bzw. Antagonisten entweder zur Rekrutierung von Koaktivatoren oder Korepressoren führt, induzieren SERMs wie 4-OHT (Kapitel 1.3.3) eine Rezeptorkonformation, die eine Interaktion mit Koaktivatoren und Korepressoren zulässt. Aufgrund der gewebespezifischen Expression funktionell unterschiedlicher Kofaktoren können SERMs in unterschiedlichen Geweben agonistische und antagonistische Eigenschaften entfalten (Koaktivatorhypothese) [112]. Außerdem scheinen SERMs die ER-Bindungsaffinität für Koaktivatoren herabzusetzen, so dass erst ein Überangebot an Koaktivatoren zur ER-Aktivierung führt. Die in vielen Brustkrebszelllinien beobachtete Überexpression von ER-Koaktivatoren wie SRC-3 scheint dadurch zum Verlust der antiestrogenen Wirkung SERMs zu führen und wird als maßgebliche Ursache für die Resistenz gegen Tamoxifen angesehen [113, 114, 115].

Neben der klassischen Genaktivierung (Abbildung 1-5 und Abbildung 1-6, (I)) kann die Transkription estrogenabhängiger Gene auch ERE-unabhängig erfolgen. Dabei interagieren spezielle Transkriptionsfaktoren wie Sp-1 (**s**timulating **p**rotein-**1**) oder AP-1 (**a**ctivating **p**rotein-**1**) direkt über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem ER-Ligand-Komplex und gleichzeitig mit ihren spezifischen DNA-Erkennungssequenzen [116, 117, 118, 119, 120].

Darüber hinaus kann die Transkriptionsaktivierung auch ohne Bindung von Liganden an den ER erfolgen (Abbildung 1-6, (IV), (V)). Dabei modulieren kleine hydrophile Signal-

moleküle wie Dopamin [121, 122], Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF-1 und TGF- α [44, 123, 124, 125, 126] sowie c-AMP den Phosphorylierungsgrad der AF-1- und AF-2a/b-Region und aktivieren die Genexpression [127]. Auch Koregulatoren sind Zielstrukturen für diese Phosphorylierungsprozesse und können aktiviert werden [128].

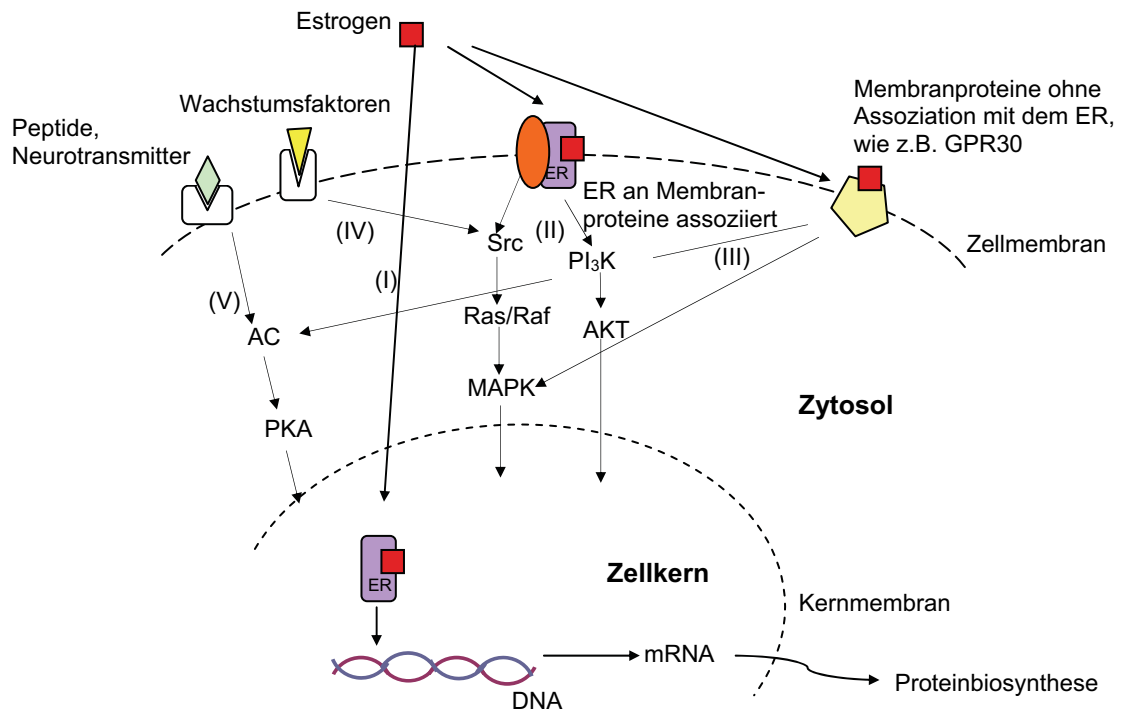


Abbildung 1-6: Klassischer genomischer Signalweg (I): Diffusion des Estrogens in die Zelle und Bindung an den aktivierbaren ER (siehe Abbildung 1-5). Nichtgenomische estrogenvermittelte Signalwege: Estrogene interagieren mit dem membranständigen an Membranproteine assoziierten ER (II) oder direkt mit Membranproteinen wie z.B. GPR30 (III) und aktivieren den Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI₃K)-Signalweg bzw. Src-Ras-Raf-MAPK-Signalweg, in den auch ligandenunabhängig eingegriffen werden kann (IV). Dopamin und cAMP können den Adenylatcyclase (AC)-Signalweg und Proteinkinase A (PKA)-Signalweg aktivieren (V). Diese Signalwege sind untereinander verknüpft und führen zur Phosphorylierung des ER, der Kofaktoren oder des Transkriptionskomplexes im Nukleus [adaptiert nach 129, 130].

Neben der genomischen Transkriptionsaktivierung sind auch genomunabhängige estrogenische Effekte bekannt, wie Änderungen im Calciumflux oder die cAMP-Bildung, die sehr schnell nach Exposition mit Estrogenen auftreten und weitgehend unabhängig vom Transkriptionsverhalten der Zelle sind. Dazu interagieren Estrogene einerseits mit dem membranständigen ER (Abbildung 1-6 (II)) und bilden einen dimerisierten ER-Liganden-Komplex, der benachbarte G-Protein-gekoppelte- oder Tyrosinkinaserzeptoren aktiviert [131, 132]. Andererseits wird auch eine direkte Aktivierung ER-unabhängiger Membranproteine wie z.B. des „orphan receptors“ GPR30 (Abbildung 1-6 (III)) diskutiert. Da die nachgeschalteten Signalkaskaden Phosphorylierungsreaktionen am nuklearen ER auslösen, resultiert meist eine erhöhte Transkriptionsaktivität [133]. Der „cross-talk“ zwischen den einzelnen Signalwegen führt zu einem komplizierten und zum Teil noch

wenig bekannten Netzwerk der Transkriptionsaktivierung estrogenabhängiger Gene. Interessanterweise aktivieren Tamoxifen (Kapitel 1.3.3) und ICI 182 780 (Kapitel 1.3.5) GPR30, während sie am ER als Antagonisten wirken.

1.2.5 Regulierung des Estrogenrezeptorgehalts

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass verschiedene Liganden auch eine weitreichende Gehaltsänderung sowie eine veränderte Verteilung des Estrogenrezeptor in der Zelle bewirken, was zum Verständnis ihrer Wirkungsweise von großer Bedeutung ist. Durch die Aufklärung ihres komplexen Wirkverhaltens könnten neue Therapieansätze für die Behandlung hormonabhängiger Tumoren gefunden werden.

Bei Abwesenheit von Liganden besitzt der ER eine kurze Halbwertszeit von ca. 4-5 h und wird wie eine Vielzahl anderer intrazellulärer regulatorischer Proteine [134, 135, 136, 137] durch das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) abgebaut [138, 139, 140, 141, 142].

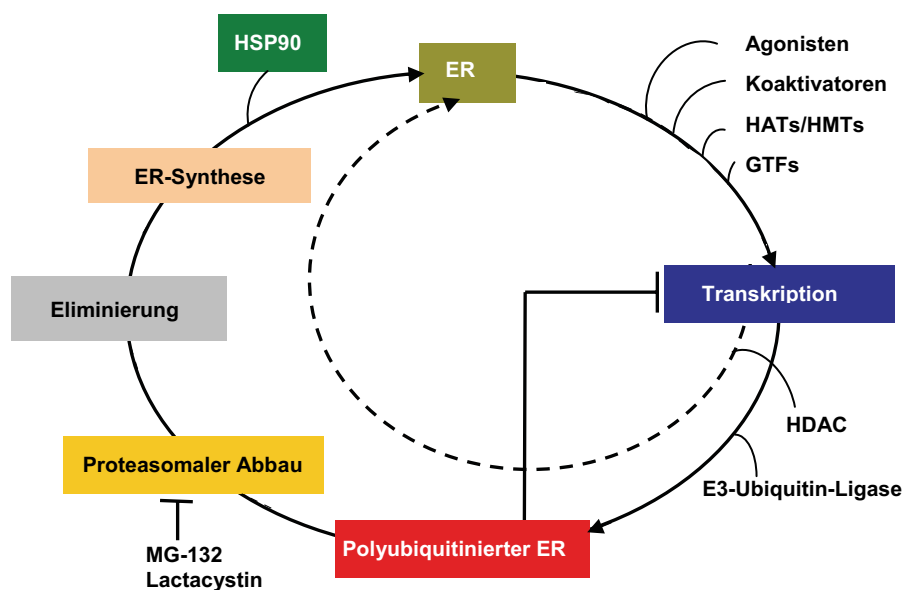


Abbildung 1-7: Zyklische Regulation der ER-Synthese nach Leclercq [135]. **HAT:** histone acetyltransferase, **HMT:** histone methyltransferase, **HDAC:** histone deacetylase, **GTF:** general transcription factor.

Als Signal für die Aktivierung des UPS dient wahrscheinlich ein veränderter Phosphorylierungsstatus bestimmter Rezeptorbereiche [143], der von Estrogenen und reinen Antagonisten, nicht aber von SERMs induziert werden kann [144].

Zur Erkennung durch proteasomale Enzyme wird der ER zunächst wiederholt mit Ubiquitineinheiten (Peptid, 8.6 kDa) markiert. Dazu wird Ubiquitin über eine Thioesterbindung ATP-abhängig an ein ubiquitinaktivierendes Enzym gebunden und auf ein ubiquitin-konjugierendes Enzym transferiert. Anschließend katalysiert eine substratspezifische

E3-Ubiquitin-Ligase seine Übertragung auf den ER bzw. die Verkettung mit weiteren Ubiquitineinheiten über lysinreiche Regionen (z.B. Lys48). Der polyubiquitinierte ER wirkt der weiteren Transkription entgegen und wird zugleich vom proteasomalen multikatalytischen 26S-Enzymkomplex erkannt, der aus einer katalytischen 20S- und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten besteht. ATPasen der 19S-Untereinheiten dienen dabei zur Erkennung, Entfaltung und Einführung des ubiquitinierten ER-Proteins in das multikatalytische Zentrum der 20S-Untereinheit. Dort finden der enzymatische Aufschluss und der Abbau zu peptidischen Fragmenten statt. Die Eliminierung des ER scheint ein wichtiges Signal für seine Neusynthese zu sein [145], der eine Stabilisierung durch Assoziation mit HSP90 und anderen Begleitproteinen in der aktivierbaren Konformation folgt (Abbildung 1-7) [146, 147]. Dass es sich um einen zyklischen Ablauf der ER-Regulierung handelt, wird durch kürzlich publizierte Inhibierungsexperimente einzelner Glieder gestützt. Dabei konnte in Brustkrebszellen z. B. der rasche Verlust des ER nach Einsatz des HSP90-Inhibitors Radicol [148, 149, 150] von Proteasomeninhibitoren wie dem peptidischen Aldehyd MG-132 [151] aufgehoben werden. Der inaktive Rezeptor durchläuft diesen zyklischen Prozess in ca. 20 min. Nach agonistischer Aktivierung verlängert sich dieser Prozess (ca. 45 min).

Die starke Beeinflussung des Auf- und Abbaus des ER-Proteins durch die unterschiedlichen Liganden nimmt eine Schlüsselrolle in der Aufklärung ihres biologischen Verhaltens ein. Estrogene wie E2 und DES induzieren einen beschleunigten ER-Abbau (down-Regulierung, Halbwertszeit: 3-4 h) und verringern die mRNA-Halbwertszeit [152, 153]. Dabei scheint ein enger Zusammenhang zwischen der Transkriptionsaktivierung und dem ER-Abbau zu bestehen, da einige Koaktivatoren in beide Signalwege involviert sind [154, 155]. Reine Antagonisten induzieren durch Destabilisierung des ER (Kapitel 1.3.5) seine rasche Eliminierung (Halbwertszeit < 1 h), haben jedoch keinen Einfluss auf die mRNA-Halbwertszeit [156, 157]. Darüber hinaus beeinflussen sie den kontinuierlichen Transport des hochmobilen ER-Proteins zwischen den Zellkompartimenten und führen zu dessen Anreicherung im Zytoplasma [158]. Da der proteasomale Abbau hauptsächlich dort erfolgt [159], trägt dieser Effekt vermutlich auch zum verstärkten ER-Abbau durch Antiestrogene bei [135]. Im Gegensatz dazu führen SERMs zu einer ausgeprägten up-Regulierung des ER [160, 161] in einer Konformation, durch die keine Transkriptionsaktivierung erfolgt (Kap 1.3.3) [162, 163]. Die ER-up-Regulierung resultiert jedoch nicht, wie ursprünglich angenommen, aus einer Erhöhung der ER-Syntheserate [164], sondern aus einer SERM-induzierten Abnahme der Rezeptorproteolyse durch die Stabilisierung des ER, die eng an das Vorhandensein der basischen Seitenkette geknüpft zu sein scheint. Mutationsexperimente legen nahe, dass exponierte Aminosäuren der Helix 12 für

den up-regulatorischen Effekt von 4-OHT von entscheidender Bedeutung sind. So führte der Austausch von Asp538 gegen Ala zur Destabilisierung des ER-4-OHT-Komplexes und zur Auslösung der ER-down-Regulierung [165]. Außerdem führen SERMs zur Anreicherung des ER im Zellkern.

1.3 Liganden-ER-Komplexe

Durch Röntgenstrukturanalyse von ER-Liganden-Komplexen konnten detaillierte Kenntnisse über die molekularen Hintergründe der Interaktion verschiedener Liganden mit der LBD gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen unterschiedliche ER-Konformationen induzieren, die ihren biologischen Charakter (agonistisch, antagonistisch, partiell agonistisch) bestimmen [166].

1.3.1 17 β -Estradiol in der LBD von ER α

Die Orientierung von E2 in der Ligandenbindungsdomäne von ER α (H1-H12) konnte 1997 aufgeklärt werden (Abbildung 1-8, rechts) [65].

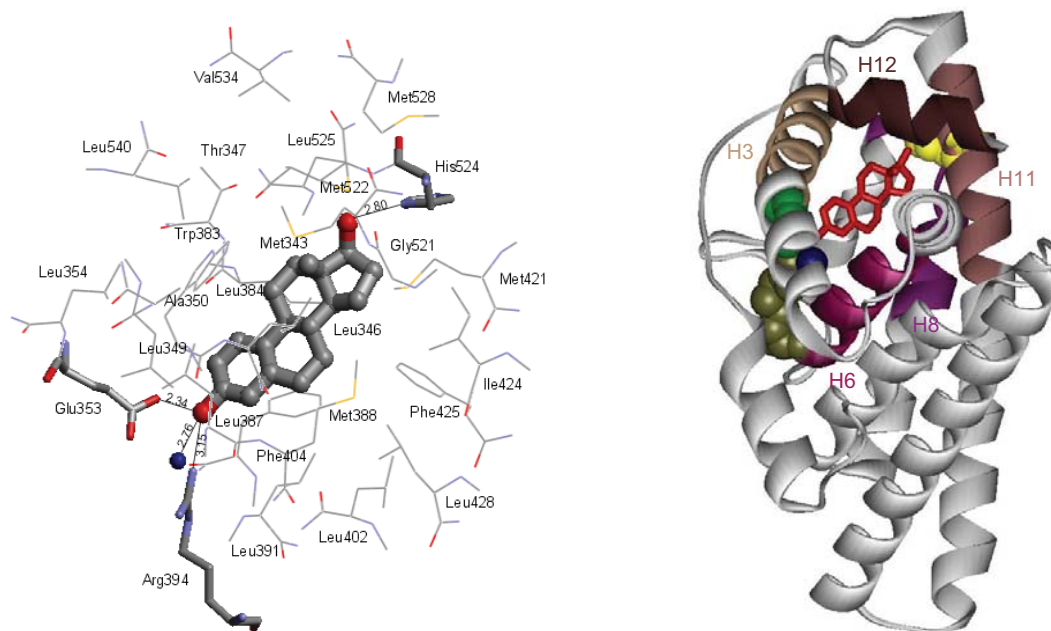


Abbildung 1-8: Links: Interaktionen der Hydroxygruppen von E2 mit Glu353, Arg394, einem Wassermolekül und His524 über Wasserstoffbrückenbindungen sowie des Gonankörpers über van-der-Waals-Wechselwirkungen mit unpolaren Aminosäuren der LBD des ER α . Rechts: Konformation des E2-LBD-Komplexes des ER α ³ unter farbiger Kennzeichnung von E2 (rot), Glu353 (hellgrün), Arg394 (dunkelgrün) einem Wassermolekül (blau) sowie His524 (gelb) und der an der Ausbildung der Ligandenbindungstasche beteiligten Helices. H12 verschließt die Bindungstasche, ohne direkt mit E2 zu interagieren [65].

³ Dargestellt wird ein hER α -Monomer.

Es wurde gezeigt, dass 5 (H3, H6, H8, H11, H12) der insgesamt 12 Helices der LBD die E2-Bindungstasche bilden, die mit 450 \AA^3 etwa doppelt so groß wie E2 (245 \AA^3) ist. E2 bindet diagonal zwischen H3, H6, H8 und H11, mit deren Aminosäureresten es interagiert.

Im Gegensatz dazu besteht zu H12, welche die Bindungstasche verschließt, kein direkter Kontakt. In dieser „geschlossenen“ Konformation vermittelt H12 die Ausbildung einer kompetenten Kofaktorenbindungsstelle (AF-2-Region; gebildet aus Teilen von H3, H4, H5 und H12) und ist damit für die Bildung des Transkriptionsapparates von zentraler Bedeutung. E2 ist über zwei Wasserstoffbrückenbindungen, zum einen zwischen der phenolischen Hydroxygruppe des A-Rings (3-OH) und Glu353 (H3) sowie Arg394 (H6) und einem inkorporierten Wassermolekül, zum anderen zwischen der Hydroxygruppe des D-Rings (17β -OH) und His524 (H11) im Rezeptor verankert [167, 168]. Analog dazu sind in ER β Glu305, Arg356 sowie His475 beteiligt. Außerdem interagieren vor allem die Ringe A, A/B und D des Gonangrundkörpers über zahlreiche van-der-Waals-Wechselwirkungen mit unpolaren Aminosäureresten der LBD (Abbildung 1-8, links). Darüber hinaus konnten hydrophobe Seitentaschen identifiziert werden, die nicht von E2 ausgefüllt werden, größere wurden in der Umgebung von Position 7α (17 \AA^3) und 11β (β -Kanal, 45 \AA^3), kleinere im Bereich von Position 16α und 17α lokalisiert [169]. Zusätzliche Wechselwirkungen mit diesen Arealen können zu einer Verstärkung der Rezeptorbindung führen. Dagegen werden strukturelle Veränderungen am Phenolring A kaum toleriert [170].

1.3.2 Diethylstilbestrol

Auch viele nichtsteroidale polyzyklische Verbindungen zeigen estrogene Eigenschaften. Diese sind meist aus einem Phenolring und einem weiteren sauerstoffhaltigen Zyklus am gegenüberliegenden Molekülende aufgebaut, wobei ein dazwischen liegender hydrophober Molekülteil einen O-O-Abstand von ca. 11 \AA gewährleistet.

Der Prototyp synthetischer nichtsteroidaler Estrogene ist das *trans*-Diethylstilbestrol (DES, Abbildung 1-1), das vor der Entdeckung von ER-Liganden mit antiestrogener Wirkung zur Behandlung von Brustkrebs (Hochdosistherapie) eingesetzt wurde [171]. Trotz seines im Vergleich zu E2 größeren O-O-Abstands von 12.1 \AA , kann es analog zu E2 über Wasserstoffbrückenbindungen mit Arg394, Glu353 bzw. His524 [172] mit hoher Affinität am ER binden. Auch Helix 12 ist in gleicher Weise orientiert (Abbildung 1-9, rechts). Aufgrund seines zusätzlichen Phenolrings sowie zweier Ethylsubstituenten, die die hydrophoben Seitentaschen besetzen, geht DES mehr hydrophobe Kontakte mit der LBD als E2 ein (Abbildung 1-9, links). Bei Austausch der Ethylsubstituenten gegen Methylgruppen sinkt die Rezeptorbindungsaffinität [173].

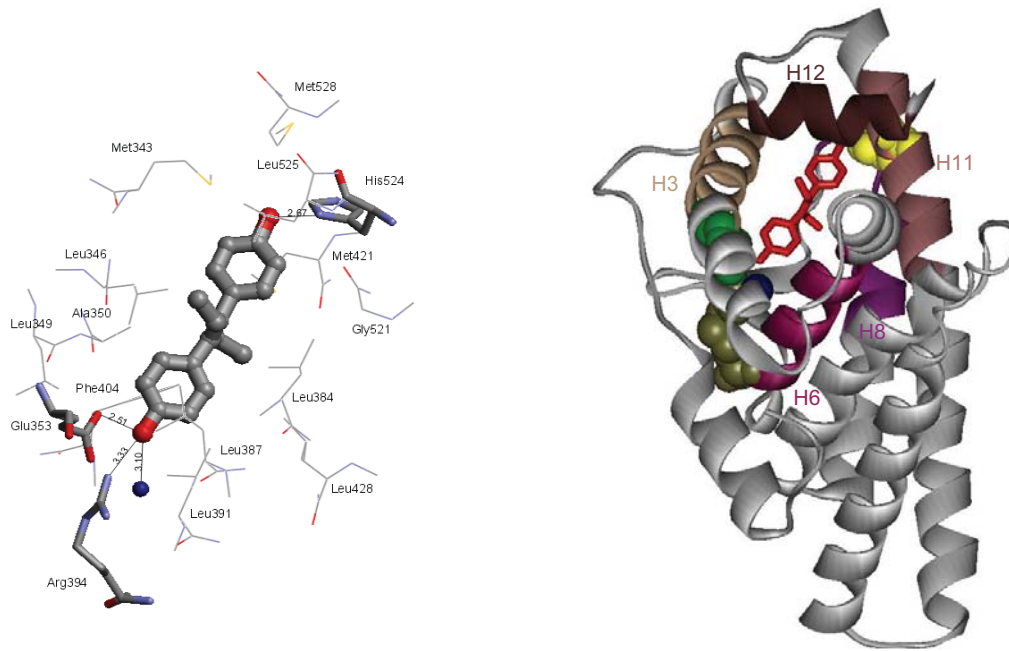


Abbildung 1-9: Links: Interaktionen von Diethylstilbestrol (DES) mit Aminosäuren der LBD des ER α . Rechts: Konformation des DES-LBD-Komplexes des ER α . Analog zu E2 werden Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu353 (hellgrün), Arg394 (dunkelgrün), einem Wassermolekül (blau) und His524 (gelb) aufgebaut. Die Ethylfunktionen ober- und unterhalb der E2-Bindungsebene gehen zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen ein [172].

Coumestrol, Genistein (GEN) sowie *trans*-Resveratrol gehören zur heterogenen Gruppe der Phytoestrogene, die mit geringer Affinität bevorzugt an ER β binden. Phytoestrogene wirken tumorpräventiv [174, 175, 176]. Da sie konzentrations- und gewebeabhängig sowohl estrogene als auch antiestrogenen Eigenschaften besitzen, werden sie auch als PhytoSERMs (SERMs, siehe Kapitel 1.3.3) bezeichnet. Auch sie können als zentrales Strukturelement ein Stilben (*trans*-Resveratrol, Abbildung 1-1) enthalten, das auch in verschiedene Ringsysteme integriert sein kann. Im GEN-ER β -LBD-Komplex konnte zwar eine E2-analoge Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen nachgewiesen werden, jedoch nimmt H12 keine „geschlossene“ Position ein [177], so dass die Koaktivatorenbindungsstelle (AF-2-Region) teilweise verdeckt wird. Der estrogenen bzw. antiestrogenen Charakter *in vivo* scheint deshalb stark von der Art und dem Ausmaß der Kofaktorenrekrutierung abhängig zu sein. Als weitere Ursachen für den tumorpräventiven Effekt wird ein negativer Feedback auf die E2-Bildung [178, 179, 180, 181] sowie ein induktiver Effekt auf den ER-Abbau [182] diskutiert. Daneben scheinen auch ER-unabhängige Wirkmechanismen zum Tragen zu kommen, da die antiproliferative Wirkung höherer GEN-Konzentrationen in MCF-7-Zellen nicht von E2 aufhebbar ist [183] und auch an ER-negativen Brustkrebszellen beobachtet werden kann [184, 185, 186]. Außerdem zeigen Untersuchungen an plasmidtransfizierten MCF-7-Zellen, dass Phytoestrogene wie

trans-Resveratrol bei Koinkubation mit E2 zu einer Potenzierung der E2-Wirkung führen (Superagonismus) [187, 188, 189].

1.3.3 Selektive Estrogenrezeptormodulatoren

Die vom DES abgeleiteten estrogenen Triphenylethylene besitzen einen weiteren Phenylsubstituenten. Therapeutisch bedeutsam sind jedoch nur Triphenylethylene mit basischer Seitenkette. Diese Verbindungen, wie das Prodrug Tamoxifen (Abbildung 1-1), das cytochromal (CYP450 3A4, 2D6) in den aktiven Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen umgewandelt wird, werden standardmäßig zur Behandlung von hormonsensitiven Brusttumoren eingesetzt.

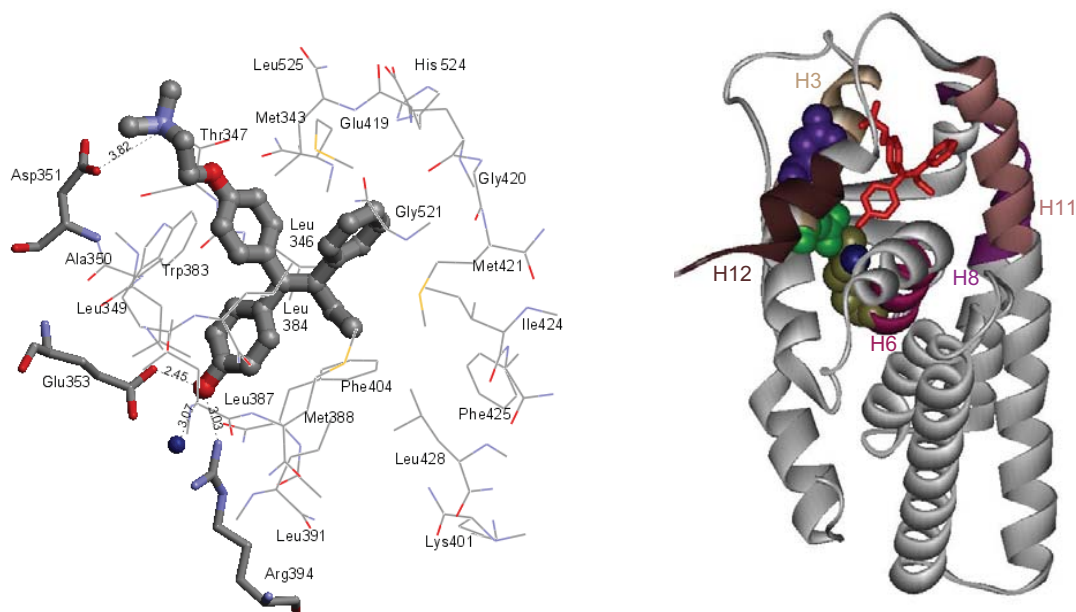


Abbildung 1-10: Links: Interaktionen von 4-OHT mit Aminosäuren der LBD des ER α . Rechts: Konformation des 4-OHT-LBD-Komplexes des ER α . Die Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu353 (hellgrün), Arg394 (dunkelgrün) und einem Wassermolekül (blau) werden DES-analog aufgebaut. Die Alkylgruppen der basischen Seitenkette interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen mit der LBD. Der basische Stickstoff bildet eine ionische Bindung mit Asp351 (lila). Dadurch wird die korrekte Ausrichtung von H12 verhindert [172].

Während die phenolische Gruppe von 4-OHT analog zu E2 eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glu353, Arg394 und einem Wassermolekül aufbaut, ragt die basische Seitenkette in von E2 ungenutzte Bereiche der Ligandenbindungstasche. Dort geht deren Alkylgruppe hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Aminosäureresten und der basische Seitenkettenstickstoff eine ionische Bindung mit Asp351 ein (Abbildung 1-10). Folglich wird die für die Ausbildung einer kompetenten AF-2 Region notwendige Orientierung von H12 verhindert und der Verschluss der Bindungstasche unterbleibt [190]. Anstelle dessen imitieren nun Aminosäuren von H12 (Leu540 - Leu544) die Ausbildung

einer NR-Box, binden selbst an die AF-2-Funktion und verhindern so die Koaktivatoranbindung und die Aktivierung der Transkription.

Wird die Transkriptionsaktivierung jedoch vornehmlich über AF-1 vermittelt, wirkt 4-OHT als Agonist. Die gewebeabhängige Dominanz von AF-1- oder AF-2-aktivierten Genen (Uterus vs. Brustgewebe) und die gewebespezifische Präsenz von Kofaktoren führen somit zu einer Gewebespezifität der agonistischen oder antagonistischen Wirkung, woraus sich der Begriff SERM entwickelt hat.

Die wichtigsten Therapieprobleme beim Einsatz von TAM und seiner Analoga sind die hohe Resistenzentwicklung (ca. 50%) [191, 192, 193] und das zwei- bis sechs erhöhte Auftreten von Endometriumkarzinomen [194, 195, 196]. Für letzteres scheint die metabolische Entstehung eines kanzerogenen α -Carbokations verantwortlich zu sein, das durch nukleophilen Angriff von Guanidin-N2 mit der DNA interkaliert und Strangbrüche verursacht [197, 198]. Es wird unter CYP450-Beteiligung nach α -Hydroxylierung in der Seitenkette, Sulfatierung und Abspaltung des Sulfatrests gebildet.

1.3.4 Tetrasubstituierte Fünfringsysteme

Eine Reihe estrogen wirksamer triarylierter ER-Liganden mit fünfgliedrigem Kernmolekül wurde von Mortensen und Stauffer beschrieben [199, 200, 201] (Abbildung 1-11). Gegenüber DES besteht aufgrund des integrierten Heterozyklus zwischen den nicht direkt benachbarten Aromaten ein etwas größerer O-O-Abstand (12.5 - 13.2 Å). Anhand von theoretischen Modellen wird dennoch eine E2-artige Interaktion mit der LBD des ER vorgeschlagen, jedoch stehen Kokristallisationsstudien noch aus.

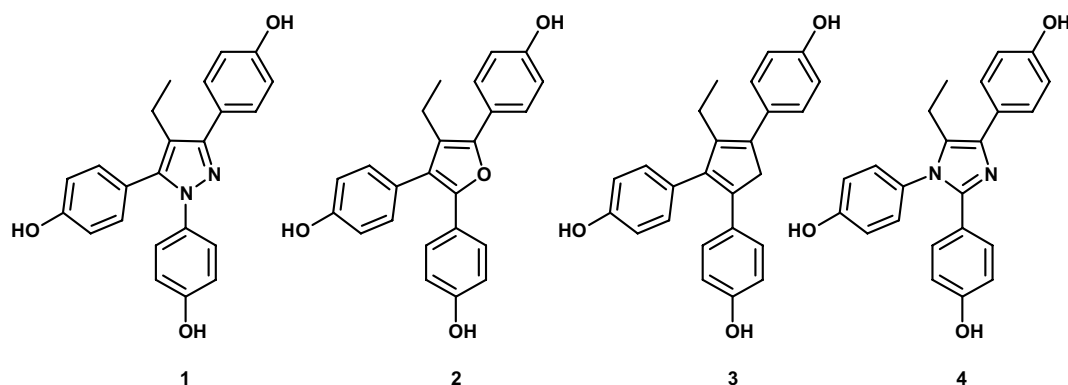


Abbildung 1-11: Triarylverbindungen mit fünfgliedrigem Kernmolekül.

Interessanterweise wird die Affinität dieser Verbindungen zum ER in hohem Maße vom Charakter des Kernmoleküls beeinflusst. Während alkylierte Triarylfurane (**2**) und -pyrazole (**1**) eine hohe Affinität zum ER α aufweisen [201], besitzen analoge Triaryl-1*H*-imidazole (**4**) bzw. -cyclopentadiene (**3**) eine deutlich geringere Rezeptorbindungsaffinität

(siehe Kapitel 2) [202, 203]. Außerdem lassen sich diese Verbindungen durch Substitution mit basischen Seitenketten in reine Antiestrogene überführen [204, 205].

1.3.5 Reine Antagonisten

Reine ER-Antagonisten, die sich durch eine äußerst lange Seitenkette in der Position 7 α oder 11 β des E2-Grundgerüsts auszeichnen, binden mit geringer Affinität an den ER. Neben steroidalen Verbindungen wie RU 58 668, ICI 182 780 (Fulvestrant, Faslodex[®]) oder ICI 164 384, sind auch nichtsteroidale ER-Antagonisten wie ZK 164 015 bekannt (Abbildung 1-2), die diesem Strukturprinzip folgen [113, 206].

Pike konnte 2001 durch Kokristallisation von ICI 164 384 in der LBD des ER β der Ratte [107], deren prinzipieller Aufbau der LBD des humanen ER β entspricht, eine E2-artige Interaktion der 3-OH-Gruppe mit Glu260 und Arg301 und der 17 β -OH-Gruppe mit His430 nachweisen (Abbildung 1-12). Durch die raumerfüllende Seitenkette in Position 7 α , die vom β -Kanal aufgenommen werden muss, ist der Gonankörper jedoch gegenüber E2 um 180° gedreht. Im Gegensatz zu SERMs, die den ER stabilisieren (Kapitel 1.2.5), führen reine Antagonisten zur vollständigen Destabilisierung von H12.

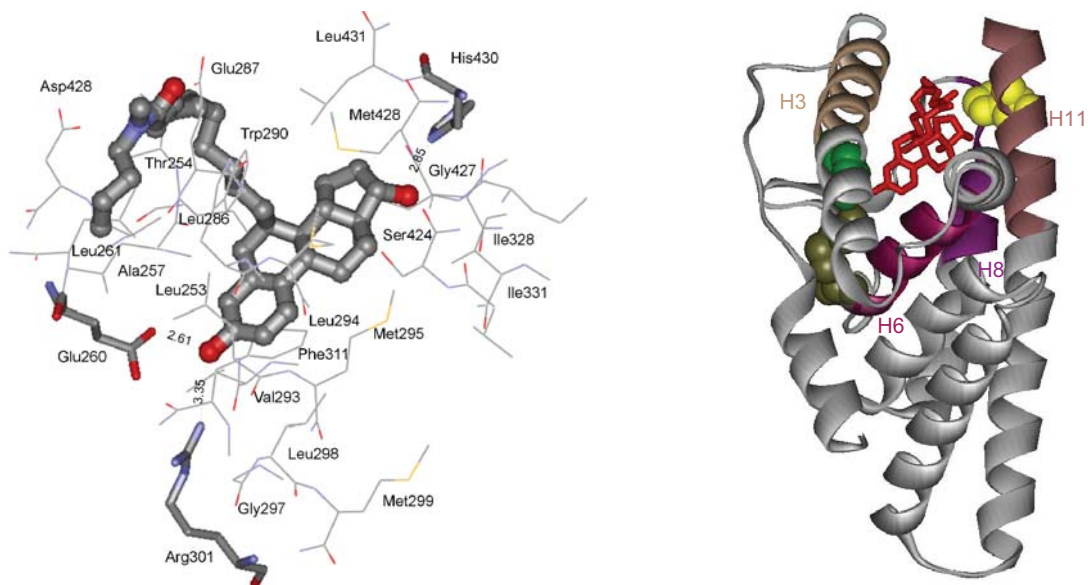


Abbildung 1-12: Links: Interaktionen von ICI 164 384 mit Aminosäuren der LBD des ER β der Ratte. Rechts: Konformation des ICI 164 384-LBD-Komplexes des ER β der Ratte. Analog zu E2 werden Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu260 (hellgrün), Arg301 (dunkelgrün) und His430 (gelb) aufgebaut. Die Seitenkette ragt weit über die Bindungstasche hinaus und verdrängt H12 [107].

Der Stickstoff in der Seitenkette bindet direkt an die Koaktivorenbindungsstelle. Darüber hinaus scheinen nun freiliegende Aminosäuren mit Korepressoren interagieren zu können [207]. Außerdem beeinflussen Verbindungen dieses Typs die Rezeptordimerisierung

[208]. Aufgrund ihres induktiven Effekts auf den ER-Abbau werden sie auch als SERDs (**s**elective **e**strogen **r**eceptor **d**own-regulators) bezeichnet [209, 210]. Fulvestrant (Faslodex[®]) wird seit 2004 in der Therapie des estrogenabhängigen postmenopausalen Mammakarzinoms verwendet und setzt sich derzeit wegen seiner guten Wirksamkeit ähnlich wie die Aromatasehemmer als Therapiestandard gegenüber Tamoxifen (Kapitel 1.3.3) durch. Aufgrund der fehlenden estrogenen Effekte können jedoch nachteilige Wirkungen auf die Knochenfestigkeit und das kardiovaskuläre System beobachtet werden [211].

1.3.6 Passive Antagonisten

Ein weiterer Bindungsmodus konnte bei Tetrahydrochrysenen gefunden werden, wo die DES-Struktur in ein rigides Ringsysteme integriert ist (Abbildung 1-13).

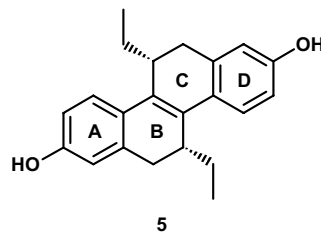


Abbildung 1-13: 5*R*,11*R*-5,11-cis-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol.

(5*R*,11*R*)-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol (**5**) bindet im ER α analog zu E2 und wirkt agonistisch (Abbildung 1-15).

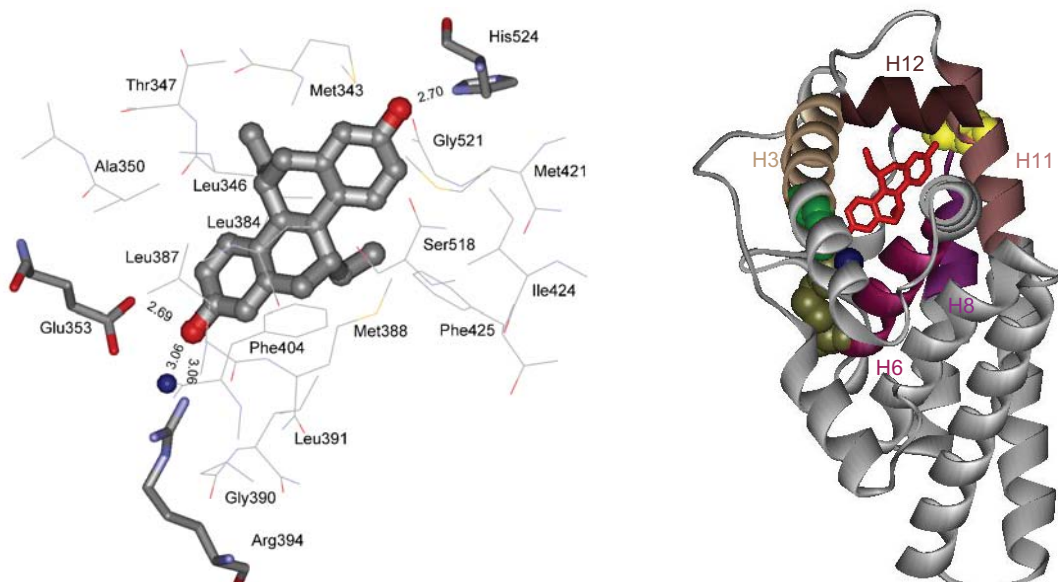


Abbildung 1-14: Links: Interaktionen von (5*R*,11*R*)-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol mit Aminosäuren der LBD des ER α . Rechts: (5*R*,11*R*)-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol (rot) interagiert über Wasserstoffbrücken analog zu E2 mit Glu353 (hellgrün), Arg394 (dunkelgrün) und einem Wassermolekül (blau) [212].

Im ER β dagegen ist das gesamte Tetrahydrochrysengrundgerüst durch sterische Interaktionen der Ethylgruppe mit der LBD um 5 Å in Richtung der Seitentasche von Asp351 (β -Kanal) verschoben. Während die 4-OH-Gruppe des A-Rings analog zu E2 bindet, interagiert deshalb die Hydroxygruppe des D-Rings anstelle mit His475 (His524 in ER α) mit Gly472 über eine Wasserstoffbrücke (Abbildung 1-15).

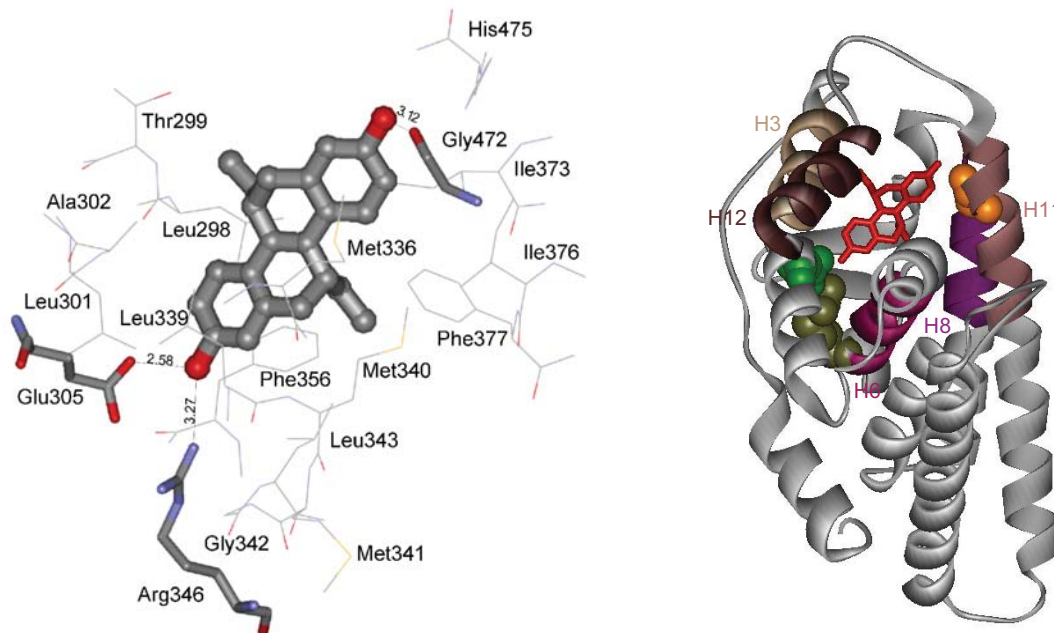


Abbildung 1-15: Links: (5R,11R)-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol in der LBD des ER β . Rechts: Die phenolische Gruppe des A-Rings interagiert analog zu E2 mit Glu305 (hellgrün), Arg346 (dunkelgrün). Aufgrund von Wechselwirkungen des ethylsubstituierten Tetrahydrochrysenengerüstes mit der LBD interagiert die Hydroxyfunktion des D-Rings mit Gly472 (orange) [212].

Letztlich kann Helix 12 die für die Ausbildung der AF-2-Region notwendige Orientierung nicht einnehmen, so dass die Aktivierung der Gentranskription unterbleibt. Da Helix 12 jedoch auch nicht an die Koaktivorenbindungsstelle bindet [212], wird dieser Bindungsmodus, in dem die nichtproduktive Konformation der Schlüsselaminosäuren in der LBD stabilisiert wird, als passiv antagonistisch bezeichnet. Das sterisch weniger gehinderte Dimethylderivat agiert an ER β als partieller Agonist [213].

1.4 Die Cyclooxygenasen

1.4.1 Die Rolle der COX in der Tumorgene

Kürzlich wurden Hinweise für einen zyklischen regulatorischen Zusammenhang zwischen den Signalwegen der COX (cyclooxygenase) und der Estrogene gefunden (Abbildung 1-16). Es konnte eine Korrelation zwischen der PGE₂-Menge und der Aromataseexpression im Zellversuch mit Brustkrebszellen gezeigt werden. Die Wechselwirkungen von COX und ER scheinen subtypspezifisch zu sein. Ungefähr 30-40% der ER α -positiven Mammakarzinome exprimieren hohe COX-2 Level (Kapitel 1.4.2), was mit einer schlechten Prognose für die Patientinnen verbunden ist [214, 215].

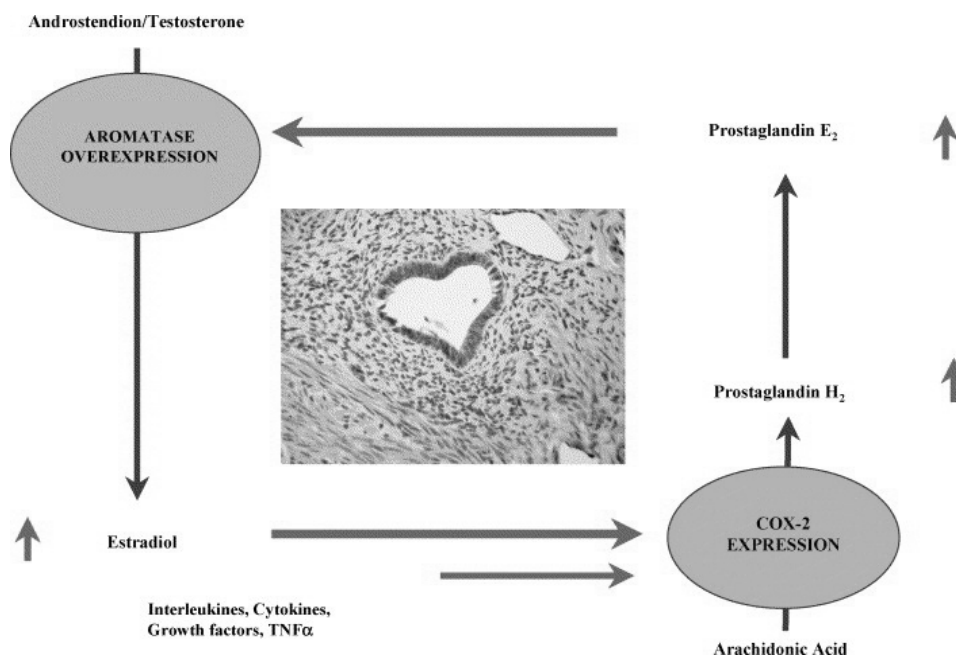


Abbildung 1-16: Einfluss der COX-2-Expression auf die Generierung von 17 β -Estradiol aus seinen inaktiven Vorstufen Androstendion und Testosteron durch die Steuerung der Aromataseaktivität [216].

Das COX-2-Produkt PGE₂ stimuliert die Expression von P450 CYP19 (Aromatase) [216, 217, 218, 219], die die 17 β -Estradiol-Bildung aus dessen androgenen Vorstufen katalysiert. Wiederum kann das in hormonabhängigen Brusttumoren wachstumsfördernde E2 neben vielen weiteren Stimuli die COX-2-Expression aktivieren [220, 221]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression und einem verminderten Antitumoreffekt von Tamoxifen in ER α -positiven Brustkrebszelllinien besteht. Als Ursache für diese Tamoxifenresistenz wird die Aktivierung der Proteinkinasen A und C durch PGE₂ angesehen [222].

Auch in vielen hormonunabhängigen Brusttumorzelllinien wie MDA-MB-231 [215, 223] sowie Kolon- oder Lungentumoren konnte eine Überexpression vor allem der induzierbaren COX-2 nachgewiesen werden [214]. Dabei besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression und der Angiogenese, der Invasivität sowie einer verminderten Apoptose [224]. Unselektive COX-Hemmer (NSAIDs, Kapitel 1.4.3) und selektive COX-2-Hemmer (Kapitel 1.4.4) verhinderten im Tierversuch die Bildung chemisch induzierter Mammakarzinome, jedoch waren nur letztere in manifesten Tumoren wirksam [225]. Deshalb wird vermutet, dass COX-1 vor allem bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt, während COX-2 vor allem das Tumorstadium und die Metastasierung beeinflusst [226]. In Studien wurde gezeigt, dass durch Langzeiteinnahme von NSAIDs wie ASS das Brustkrebsrisiko um 20-40% gesenkt werden kann [227]. Die Kombination des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib mit klassischen Zytostatika führte in Studien zu einer verbesserten Antitumorwirkung [228].

1.4.2 Funktionen und Isoformen der COX

Lipoxygenase (LOX) und Cyclooxygenase (COX) sind zentrale Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels. Während aus Arachidonsäure (AA) unter dem Einfluss von LOX verschiedene Leukotriene gebildet werden, katalysiert COX die Bildung von PGH_2 , welches die gemeinsame Vorstufe der Eicosanoide (Prostazykline, Prostaglandine und Thromboxane) darstellt. AA wird dazu durch Phospholipase A_2 aus Membranphospholipiden freigesetzt und anschließend von COX in zwei Folgereaktionen zu Prostaglandin H_2 (PGH_2) umgewandelt. COX besitzt dafür zwei räumlich voneinander getrennte, an gegenüberliegenden Enzymseiten gelegene, aktive Zentren, in denen Häm im Elektronentransfer eine zentrale Funktion hat [229].

Im ersten Schritt wird im Zentrum mit Cyclooxygenase-Aktivität der radikalische Charakter eines Hämradikalkations $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}]^{+\bullet}$ auf das benachbarte Tyr385 übertragen. Das entstandene $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}] \text{Tyr385}^\bullet$ abstrahiert das in seine Richtung orientierte *pro*-(13S)H von AA unter Bildung eines Arachidonylradikals. Nach Addition zweier Sauerstoffatome entsteht das zyklische Peroxidprodukt PGG_2 , welches zum Zentrum mit Peroxidase-Aktivität diffundiert und $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}] \text{Tyr385}^\bullet$. Letzteres überträgt sein ungepaartes Elektron auf das Protoporphyrin-Eisen unter Bildung von $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}]^{+\bullet}$. Im Zentrum mit glutathionabhängiger Peroxidase-Aktivität entsteht daraus durch Aufnahme eines Elektrons das ungeladene $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}]$, das ein weiteres Elektron aufnimmt sowie Sauerstoff abgibt. Das so gebildete $[\text{PPIX-Fe}^{3+}]$ reduziert die Peroxidgruppe von PGG_2 unter Bildung von PGH_2 und $[\text{PPIX-Fe}^{4+}=\text{O}]^{+\bullet}$ (Abbildung 1-17).

Das Hämsradikalkation kann erneut Tyr385 aktivieren. Aus PGH_2 werden anschließend von entsprechenden Synthasen Eicosanoide gebildet.

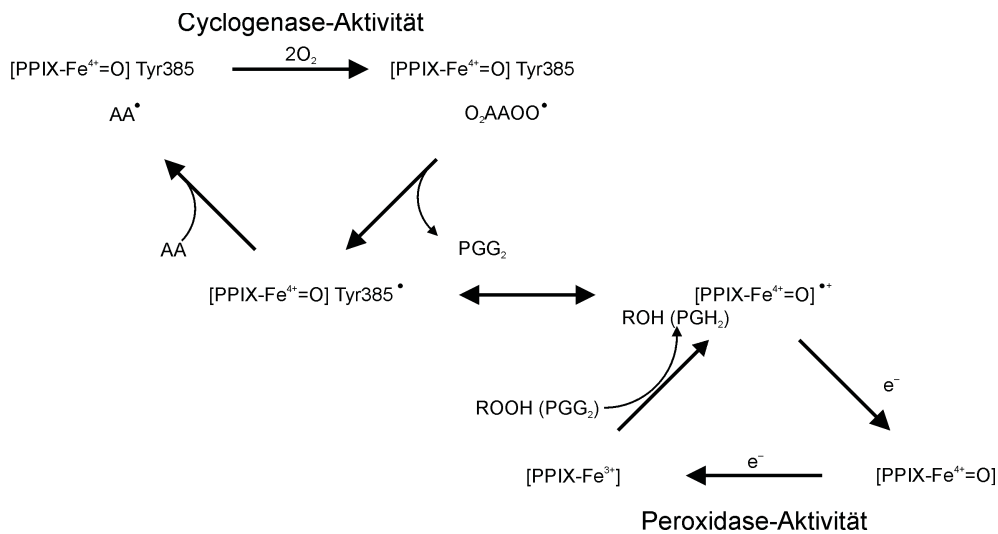


Abbildung 1-17: Mechanismus der COX-vermittelten Enzymkatalyse. Protoporphyrin IX (PPIX) und Eisen der Oxyferrylform ($\text{Fe}=\text{O}$) dienen als Hämmodell [230].

Man unterscheidet zwei Isoformen, COX-1 und COX-2, die als homodimere integrale Membranproteine an das Endoplasmatische Retikulum oder an Kernmembranen assoziiert sind. COX-1 wird von den meisten Zellen permanent exprimiert, wobei dessen Produkte wichtige physiologische Steuerungsfunktionen ausüben wie z. B. die Vasodilatation der Gefäße (PGE-Reihe), die Hemmung der Aggregation der Blutplättchen (PGI_2), die Hemmung der Magensäureproduktion (PGE-Reihe, PGI_2) oder die Regulierung der Uterusrelaxation (PGE-Reihe) und -kontraktion (PGF) im Menstruationszyklus [231]. Dagegen erfolgt die COX-2-Bildung in den meisten Geweben induziert. Es konnte jedoch auch eine permanente Bildung von COX-2 z. B. in der Niere, im Gefäßendothel, in den Testes und im Gehirn nachgewiesen werden [232, 233, 234]. Nach ihrer Stimulierung können bis zu 1000-mal höhere Induktionsniveaus erreicht werden als bei maximal aktivierter COX-1. Verschiedene Stimuli wie bakterielle Endotoxine, Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ [214], Wachstumsfaktoren wie EGF, Interferon- γ sowie Tyrosinkinase, die Protein-kinasen A und C, c-AMP, $\text{TGF}\alpha$ oder Hormone können die Bildung von COX-2 induzieren [235, 236, 237, 238, 239, 240, 241]. Da dieses Isoenzym neben der Entstehung und Unterhaltung entzündlicher Prozesse auch in der Tumorgenese eine große Bedeutung zu haben scheint, ist die Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren interessant. Da in COX-2 drei Isoleucine der COX-1 (Ile509, Ile523 und Ile434) gegen Val bzw. His513 (COX-1) gegen Arg ausgetauscht sind, besitzt es eine breitere Bindungstasche mit breiterem Eingangskanal. Dadurch ist die Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren mit raumfüllenden Substituenten möglich [242].

1.4.3 Unselektive COX-Hemmer

NSAIDs (non steroidal antiinflammatorical drugs) inhibieren die COX-Isoenzyme unselektiv (Abbildung 1-18). Dabei konkurrieren sie mit der Arachidonsäure um die Bindung im aktiven Zentrum mit Cyclooxygenase-Aktivität, ihr Einfluss auf die Peroxidase-Aktivität ist jedoch gering [229]. In der Bindungstasche von COX-1 bindet das Carboxylat saurer NSAIDs über Wasserstoffbrückenbindung zeitabhängig und reversibel an Arg120 [243]. Diese Aminosäure spielt bei der Bindung an COX-2 eine geringere Rolle, was indirekt zur COX-2-Selektivität nichtsaurer NSAIDs beiträgt. ASS stellt eine Ausnahme dar, da es durch Acetylierung von Ser530 (COX-1) bzw. Ser516 (COX-2) zu einer irreversiblen COX-Hemmung führt [244, 245, 246, 247]. Tyr355 wird für die Stereoselektivität der COX gegenüber NSAIDs verantwortlich gemacht [248, 249]. NSAIDs zeichnen sich durch ausgeprägte antiphlogistische Eigenschaften aus, sind aber aufgrund ihrer fehlenden COX-Selektivität ulzerogen.

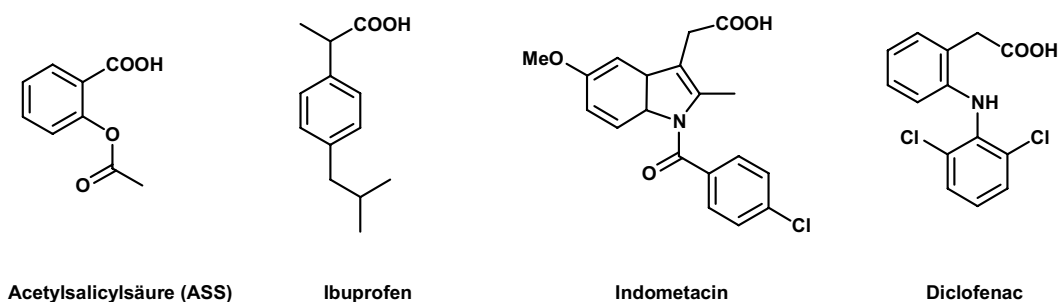


Abbildung 1-18: Unselektive COX-Hemmer (NSAIDs).

Außerdem konnten z. B. für ASS (an MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen) oder Indometacin (an H-460-Zellen) apoptotische Effekte gezeigt werden [250, 251].

1.4.4 Selektive COX-2-Hemmer

Hochselektive COX-2-Hemmer wie Celecoxib (COX-1: $IC_{50} = 19.02 \mu\text{M}$; COX-2: $IC_{50} = 0.03 \mu\text{M}$) oder Rofecoxib⁴ verfügen über raumerfüllende funktionelle Gruppen wie z. B. Sulfonsäureamid- oder Methansulfonylfunktionen, die von essentieller Bedeutung für die COX-2-Selektivität sind (Abbildung 1-19). Die Orientierung von SC-558 im Zentrum mit Cyclooxygenaseaktivität der COX-2 konnte 1996 von Kurumbail und Stallings [252] aufgeklärt werden. Dabei geht der Stickstoff N-2 eine Wasserstoffbrückenbindung zu Arg120 ein, der Arylring an C-5 ist in Richtung des Tyr385 sowie Ser530 orientiert. Das Sulfonamidmotiv interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit Gln192, Arg513 und Phe518 (siehe Kapitel 7, Abbildung 7-11).

⁴ Rofecoxib ist seit 10/2004 a. H.

In den vergangenen Jahren wurden neben Pyrazolen, Imidazolen und Isoxazolen auch COX-2-selektive Verbindungen entwickelt, die als zentrales Strukturelement ein Pyrrolsystem enthalten.

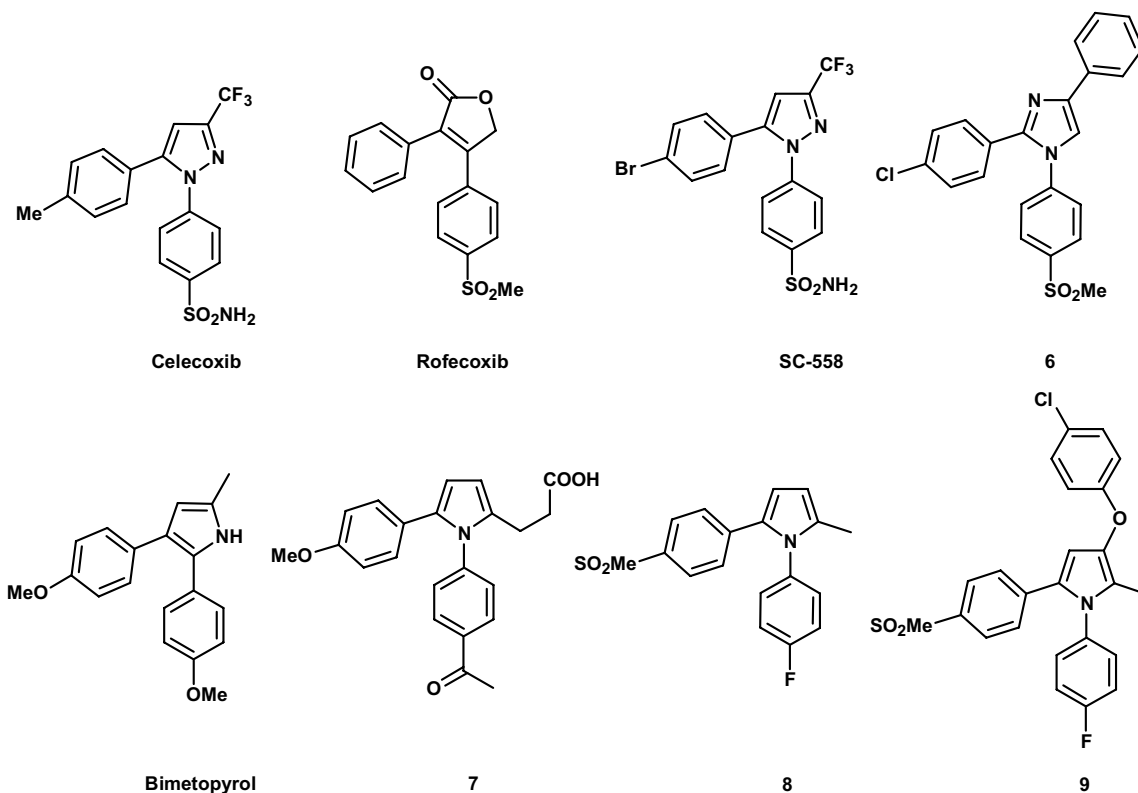


Abbildung 1-19: Sulfonsäureamid- oder Methansulfonylfunktionen als essentielle Strukturelemente für das Vorhandensein von COX-2-Selektivität.

Ausgehend vom 1972 synthetisierten Bimetopyrol, das ein vergleichbares Wirkspektrum zu unselektiven NSAIDs zeigte, stellte das 1,2-Diaryl-1*H*-pyrrol-3-yl-derivat **7** mit seiner geringen COX-2-Selektivität (COX-1: IC₅₀ = 25 μM, COX-2: IC₅₀ = 4.6 μM) eine Weiterentwicklung dar. Die Einführung einer Methansulfonylfunktion führte zu hochpotenten COX-2-selektiven Verbindungen wie **8** (IC₅₀: 0.06 μM) oder **9** (IC₅₀: 0.47 μM), deren Stellung großen Einfluss auf die COX-Selektivität ausübte. Während Verbindung **8** eine ausgeprägte COX-2-Selektivität (IC₅₀: COX-1/COX-2 >1700 μM) hat, ist ihr Stellungs-isomer (p-F→SO₂Me und p-SO₂Me→F) gegenüber COX völlig inaktiv [253, 254, 255, 256, 257].