

Einleitung

1 Einleitung

Der Estrogenrezeptor (ER) ist Angriffsort einer Vielzahl pharmazeutisch relevanter Pharmaka. Neben dem physiologischen Liganden Estradiol (E2) finden zahlreiche nichtsteroidale Liganden Verwendung zur Therapie und Prophylaxe von hormonabhängigen Tumoren, der Osteoporose und in der Hormonersatztherapie (HRT, **h**ormone **r**eplacement **t**herapy). Trotz der positiven E2-Wirkungen auf Knochen und möglicherweise auf das Zentrale Nervensystem (ZNS) ist die Anzahl der Frauen, die eine HRT länger als ein Jahr durchführen, relativ gering. Eine Ursache hierfür ist das E2-bedingte erhöhte Brustkrebsrisiko. Konsequenterweise führte dies zur Entwicklung neuer ER-Modulatoren, welche die nützlichen E2-Effekte in den meisten Zielorganen beibehalten, jedoch im Brustgewebe inaktiv sind (SERM) ^[1]. SERM (**s**elective **e**strogen **r**eceptor **m**odulator) wie Tamoxifen (TAM) und Raloxifen (RAL) zeigen gewebe selektiv agonistische oder antagonistische Wirkung (Abb. 8, Kap. 1.2.5).

Tamoxifen ist heute das Mittel der Wahl für die endokrine Therapie von Brusttumoren, die den ER aufweisen (ER-positiv). Neben antiestrogenen Wirkung auf das Brustgewebe treten estrogenartige Effekte auf die Knochen ^[2] und das Endometrium ^[3] auf. Das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken, steigt unter Tamoxifentherapie um das Vierfache im Vergleich zu unbehandelten Frauen ^[4]. Trotz des Vorhandenseins von ER versagt die Therapie bei etwa einem Drittel der behandelten Patienten ^[5]. RAL wird zur Prävention und Behandlung der Osteoporose eingesetzt ^[6]. Es wirkt wie TAM als Antiestrogen in der Brust und als Estrogen in den Knochen, zeigt aber nicht die stimulierenden Eigenschaften auf das Endometrium ^[7].

Da der ER ein weit verbreitetes Target vieler Pharmaka darstellt, ist seine Visualisierung in den Zellen Inhalt zahlreicher Forschungsarbeiten. Die Bestimmung seiner Konzentration und Verteilung in humanen Brusttumoren liefert wichtige prognostische Informationen, die für die Wahl der am besten geeigneten Therapie nötig sind ^[8]. Die zurzeit gebräuchlichen biochemischen Assays geben nur den durchschnittlichen Wert der Rezeptorkonzentration an. Es wird keine Aussage hinsichtlich des Verhältnisses der ER-positiven Zellen zur gesamten Tumor-

zellpopulation getroffen ^[9]. Die zelluläre Heterogenität liefert möglicherweise eine Erklärung für die variierenden Hormontherapieerfolge in ER-positiven Fällen ^[10]. Zur Visualisierung des ER kommt derzeit die Autoradiographie zum Einsatz, die sich tritiummarkierter Liganden bedient. Sie ist für die weit verbreitete Anwendung ungeeignet, da sie die Anfertigung von gefrorenen 4-µm-Schnitten, geringe Temperaturen und lange Expositionszeiten erfordert ^[9]. Auch Methoden, basierend auf monoklonalen ER-Antikörpern, sind in der Literatur beschrieben ^[11-13]. Die Identifizierung von ER-Varianten in Brusttumoren, bei denen Teile der DNA- oder Ligandenbindungsdomäne fehlen ^[14, 15], kann bei derzeit angewendeten immunologischen Methoden in einigen Fällen zu irreführenden Ergebnissen führen.

Ein weiterer Versuch zur Visualisierung des ER ist die Konjugation von ER-Liganden mit Fluoreszenzmarkern. Fluoreszierende Liganden liefern die Möglichkeit, die Heterogenität der Rezeptorexpression von Zelle zu Zelle zu bestimmen ^[16, 17]. Die Verknüpfung des Liganden mit den sperrigen Fluorophoren führt jedoch häufig zur drastischen Reduktion der Rezeptoraffinität ^[18, 19]. Auch im Arbeitskreis Gust durchgeführte Versuche, TAM-Analoga mit Rhodamin B zu markieren, führten zu fluoreszierenden Verbindungen, die jedoch zu geringe ER-Affinitäten aufweisen, um in Rezeptorbindungsstudien eingesetzt werden zu können ^[20]. Weitaus viel versprechender ist die Darstellung inhärent fluoreszierender ER-Liganden (Kap. 8.3.3).

Die Donor-Akzeptor-Tetrahydrochrysen (THC, **1**) stellen die ersten inhärent fluoreszierenden Verbindungen mit ausreichender Rezeptoraffinität (RBA = 22-85%) dar (Abb. 1). Sie ermöglichen die Visualisierung des ER unter Verwendung konventioneller Epifluoreszenzmikroskopie. Die physiologische ER-Konzentration der untersuchten Brustkrebszelllinien ist für die Fluoreszenzmarkierung mittels THC nicht ausreichend. Erst nach Anhebung des ER-Levels durch Transfektion ist eine Visualisierung möglich. Die THC sind für die Bestimmung der intrazellulären Verteilung von ER-Mutanten geeignet ^[21]. Für die Ermittlung der Konzentration und Verteilung der ER in Brustkarzinomen bei der klinischen Diagnose sind sie jedoch ungeeignet. Hierfür bedarf es der weiteren Entwicklung fluoreszierender Liganden, in Kombination mit verbesserten Fluoreszenztechniken.

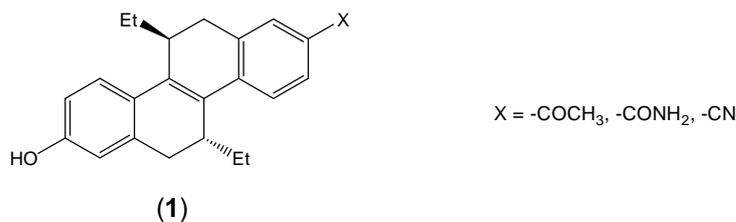


Abb. 1: Fluoreszierende Donor-Akzeptor-Tetrahydrochrysene.

Eine interessante Struktur hinsichtlich ihrer Fluoreszenz und ihrer weit verbreiteten pharmakologischen Anwendung stellt die Klasse der substituierten Benzimidazole dar. Die Benzimidazolstruktur findet sich in einer Vielzahl pharmazeutisch relevanter Verbindungen wieder (Abb. 2) und ist in Anthelminthika, H₁-Antagonisten ^[22] und Protonenpumpenhemmern ^[23] anzutreffen. Neben diesen bereits zugelassenen Pharmaka sind in der Literatur die Wirkungen von Benzimidazol-Derivaten als 5-HT₃-Antagonisten ^[24], Inhibitoren der HIV-1 Reversen Transkriptase ^[25] und als Antibiotika ^[26] beschrieben. Die Wirkungsmechanismen sind dabei sehr verschieden. Neben der Blockierung der H⁺/K⁺-ATPase durch den Protonenpumpenhemmer Omeprazol **2** interferiert das Anthelminthikum Tiabendazol **3** mit den Mikrotubuli und hemmt so die Glucoseaufnahme der Parasiten.

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die antiproliferative Wirkung einiger Benzimidazole (Abb. 2). Sie können ihre Wirkung über die Hemmung von Tyrosinkinasen entfalten. Es ist bekannt, dass solche Kinasen in Brust-, Kolon- und Pankreastumoren exprimiert werden. Folglich können Inhibitoren von Tyrosinkinasen als selektive Hemmstoffe einiger Tumorarten eingesetzt werden ^[27]. Eine Reihe von 5-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-benzimidazolen (**4**) mit unterschiedlichen Substituenten in Position N(1) und C(2) zeichnet sich neben ihrer Estrogenität durch ERβ-Selektivität aus und ist damit frei von unerwünschten Nebenwirkungen auf Brust und Uterus ^[28]. Aber auch durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) können 1*H*-Benzimidazol-4-carboxamide den Erfolg einer Krebstherapie erheblich beeinflussen ^[29]. PARP erleichtert die Reparatur von DNA-Strangbrüchen ^[30] und ist an der Resistenz der Krebszellen gegenüber potentiell DNA-schädigenden Substanzen ^[31] beteiligt.

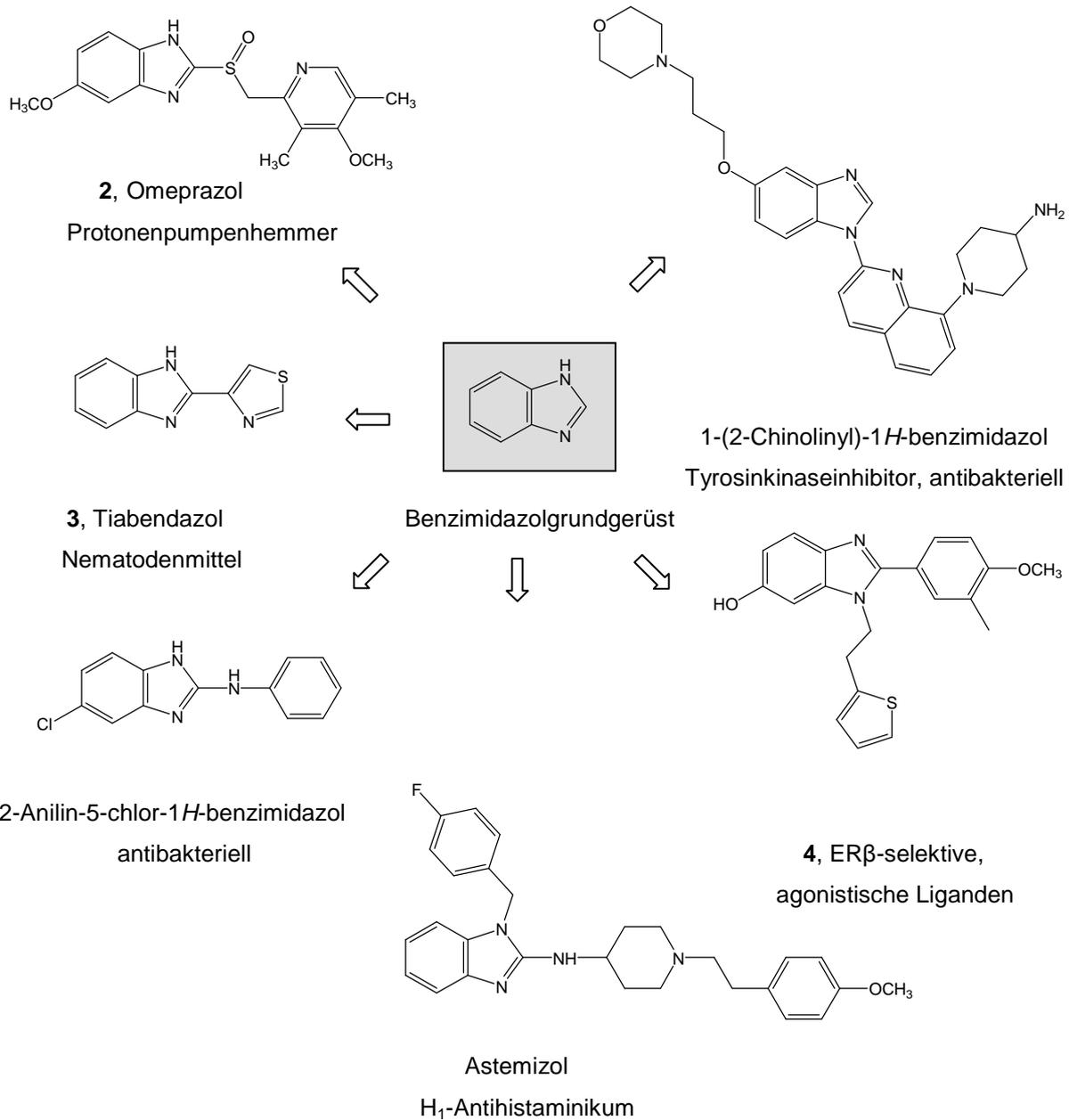


Abb. 2: Benzimidazol-Derivate mit pharmazeutisch relevanter Wirkung.

1.1 Estrogene und Phytoestrogene

Die drei nativen Formen der endogenen Estrogene sind 17 β -Estradiol **5**, Estron **6** und Estriol **7** (Abb. 3), wovon 17 β -Estradiol die stärkste Wirkung aufweist. Sie gehören neben Gluko- und Mineralokortikoiden zur Klasse der Steroidhormone. Estradiol wird hauptsächlich in den Ovarien gebildet. Obwohl auch Estron in den Ovarien produziert wird, bildet die Hauptquelle die extraglanduläre Konversion von

Androstendion z.B. in der Haut, im Haarfollikel und im Knochengewebe. Bestimmte Gewebe enthalten die Estradioldehydrogenase, die Estradiol und Estron ineinander umwandelt. Das pharmakologisch wenig aktive Estriol ist besonders während der Schwangerschaft reichlich vorhanden. Nach der Sekretion in den Blutkreislauf bleiben nur 2-3% der Estrogene ungebunden. Der größte Teil (ca. 60%) ist an Albumin und an SHBG (ca. 38%) („sex hormone binding globulin“) gebunden [32]. Estrogene finden bei Millionen von Frauen Anwendung als orale Kontrazeptiva [33] und in der HRT [34]. Sie zeigen positive Effekte auf die Knochen [35], das Kardiovaskularsystem [36], das ZNS [37] und spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane [38]. Auch in zahlreichen Pflanzen existieren Verbindungen mit estrogenartiger Wirkung (Phytoestrogene). So zeigt z.B. Genistein **8** (Abb. 8, Kap. 1.2.5), ein Isoflavon aus der Sojabohne, estrogene und antikanzerogene Wirkung [39]. Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass asiatische Frauen aufgrund ihrer sojareichen Ernährung ein 4-6-fach geringeres Risiko haben an Brustkrebs zu erkranken [40].

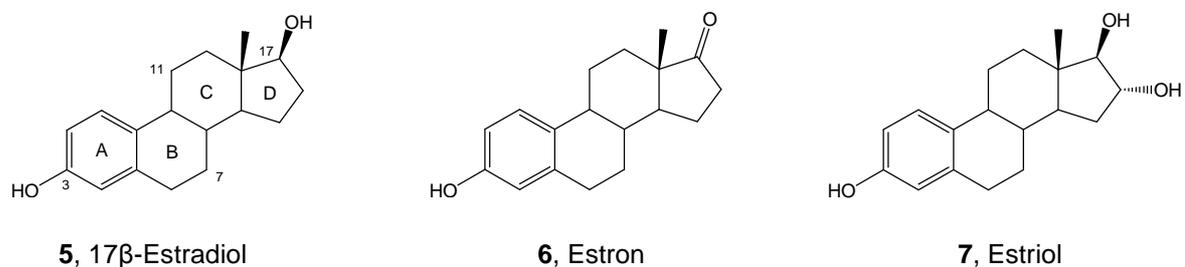


Abb. 3: Native Formen der endogenen Estrogene.

1.2 Der Estrogenrezeptor

1.2.1 Allgemeines

Die biologischen Effekte des Estradiols werden über zwei Estrogenrezeptorsubtypen, ER α und ER β , vermittelt ^[41]. Ende der 50er Jahre synthetisierten Jensen und Jacobson das erste hochaktive tritiummarkierte 17 β -Estradiol und konnten so den Uterus, die Vagina und die Hirnanhangdrüse als Zielgewebe identifizieren ^[42]. ER α wurde Mitte der 60er Jahre identifiziert und isoliert ^[43, 44]. Die Klonierung des ER α aus humanen MCF-7 Zellen (**M**ichigan **C**ancer **F**oundation) gelang Green ^[45] und Greene ^[46] im Jahre 1986. Zu dieser Zeit nahm man an, dass nur ein ER-Protein existiert, das in allen Zielgeweben identisch ist. Nur 30 Jahre nach der Entdeckung des ER α wurde ein zweiter ER, der ER β , im Menschen, der Ratte und Maus entdeckt ^[47]. Die Existenz zweier ER-Subtypen liefert eine mögliche Erklärung für die Gewebeselektivität der SERM. ER β wird vor allem in der Prostata, den Eierstöcken, den Hoden sowie im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Im ZNS, Herz-Kreislaufsystem, Urogenitaltrakt und in den Knochen liegen beide ER-Subtypen nebeneinander vor. Obwohl ER β auch in der Brustdrüse exprimiert wird, spielt ER α hier die entscheidene Rolle ^[48]. Beim Auftreten von Brusttumoren verschiebt sich das Verhältnis der ER-Subtypen zugunsten des ER α ^[49, 50]. Auch im Uterus überwiegt ER α gegenüber ER β . ER α tritt außerdem in der Leber auf. Ein dritter Rezeptor-Subtyp, ER γ , wurde in einem Teleostfisch, dem Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*, identifiziert und geklont ^[51].

ER α und ER β sind Produkte verschiedener Gene, die auf verschiedenen Chromosomen liegen. ER α ist auf Chromosom 6 ^[52] und ER β auf Chromosom 14 ^[53] lokalisiert. Sie zeigen gewebe- und zelltypspezifische Expression. 17 β -Estradiol weist für beide Rezeptoren ähnliche Affinitäten auf ^[54]. Die humanen Estrogenrezeptoren hER α und hER β ¹⁾ sind kernständige Steroidhormonrezeptoren ^[55] und gehören zur Klasse der ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktoren ^[56, 57].

¹⁾ Im nachfolgenden Text wird der humane Estrogenrezeptor hER mit ER abgekürzt.

Neuere Arbeiten von Levin belegen das Auftreten von membranständigen ER in MCF-7 Zellen, die eine mögliche Erklärung für die sehr rasch einsetzenden Wirkungen des Estradiols liefern ^[58]. Hierzu zählen z.B. die von Pietras und Szego 1977 beschriebene schnelle Generierung von cAMP ^[59] und die Aktivierung des Calciumflusses ^[60] unter E2-Einfluss. Expression von Einzelstrang cDNA für ER α oder ER β in CHO Zellen resultierte sowohl in membranären als auch nukleären Poolen des Rezeptors, was auf eine große Ähnlichkeit beider Rezeptortypen schließen lässt ^[61].

1.2.2 Aufbau des Estrogenrezeptors

ER α besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66 kDa ^[45, 46]. ER β wird in drei Isoformen eingeteilt. Der ursprüngliche humane ER β -Klon verschlüsselt ein Protein aus 485 Aminosäuren (ER β short) ^[47]. Die Klonierung einer zusätzlichen N-terminalen Sequenz ergab ein Protein aus 530 Aminosäuren (ER β 1 long²), mit einem Molekulargewicht von 59 kDa ^[62]. Eine weitere Isoform, ER β 2 (ER β cx) aus 495 Aminosäuren, ist weder in der Lage Liganden zu binden, noch die Transkription von estrogensensitiven Reportergenen zu aktivieren ^[63].

Wie andere Steroidhormonrezeptoren können die beiden ER in sechs funktionelle Domänen A-F (Abb. 4) eingeteilt werden ^[64].

Der N-Terminus wird durch die A/B-Domäne gebildet. Sie ist Träger der Aktivierungsfunktion-1 (AF-1) und aktiviert die Transkription, indem sie mit dem Präinitiationskomplex der Transkription oder Koaktivatoren in Wechselwirkung tritt ^[68, 69]. Die Aktivierung des ER über die konstitutive AF-1 ist ligandenunabhängig und steht in Zusammenhang mit dem Phosphorylierungsstatus des Rezeptors ^[70-72].

²⁾ Die Variante des Estrogenrezeptors β , ER β 1 long, wird im Weiteren mit ER β abgekürzt.

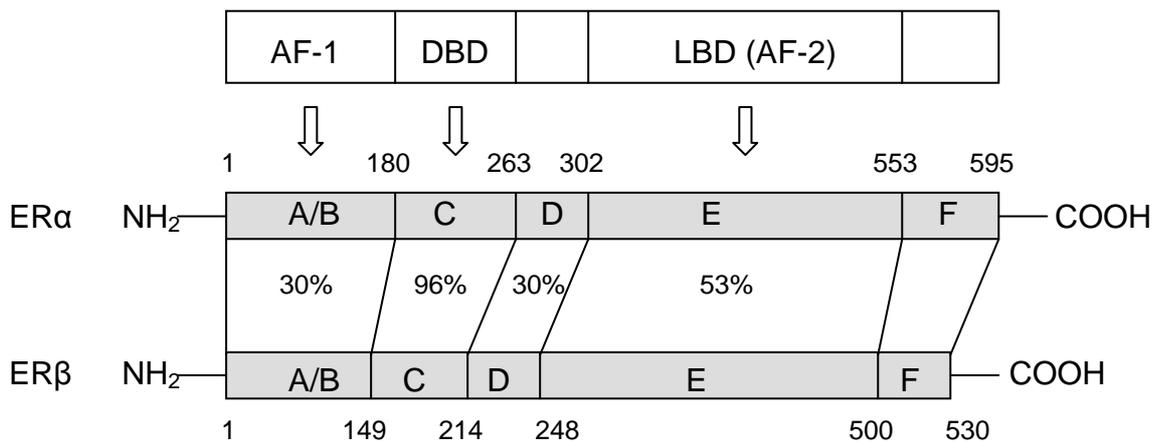


Abb. 4: Funktionelle Domänen des ER α und ER β mit Angabe der Aminosäurenummern und der Homologie zwischen ER α und ER β long nach Green ^[65], Gronemeyer ^[66] und Tsai ^[67].

Ser 118 in der A/B-Region des ER α ^[71, 73] sowie Ser 106 und Ser 124 des ER β ^[74, 75] sind wichtige Phosphorylierungsstellen für die Aktivierung über die Ras-MAP-Kinase-Signalkaskade. AF-1 steht in engem Zusammenhang mit der gewebe selektiven partiellen agonistischen Wirkung von z.B. TAM ^[76, 77]. Eine zweite Aktivierungsfunktion (AF-2) ist am C-terminalen Ende der Domäne E (Ligandenbindungsdomäne, LBD) lokalisiert ^[78]. Die LBD besteht aus ca. 250 Aminosäuren und ist sehr hydrophob ^[79]. AF-2 ist ligandenabhängig und interagiert mit einer Vielzahl von Transkriptionskoaktivatoren ^[80]. Die Transkription kann über AF-1 und AF-2 unabhängig voneinander aktiviert werden, jedoch wirken sie in den meisten Fällen synergistisch ^[77, 81].

Des Weiteren beinhaltet Domäne E neben der ligandenabhängigen AF-2 die ligandenunabhängigen AF-2a ^[82] und AF-2b ^[83], ein „nuclear localization signal“ (NLS), eine Dimerisierungsregion und eine „heat shock protein 90“ (HSP 90) bindende Region ^[84, 85]. Die zentrale Domäne C (DNA-Bindungsdomäne, DBD) ist für die Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb des Promotors der estrogenabhängigen Zielgene, den sogenannten ERE („estrogen response elements“) und für die Rezeptordimerisierung verantwortlich ^[86-88]. Sie ist die am höchsten konservierte Region der Steroidhormonrezeptoren und besteht aus zwei Zinkfingermotiven (Abb. 5). Je vier Cysteinreste sind dabei um ein Zinkion tetraedrisch angeordnet. Die

P-Box umfasst sechs Aminosäuren des ersten Zinkfingers und schließt den dritten und vierten Cysteinrest ein. Sie ist in die spezifische Interaktion des Rezeptors mit der DNA verwickelt. Die Aminosäuren des zweiten Zinkfingers bilden die D-Box und sind in die Dimerisierung involviert ^[67, 89].

Die wenig charakterisierte Domäne D ermöglicht durch ihre Variabilität die der Hormonbindung folgende Rezeptorkonformationsänderung. Des Weiteren ist sie eventuell Angriffspunkt für Koaktivatoren ^[90]. Das Carboxyende wird durch Domäne F gebildet. Ihre Funktion ist nicht eindeutig geklärt ^[67], sie scheint jedoch die Transaktivierungsstärke von AF-1 und AF-2 zu beeinflussen ^[91].

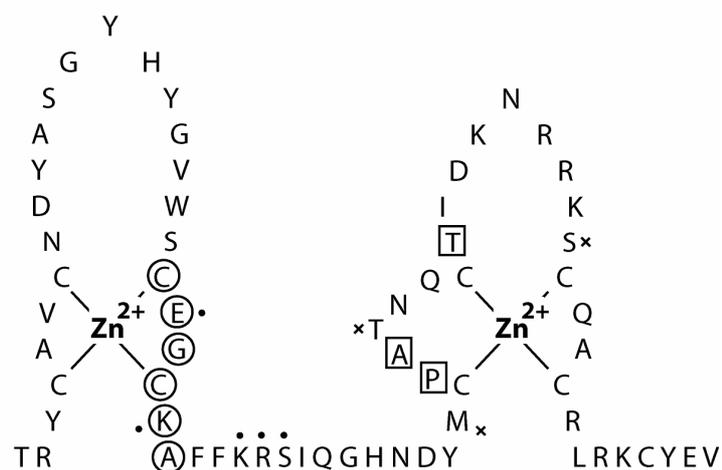


Abb. 5: Zinkfinger motive des humanen ER α . Die eingekreisten Aminosäuren kennzeichnen die P-Box, mit einem Punkt markierten AS stehen in direktem Kontakt zu Basenpaaren des ERE, Kontaktstellen für die Dimerisierung sind umrahmt, Kreuze kennzeichnen Reste, die an der Dimerisierung über geordnete Wassermoleküle beteiligt sind.

Die Homologie von ER α und ER β liegt im Bereich der LBD bei 53%. Eine deutlich höhere Übereinstimmung (96%) weist die DNA-Bindungsdomäne beider Rezeptor-Subtypen auf ^[92].

1.2.3 Rezeptortransformation und Genaktivierung

Nach Passage der Plasmamembran kann der Ligand entweder durch passive Diffusion oder durch NLS-vermittelten aktiven Transport ^[93] in den Zellkern gelangen. In Abwesenheit eines Liganden liegt der Estrogenrezeptor in seiner inaktiven Form an einen Proteinkomplex, der das HSP90 enthält, gebunden vor ^[94-96]. Zusätzlich kann er aber auch mit den Korepressoren SMRT („silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors“) oder NCoR („nuclear receptor corepressor“) assoziiert sein. Gelangt ein Ligand in die Zelle, bindet er zunächst an die LBD des Rezeptors, bewirkt so seine Konformationsänderung, die wiederum die Dissoziation des HSP90, Dimerisierung und Bindung an die DNA hervorruft ^[55, 63]. Des Weiteren wird durch die Ligandenbindung eine Phosphorylierung des Rezeptors bewirkt. Der Phosphorylierungsgrad steigt nach Bindung eines Estrogens bzw. Antiestrogens um das 3-4-fache ^[97] und erhöht die Affinität zu bestimmten DNA-Sequenzen und seine Transaktivierungsstärke. Die Bindung des ER an ERE erfolgt als Dimer. Die vorangegangene Konformationsänderung des Rezeptors stellt die Voraussetzung für die Dimerisierung dar ^[98]. Es werden sowohl Homo- als auch Heterodimere aus ER α und ER β gebildet ^[99, 100]. Die Affinität der Heterodimere und der ER α -Homodimere zur DNA ist vergleichbar, während die der ER β -Homodimere geringer ist ^[100]. Die biologische Rolle der ER α / β -Heterodimere in Anwesenheit der jeweiligen Homodimere ist unbekannt ^[54]. Durch Beteiligung von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren binden die Rezeptordimere an ihre korrespondierenden DNA-Sequenzen und lösen die Transkription aus. Abbildung 6 stellt ein Modell der Transkriptionsaktivierung nach Tsai ^[67] und Katzenellenbogen ^[101] dar.

Der Komplex aus ER-Dimer und einer Reihe weiterer Proteine bindet neben dem ERE auch an die TATA-Box ^[67]. Sie ist 25-30 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes lokalisiert. Zuerst bindet der Transkriptionsfaktor TFIID, der sich aus dem „TATA box binding protein“ (TBP) und mehreren TBP assoziierten Faktoren (TAFs) zusammensetzt, an die TATA-Sequenz innerhalb des Promotors ^[102]. Durch die folgende Koordinierung von TFIIB, RNA-Polymerase II und TFIIF bildet sich der minimale Präinitiationskomplex der Transkription ^[103]. Für ein hohes Transkriptionslevel ist die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren erforderlich ^[104]. Es ist nicht geklärt, an welcher Stelle der Rezeptor bei der Bildung

eines stabilen Präinitiationskomplexes eingreift. Arbeiten von Ing et al. konnten zeigen, dass Steroidhormonrezeptoren spezifisch mit TFIIB interagieren ^[105]. Die RNA-Polymerase II beginnt aus diesem Initiationskomplex heraus mit der Bildung der mRNA, die wiederum für die Proteinexpression in den Ribosomen nötig ist.

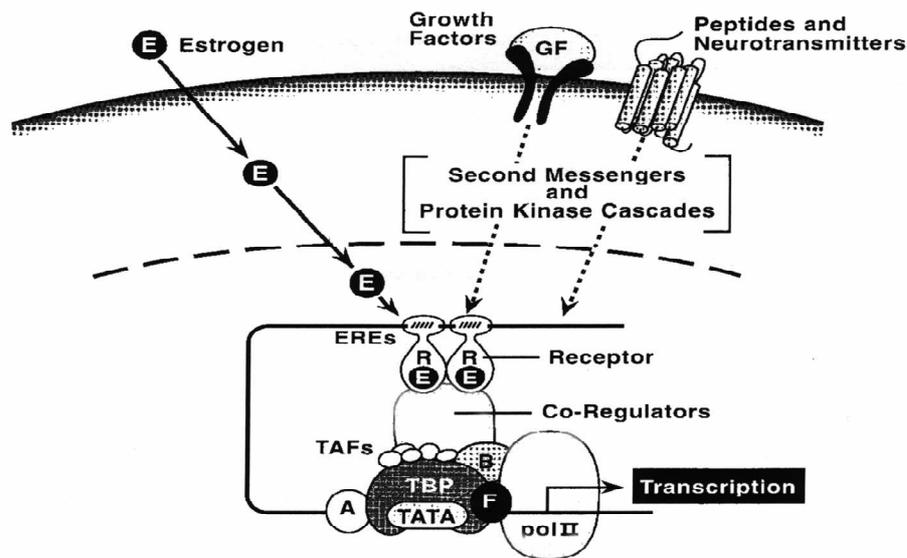


Abb. 6: Modell der ER-vermittelten Transkriptionsregulierung nach Katzenellenbogen ^[101] und Tsai ^[67]. E: Estrogen, R: Rezeptor, ERE: „estrogen response element“, GF: „growth factor“, TBP: TATA-bindendes Protein, TAFs: TBP-assoziierte Faktoren, pol II: RNA-Polymerase II.

Neben dem bereits beschriebenen klassischen Weg der Transkriptionsaktivierung, durch ER α und ER β über ERE in der Promotor-Region der Zielgene ^[106, 107], konnten weitere Möglichkeiten der Genaktivierung nachgewiesen werden. Der E2-ER α -Komplex vermittelt außerdem die Signaltransduktion über den AP-1-Bereich („activating protein-1“) eines Reporterkonstrukts, während der E2-ER β -Komplex inaktiv ist ^[108]. Interessanterweise sind SERM-ER β -Komplexe in der Lage die Genaktivierung über AP-1 zu induzieren ^[109, 110]. Auch durch Interaktion von E2 mit GC-reichen Promoterelementen über SP-1 („stimulating protein-1“) kann die Genexpression ausgelöst werden. Dabei ist AF-1 des ER α für die Aktivierung von SP-1 verantwortlich ^[111].

1.2.4 Koregulatoren und Wachstumsfaktoren

Für eine akkurate und effiziente hormonabhängige Transkriptionskontrolle sind neben Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und basalen Transkriptionsfaktoren, Interaktionen mit einem Komplex koregulatorisch wirksamer Proteine erforderlich (Koaktivatoren) ^[112]. Sie dienen als Brücke zwischen dem aktivierten Rezeptor und dem basalen Transkriptionskomplex ^[112, 113] und verbessern die Transkription. Die Koaktivatoren interagieren mit der AF-2 über kurze leucinreiche Abschnitte (z.B. LXXLL), der sogenannten NR-Box und übertragen so die Signale, die vom Liganden ausgehen, zum Transkriptionsapparat ^[114, 115]. Die Helices 3, 4, 5 und 12 des ER bilden die Kontaktfläche der LBD ^[116-120], die in ER α und ER β unterschiedlich ist ^[121]. Eine Vielzahl von Koaktivatoren (SRC-1, ERAP, TRAP220) des ER ist in der Literatur beschrieben ^[122-124]. Viele Koaktivatoren zeigen intrinsische Histonacetylaseaktivität ^[125]. Durch die Assoziation der DNA an Histone und Organisation als Nukleosomen wird die Transkription unterdrückt. Die Histonacetyltransferase acetyliert Lysinreste am N-Terminus (Abb. 7) der Histone 3 und 4 im Chromatingerüst und bewirkt dadurch eine Verringerung der Affinität der Histone zur DNA. Als Folge dessen wird die Bildung des Präinitiationskomplexes erleichtert und die RNA-Polymerase II kann die Transkription aktivieren ^[126-130]. Koaktivatoren sind nicht in der Lage mit freiem Rezeptor bzw. antagonistisch gebundenen ER zu interagieren.

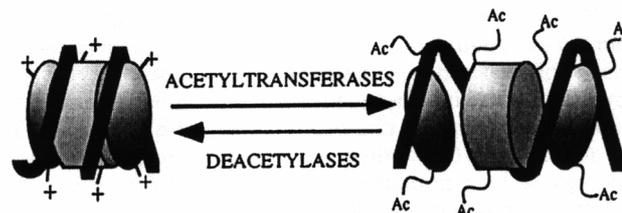


Abb. 7: Katalytische Übertragung von Acetylgruppen auf die terminalen Aminogruppen der Lysinreste der Histone durch die Histonacetyltransferase.

In Abwesenheit eines Liganden sind einige nukleäre Rezeptoren mit Korepressoren wie z.B. SMRT^[131] und NCoR^[132] assoziiert. Sie binden ebenfalls über das LXXLL-Motiv^[133] an die Koaktivorenbindungsstelle des ER und führen u.a. zur Rekrutierung von Histondeacetylasen^[134], die durch Deacetylierung der Histone zur Hemmung der Transkription führen. Die Interaktion mit dem ungebundenen Rezeptor wird durch Entfernung von Helix 12 oder durch Anwesenheit von Rezeptorantagonisten verbessert^[131]. Korepressoren binden nicht an den agonistisch gebundenen Rezeptor^[112], während die Assoziation an den antagonistisch gebundenen Rezeptor essentiell für die antagonistische Wirkung ist^[134]. Sie sind in der Lage, durch einen bisher nicht geklärten Mechanismus, die agonistische Wirkung von Antiestrogenen wie TAM zu verhindern^[90]. Die Transkriptionsaktivität wird über den Phosphorylierungsstatus des ER moduliert. Neben der konventionellen hormonabhängigen Aktivierung des Rezeptors kann diese auch hormonunabhängig über die Modulation von Kinasen und Phosphatasen erfolgen^[49]. Ein Beispiel ist die IGF-1 („insulin-like growth faktor“) und EGF („epidermal growth faktor“) vermittelte Phosphorylierung des ER über die MAPK, die so zur Aktivierung des ER in Abwesenheit eines Agonisten führt^[71, 73]. TGF- β stellt dagegen einen wachstumshemmenden Faktor dar^[135].

1.2.5 Liganden des Estrogenrezeptors

Neben dem physiologischen Liganden 17 β -Estradiol, existiert eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Strukturen, die eine Affinität zum Estrogenrezeptor aufweisen (Abb. 8). Hierzu zählen u.a. Phytoestrogene (Genistein **8**, Coumestrol **9**), die synthetischen Estrogene (Diethylstilbestrol (DES) **10**, Hexestrol **11**) und chlorierte Pestizide (o,p'-DDT **12**). Auch Phenolrot **13**, ein pH-Indikator in Zellkulturmedien, zeigt signifikante estrogenartige Wirkung^[136]. E2 besitzt zu beiden ER-Subtypen etwa die gleiche Bindungsaffinität^[47]. Aber auch eine Vielzahl weiterer synthetischer Liganden wie z.B. DES, Hexestrol, RAL **14** und TAM **15** weist keine Rezeptorselektivität auf^[137]. Für Coumestrol und Genistein konnte hingegen, mit einer 20-fach höheren Affinität für ER β , eine Subtypselektivität gezeigt werden^[138].

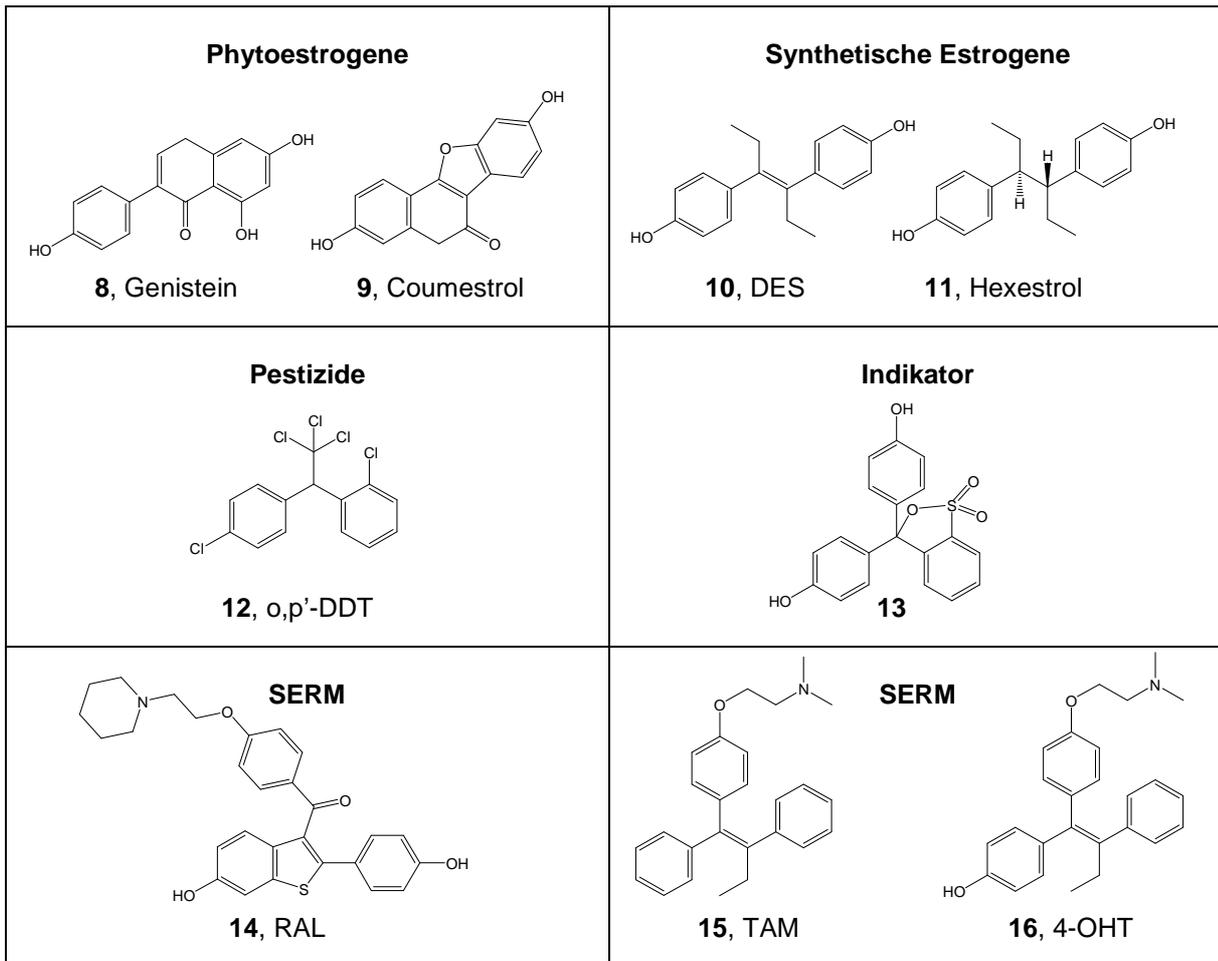


Abb. 8: Liganden des ER.

Daneben wurden in den vergangenen Jahren hochselektive synthetische Liganden entwickelt. Dazu gehören z.B. ER α -selektive triarylierte 1*H*-Pyrazole und Furane ^[139], deren agonistische Wirkung durch Einführung einer basischen Seitenkette in eine ebenfalls ER α -selektive antagonistische Wirkung überführt werden konnte ^[140, 141]. Eine besondere Bedeutung haben die so genannten SERM, wie Raloxifen und TAM, sowie dessen aktiver Metabolit 4-Hydroxytamoxifen **16** (4-OHT), die durch Gewebeselektivität gekennzeichnet sind.

Die Untersuchung der agonistischen/antagonistischen Wirkung am ER erfolgt in unserem Arbeitskreis an MCF-7 2a Zellen, die durch das Vorhandensein des ER α charakterisiert sind. Aus diesem Grund steht dieser bei nachfolgenden Betrachtungen im Vordergrund.

1.2.6 Interaktion des physiologischen Liganden E2 mit der LBD des ER α

Durch Kokristallisation der LBD des ER α mit dem endogenen Estrogen 17 β -Estradiol gelang es Brzozowski 1997 die Orientierung des E2 in der LBD aufzuklären ^[116] (Abb. 9). Die Hormonerkennung wird durch eine Kombination spezifischer Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen erreicht. Dabei geht die phenolische Gruppe des A-Rings Wechselwirkungen mit der Carboxylatgruppe des Glu 353 und der Guanidiniumgruppe des Arg 394 sowie einem inkorporierten Wassermolekül ein. Die 17 β -Hydroxygruppe des D-Rings bildet eine Wasserstoffbrücke zum His 524 aus. Der O-O Abstand der OH-Gruppen des E2 beträgt 10.9 Å ^[79]. Die hydrophoben Kontakte sind auf den A-Ring, die Verbindungsstelle zwischen A- und B-Ring sowie den D-Ring konzentriert. Die Ligandenbindungstasche ist mit 450 Å³ etwa doppelt so groß wie das Volumen eines Estradiolmoleküls (245 Å³), so dass große unbesetzte Bereiche ober- und unterhalb des Moleküllerns existieren. Helix 12 verschließt die Ligandenbindungstasche und kommt dabei in Kontakt mit den Helices 3, 5, 6 und 11. Zum Liganden selbst hat Helix 12 keinen Kontakt. Diese präzise Positionierung von Helix 12 ist Voraussetzung für die Transkriptionsaktivierung und ist für die Generierung einer kompetenten AF-2-Region und für die Interaktion mit Koaktivatoren erforderlich ^[120].

1.2.7 Nicht-steroidale Agonisten

In Analogie zum 17 β -Estradiol bindet auch der nicht-steroidale Agonist Diethylstilbestrol. Eine der phenolischen Hydroxygruppen bildet Wasserstoffbrücken zum Glu 353, Arg 394 und einem inkorporierten Wassermolekül aus. Trotzdem die zweite Hydroxygruppe 1.7 Å von der Position der 17 β -Hydroxygruppe des E2 entfernt ist, finden auch hier Wechselwirkungen mit dem Imidazolring des His 524 statt (Abb. 10). Des Weiteren sind aber auch Kontakte zu finden, die E2 nicht eingeht. Die Ethylgruppen besetzen Taschen, die ober- und unterhalb der Molekülebene des E2 liegen. Nach Ligandenbindung wird die hydrophobe Bindungstasche wiederum durch Helix 12 verschlossen ^[120].

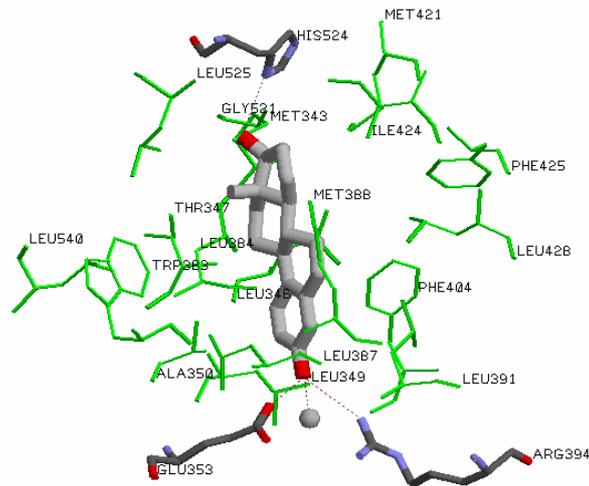


Abb. 9: Röntgenkristallstruktur der LBD des ER α , kokristallisiert mit dem physiologischen Liganden E2, nach Brzozowski ^[116]. Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken der 3-Hydroxygruppe mit den Aminosäuren Glu 353, Arg 394 und einem Wasser bzw. der 17 β -OH-Gruppe zum His 524.

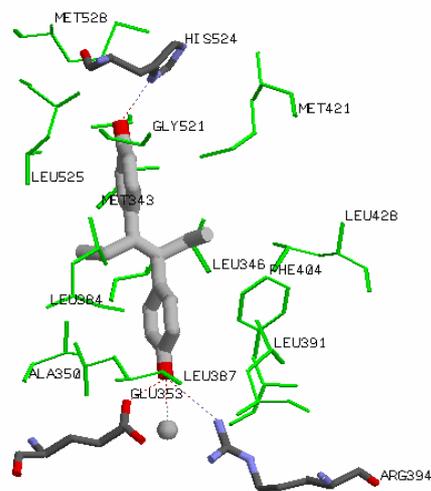


Abb. 10: Wechselwirkungen des nicht-steroidalen ER-Agonisten DES mit der LBD des ER α nach Shiau ^[120]. Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxygruppen und den Aminosäuren Glu 353, Arg 394, His 524 und einem Wassermolekül.

1.2.8 „Aktive“ Antagonisten

Shiau gelang 1998 die Aufklärung der Kristallstruktur des hER α mit dem kokristallisiertem selektiven Antagonisten 4-Hydroxytamoxifen ^[120]. Auch von Raloxifen ist die Interaktion mit dem ER α aus Röntgenkristallstrukturen bekannt ^[116]. Sowohl RAL als auch 4-OHT bilden analog E2 Wasserstoffbrücken zu Glu 353, Arg 394 und einem konservierten Wassermolekül aus (Abb. 11). Die phenolische Gruppe des RAL ermöglicht eine weitere H-Brücke zum His 524, zu der 4-OHT aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe am C-Ring nicht befähigt ist. Die flexible protonierte Dimethylaminoethylseitenkette des 4-OHT bildet eine Salzbrücke zur Carboxylatgruppe des Asp 351 aus, während der Piperidinring der RAL-Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asp 351 eingeht.

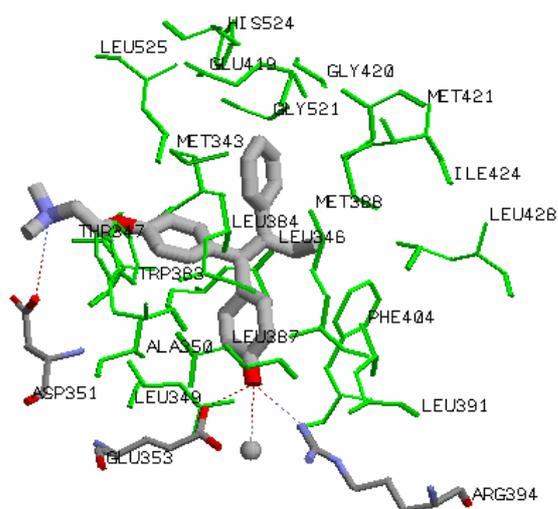
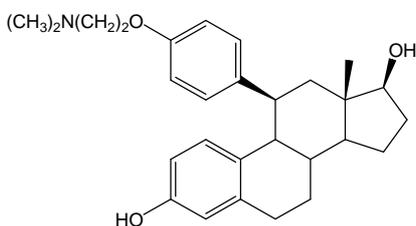


Abb. 11: Kokristallisation der LBD des ER α mit 4-OHT nach Shiau ^[120]. Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Glu 353, Arg 394 und Asp 351 und einem inkorporierten Wassermolekül.

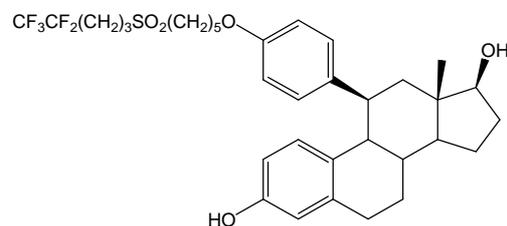
Das Volumen und die Wechselwirkung der antiestrogenen Seitenkette mit Asp 351 verhindern die Reorientierung der Helix 12 und somit das Verschließen der Bindungstasche ^[142]. Die Ausbildung einer funktionstüchtigen AF-2 ist nicht mehr möglich. Des Weiteren interagiert Helix 12 mit der Koaktivatorbindungsstelle des ER α .

1.2.9 „Reine“ Antagonisten

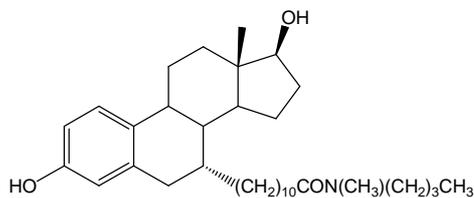
Die Verbindungen dieser Klasse zeichnen sich durch eine ausschließlich antagonistische Wirkung aus. Hierzu gehören RU 39 411 (**17**), RU 58 668 (**18**), ICI 164 384 (**19**) und ICI 182 780 (**20**, Faslodex) (Abb. 12). Neben einem steroidal Grundgerüst sind sie durch eine lange Seitenkette, die nicht zwingend eine basische Funktion enthalten muss, in Position 7 α oder 11 β gekennzeichnet.



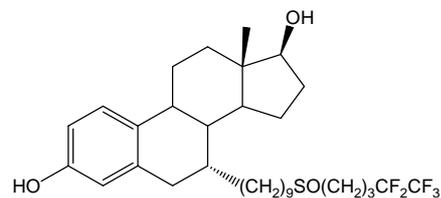
17, RU 39 411



18, RU 58 668



19, ICI 164 384



20, ICI 182 780 (Faslodex)

Abb. 12: „Reine“ ER-Antagonisten.

2001 gelang Pike die Aufklärung der LBD des ER β der Ratte durch Kokristallisation mit dem reinen Antagonisten ICI 164 384 ^[143] (Abb. 13), während für den ER α keine Röntgenkristallstrukturen mit reinen Antagonisten existieren. Im Gegensatz zu den SERM, die als AF-2-Antagonisten wirken, rufen die „reinen“ Antagonisten eine Inhibierung der AF-1- und AF-2-Aktivität hervor. Die Lage von ICI 164 384 in der LBD wird durch die lange 7 α -Seitenkette bestimmt. Vorangegangene Studien haben einen engen Kanal (11 β -Kanal) identifiziert, der die analogen Seitenketten von RAL und 4-OHT beherbergt ^[116, 120]. Um die Seitenkette von ICI 164 384 auf eine ähnliche

Weise zu platzieren, muss der Steroidkörper 180° um die Achse zwischen den beiden Hydroxygruppen gedreht werden. Die Wasserstoffbrückenbindungen bleiben dabei weitestgehend unberührt. Die phenolische OH-Gruppe des A-Rings interagiert mit Glu 260 (Glu 353), Arg 301 (Arg 394) und einem konservierten Wassermolekül, die 17β -Hydroxygruppe mit His 430 (His 524). Als Konsequenz des gedrehten Bindungsmodus ist die Änderung der lipophilen Wechselwirkungen zu sehen. Die N-(n-butyl)-N-methyl-undecanamidkette verlässt die Bindungstasche.

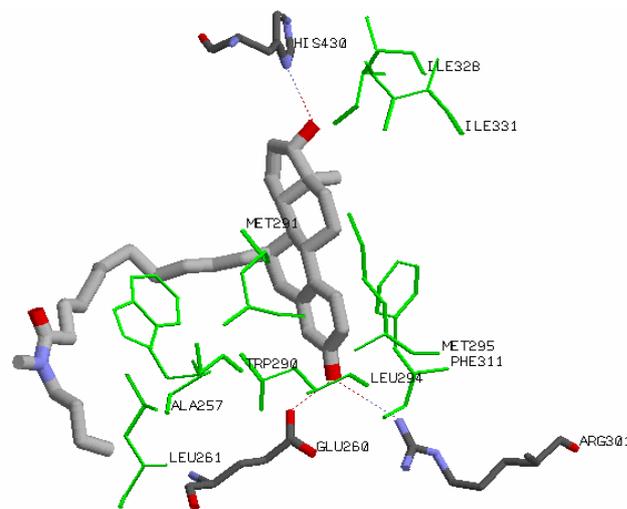


Abb. 13: Orientierung des reinen Antagonisten ICI 164 384 in der LBD des ER β der Ratte nach Pike ^[143]. Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken der Hydroxygruppen zu Glu 260, Arg 301 und His 430.

Analog RAL und TAM verhindert der 7α -Substituent das Verschließen der Bindungstasche durch Helix 12. Zusätzlich verhindert die terminale Amidgruppe durch Bindung an die Koaktivatorbindungsstelle die stabile Orientierung der Helix 12. Eine kompetente AF-2 Region kann nicht ausgebildet werden. Der Mechanismus der AF-1 Inhibierung ist unklar. Es ist möglich, dass nun freiliegende Aminosäuren mit Korepressoren interagieren können ^[144], auch eine Neutralisation von AF-1 durch Helix 12 ist denkbar.

1.2.10 „Passive“ Antagonisten

Die bisher betrachteten Antagonisten zeichnen sich durch eine voluminöse Seitenkette aus. Wie aus Röntgenkristallstrukturen von 4-OHT-ER α ^[120], RAL-ER α ^[116] und ICI 164 384-ER β ^[143] ersichtlich wurde, ragt diese Seitenkette aus der Ligandenbindungstasche durch eine Öffnung, die von den Helices 3, 5, 6 und 11 gebildet wird, heraus. Helix 12 kann ihre agonistische Konformation nicht einnehmen. In der Literatur finden sich aber auch einige ER-Antagonisten, die eine dem 4-OHT, RAL oder ICI 164 384 analoge Seitenkette nicht aufweisen ^[145]. An dieser Stelle sei hier die Klasse der Tetrahydrochrysene (THC) erwähnt. Das (5*R*,11*R*)-Enantiomer des 5,11-cis-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diols ist ein Agonist am ER α , während es trotz fehlender Seitenkette an ER β antagonistisch wirkt ^[146, 147]. Im ER α wird eine dem E2 analoge Position eingenommen ^[148]. Die Hydroxygruppe am A-Ring geht Wasserstoffbrücken mit Glu 353, Arg 394 und einem Wassermolekül ein, während die Hydroxygruppe an C(8) mit His 524 in Kontakt tritt (Abb. 14). Helix 12 nimmt die gewohnte agonistische Konformation ein.

In der LBD des ER β treten weiterhin H-Brücken zu Glu 303 (Glu 353) und Arg 346 (Arg 394) auf. Die Interaktion der Hydroxygruppe in Position 8 mit dem His 524 analogen His 475 wird durch die Wechselwirkung mit Gly 472 ersetzt. Aufgrund der sterischen Interaktion der Ethylgruppe am B-Ring ist das gesamte Tetrahydrochrysenengerüst um 5 Å in Richtung der Seitentasche des Asp 351 (β -Kanal) verschoben. Daraus resultiert eine Verschiebung der Aminosäuren um Leu 476 und Met 479, so dass eine konstruktive Wechselwirkung mit der Helix 12 nicht mehr möglich ist. Helix 12 nimmt keine agonistgebundene Konformation ein.

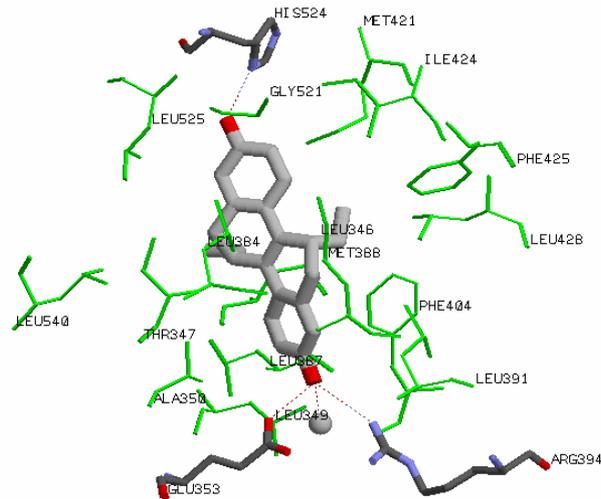


Abb. 14: Kokristallisierte LBD des ER α mit 5,11-cis-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol nach Shiao^[148]. Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Glu 353, Arg 394, His 524 und einem Wassermolekül.

1.3 Der Adenosinrezeptor

1.3.1 Aufbau des Adenosinrezeptors

Adenosinrezeptoren (AR) gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren^[149], die typischerweise aus sieben transmembranären Helices bestehen^[150]. Sie sind extrazelluläre, membranständige Nukleosidrezeptoren^[151] und oft mit Adenylatcyclasen (AC) gekoppelt^[152]. AR findet man verteilt im ganzen Körper, mit der höchsten Dichte im Gehirn. Abbildung 15 zeigt die schematische Darstellung des Adenosinrezeptor-Adenylatcyclase-Systems.

Die Einteilung erfolgt in vier Gruppen: A₁, A_{2a}, A_{2b} und A₃^[153, 154]. Der physiologische Agonist der AR ist Adenosin **21** (Abb. 16). Zur Aktivierung von A₁ und A_{2a} sind Konzentrationen von nur 10⁻⁸-10⁻⁷ M Adenosin nötig, während A_{2b} und A₃ erst im mikromolaren Bereich (ca. 10⁻⁶-10⁻⁵ M) aktiviert werden^[151]. Die physiologische Adenosinkonzentration von 10⁻⁷ M kann unter Sauerstoffmangel, z.B. bei Ischämie auf 10⁻⁵ M ansteigen. Das bedeutet auch, dass A₁ und A_{2a} unter normalen Bedingungen aktiviert werden, während die Adenosinkonzentration zur Aktivierung von A_{2b} und A₃ nur unter extremen, z.B. pathologischen Bedingungen ausreicht^[155].

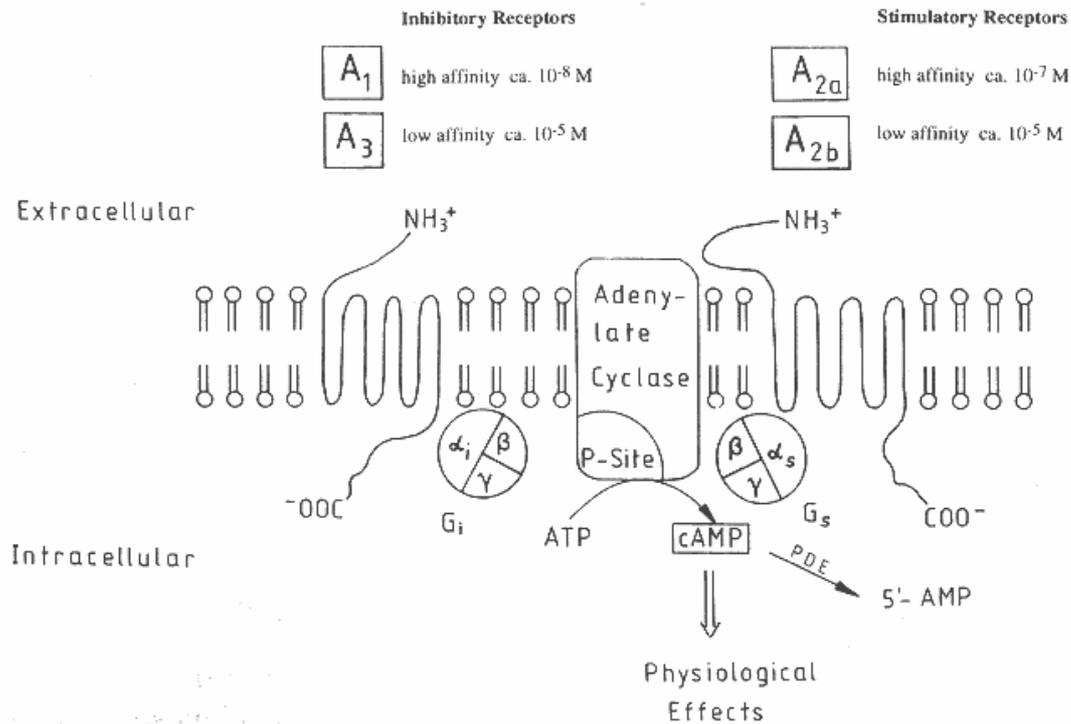
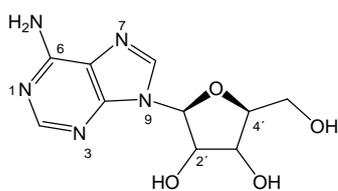


Abb. 15: Schematische Darstellung der Adenylatcyclase-gekoppelten AR nach Christa E. Müller ^[151].

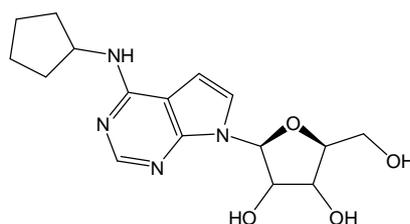
1.3.2 Liganden des Adenosinrezeptors

1.3.2.1 Agonisten des Adenosinrezeptors

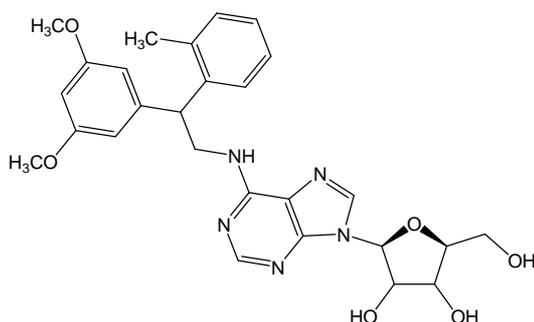
Alle AR leiten sich vom physiologischen Agonisten Adenosin **21** ab. Nur geringfügige Modifikationen am Ribosemolekül sind erlaubt, um die AR-Affinität und intrinsische Aktivität beizubehalten. Für hohe agonistische Wirkung und hohe Affinität sind die 3'- und besonders die 2'-Hydroxygruppen essentiell. Der Adenosinteil lässt stärkere Veränderungen mit Substitution am N(6) und C(2) zu ^[156]. Abbildung 16 zeigt eine Auswahl von Adenosinrezeptor-Agonisten.



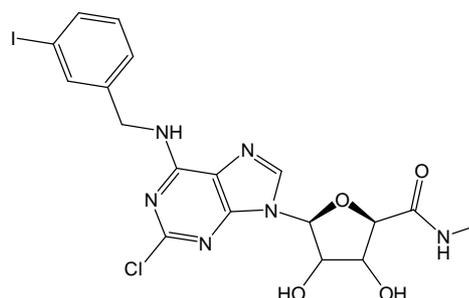
21, Adenosin
A₁-AR-Agonist



CPA
A₁-AR-Agonist



DPMA
A₂-AR-Agonist

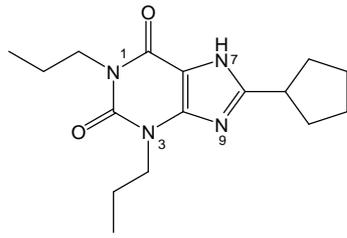
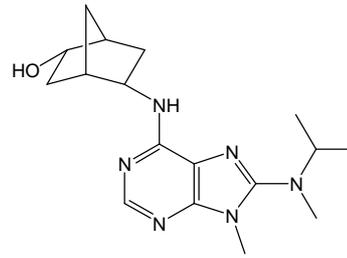


CI-IB-MECA
A₃-AR-Agonist

Abb. 16: A₁-, A₂- und A₃-AR-Agonisten.

1.3.2.2 Antagonisten des Adenosinrezeptors

Die größte Auswahl potenter, selektiver Antagonisten verschiedener struktureller Klassen ist für den A₁-AR-Subtyp verfügbar (Abb. 17). Theophyllin und Coffein sind die ersten beschriebenen AR-Antagonisten. Sie weisen geringe AR-Affinitäten im mikromolaren Bereich auf und zeigen keine Selektivität zwischen A₁- und A₂-AR. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (**22**, DPCPX oder DPX) ist ein gebräuchlicher Standard-A₁-AR-Antagonist mit 170-facher Selektivität gegenüber dem A_{2a}-AR. Eine unsubstituierte NH-Gruppe in 7-Position der Xanthine ist für die Bindung an den A₁-AR als Wasserstoffdonator vorteilhaft^[157]. Durch Substitution der 8-Position durch Aryl- oder Cycloalkylgruppen kann die A₁-AR-Affinität enorm gesteigert werden^[158].

**22**, DPCPX (DPX)Xanthin-Derivat, A₁-AR-Antagonist**23**, WRC-0571Adenin-Derivat, A₁-AR-Antagonist**Abb. 17:** A₁-selektive AR-Antagonisten vom Xanthin- und Adenintyp.

Neben den Xanthinen spielen Adenin-Derivate eine große Rolle als AR-Antagonisten. Sie leiten sich vom physiologischen Agonisten Adenosin ab, aber weisen keine Ribosestruktur auf, die für die Rezeptoraktivierung nötig ist. WRC-0571 **23** ist ein potenter A₁-Antagonist mit hoher Selektivität gegenüber allen anderen AR-Subtypen^[159] (Abb. 17).

1.3.3 Beteiligung der Adenosinrezeptoren an der Zellproliferation

Adenosin hat sowohl auf das Wachstum normaler Zellen als auch auf die Proliferation des Tumorgewebes einen regulatorischen Einfluss^[160]. Dabei spielen die gewebespezifische Verteilung der AR-Subtypen, deren Expressionsrate und Adenosinaffinität sowie die extrazelluläre Adenosinkonzentration eine entscheidende Rolle^[160]. Bereits in den 80er Jahren konnte gezeigt werden, dass die A₁- und A_{2b}-AR die Proliferation und Differenzierung der glatten Gefäßmuskulatur regulieren^[161]. Diese Effekte stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der MAPK, die eine wesentliche Rolle bei Prozessen der Zelldifferenzierung, Proliferation und des Zelltods spielt. Für in COS-7 Zellen (Fibroblastenzelllinie der Affeniere) transient exprimierten A₁-Rezeptor konnte eine Aktivierung der ERK1/2 („extracellular regulated kinase 1/2“) nachgewiesen werden^[162].

Erhöhter Energieverbrauch oder Hypoxie führen zu einer gesteigerten Adenosinbildung^[163]. Aus diesem Grund sind metabolisch aktive Tumorzellen durch eine gesteigerte Adenosinfreisetzung charakterisiert^[164]. Über die lokale Freisetzung von Adenosin kann das Wachstum dieser Tumorzellen in AR-abhängigen und AR-unabhängigen Wegen beeinflusst werden.

Arbeiten von Colquhoun sprechen für die Anwesenheit von A₁-AR in MCF-7 Zellen, deren Stimulation eine Proliferationshemmung bewirkt^[165]. Aber auch für den A₃-AR konnte ein Einfluss auf das Zellwachstum in normalen Zellen^[166, 167] und Tumorzellen nachgewiesen werden^[168, 169]. Seine Expression ist in Tumorgewebe stark erhöht^[170]. Sowohl für MCF-7 als auch für MDA-MB 468 Brustkrebszellen ist das Vorhandensein von A₃-Rezeptoren belegt. Der A₃-AR-Agonist IB-MECA führt an beiden Zelllinien zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellzahl, die an den MDA-MB 468 Zellen bereits im nanomolaren Bereich auftritt, während an MCF-7 Zellen mikromolare Konzentrationen erforderlich sind^[171]. Arbeiten von Lu erklären die zytotoxische Wirkung von IB-MECA durch die von ihm bewirkte ER α -Down-Regulation durch Verringerung des mRNA- und Proteinlevels^[172]. Erst kürzlich erschienene Ergebnisse belegen das Vorhandensein von A_{2b}-AR in MDA-MB 231 Zellen^[173]. Das Auftreten von A_{2a}- und A_{2b}-AR in den hormonabhängigen MCF-7 Zellen bzw. von A₁-, A_{2a}- und A₃-AR in der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Zelllinie ist bis heute nicht belegt.

Aufgrund der hier dargestellten Forschungsergebnisse stellt der Adenosinrezeptor ein neues mögliches Target in der Tumorthherapie dar.

Da das Benzimidazolgerüst und der physiologische AR-Ligand Adenosin strukturell sehr ähnlich sind, ist eine Wechselwirkung der neuen Benzimidazolderivate mit dem AR durchaus vorstellbar und soll geprüft werden.

