

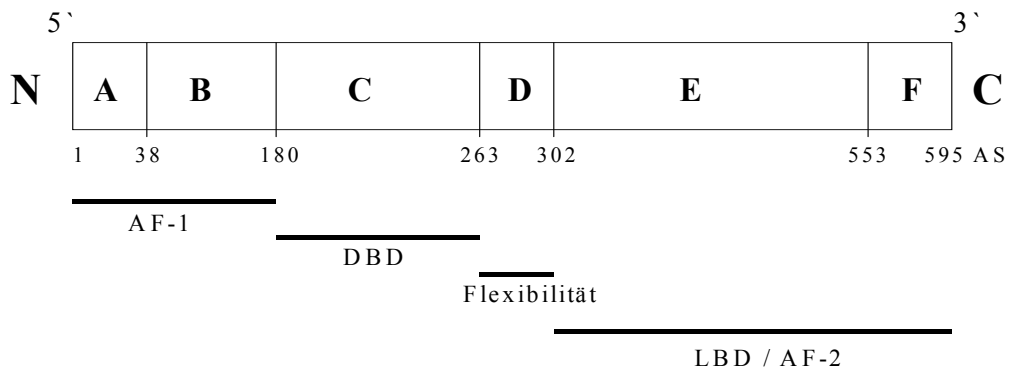
## B Literatur

<b>B.1 Estrogenrezeptor</b>	<b>7</b>	<b>B.3 Expression von ER, PgR und EGFR</b>	<b>15</b>	B.4.2 Entstehung von Apoptose	
B.1.1 Aufbau		B.3.1 ER und PgR		<b>B.5 Testmodelle</b>	<b>20</b>
B.1.2 Wirkungsmechanismus		B.3.2 ER und EGFR		B.5.1 Endometriumkarzinom-Zelllinien	
<b>B.2 ER-Liganden</b>	<b>10</b>	<b>B.4 Zellwachstum u. -tod</b>	<b>18</b>	B.5.2 <i>in vitro</i> -Modelle	
B.2.1 Estrogene		B.4.1 Grundlagen d. Zellzyklus		B.5.3 <i>in vivo</i> -Modelle	
B.2.2 Antiestrogene					

### B.1 Der Estrogenrezeptor

#### B.1.1 Aufbau des Estrogenrezeptors

Der ER gehört wie die Rezeptoren von Androgenen, Gestagenen oder Kortikoiden zu den Steroidrezeptoren. Die Familie der Steroidrezeptoren ist der Großfamilie nukleärer Rezeptoren untergeordnet (Gronemeyer and Laudet 1995). Steroidrezeptoren wirken wie die Rezeptoren für Schilddrüsenhormone in der Zelle als Transkriptionsfaktoren (Evans 1988), d.h. sie wirken nach erfolgter Steroidhormonbindung direkt auf die Genexpression. Andere Hormone wie zum Beispiel Insulin wirken über einen membranständigen Rezeptor durch Aktivierung von *second messengers*. Der humane ER besteht aus 595 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 64-66 kDa. Das Protein wird funktionell in separate Domänen (A-F) für Hormonbindung, DNA-Bindung und transkriptionale Aktivierung eingeteilt (Abb.2, S.8). Der ER weist zwei transkriptionale Aktivierungsfunktionen (AFs) auf. Eine davon ist in der N-terminalen A/B-Region lokalisiert (AF-1), die andere in der C-terminalen E/F-Region (AF-2) (Kumar et al. 1987, Webster et al. 1988). Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) liegt in der C-Region. Hier befinden sich Cys-X-X-Cys-Sequenzen, die durch einen Komplex von zwei Cysteinresten und zwei Histidinresten mit einem Zinkion ein Chelat ausbilden. Diese DBD ist für die Bindung spezifischer DNA-Sequenzen geeignet (Stryer 1987 -a). Die als *response elements* (RE) bezeichneten, spezifischen DNA-Sequenzen werden *estrogen response elements* (ERE) genannt, wenn sie die DBD des ER binden. Die D-Region ist die flexible Verbindung zu der sich anschließenden E/F-Region, in der die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) liegt (Jazaeri et al. 1999). Man unterscheidet die zwei ER-Subtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Sie kommen in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Organen vor. ER $\alpha$  wird vorwiegend in Endometrium, Ovar, Hoden, Nebenhoden, Niere, Nebenniere und Hypophyse exprimiert. ER $\beta$  ist in Prostata, Lunge, Gehirn sowie in Ovar und Nebenhoden vermehrt exprimiert (Enmark and Gustafsson 1998).



### Abb.2 Funktionelle Domänen (A-F) des humanen Estrogenrezeptors

Der Estrogenrezeptor besteht aus 595 Aminosäuren mit zwei transkriptionalen Aktivierungsfunktionen (AF), einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und Liganden-Bindungsdomäne (LBD), (modifiziert nach Jazaeri et al. 1999, Schneider 1995)

#### B.1.2 Wirkungsmechanismus des aktivierten Estrogenrezeptors

Der ER liegt als Makromolekül im Kern der Zelle (Gronemeyer and Laudet 1995). Er ist während der Ligandenabwesenheit mit einem Proteinkomplex assoziiert, der das Hitzeschock-Protein hsp90 enthält (Beato 1989, Ciocca et al. 1990). hsp90 schützt den ER vor proteolytischem Verdau (Housley et al. 1990) und hält ihn in einem zur Bindung von Hormonen aktiven Zustand (Pratt and Toft 1997). Gelangt Estradiol ( $E_2$ ) per Diffusion in den Zellkern, bindet es an den Rezeptor und führt zu einer Konformationsänderung und Phosphorylierung des ER. Der Proteinkomplex mit dem Hitzeschock-Protein dissoziiert ab (Smith and Toft 1993). Die Phosphorylierung aktiviert AF-1; AF-2 ist durch die Bindung des Liganden aktiviert. Der dimerisierte ER aktiviert nun in einer Interaktion mit der DNA an ERE die Transkription von Genen. Diese kodieren für Proteine, die als Wachstumsfaktoren autokrin und parakrin die Proliferation der Zelle anregen (z.B. epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Insulin) und für Proteine, die die DNA-Synthese aktivieren (z.B. Cycline, B.4.1 *Zellzyklus*, S. 18). Alle durch den  $E_2$ -ER-Komplex induzierten Proteine stimulieren und ermöglichen letztendlich die Zellproliferation (Kumar and Chambon 1988). Koaktivatoren wie SRC-1, TIF2, SPT6

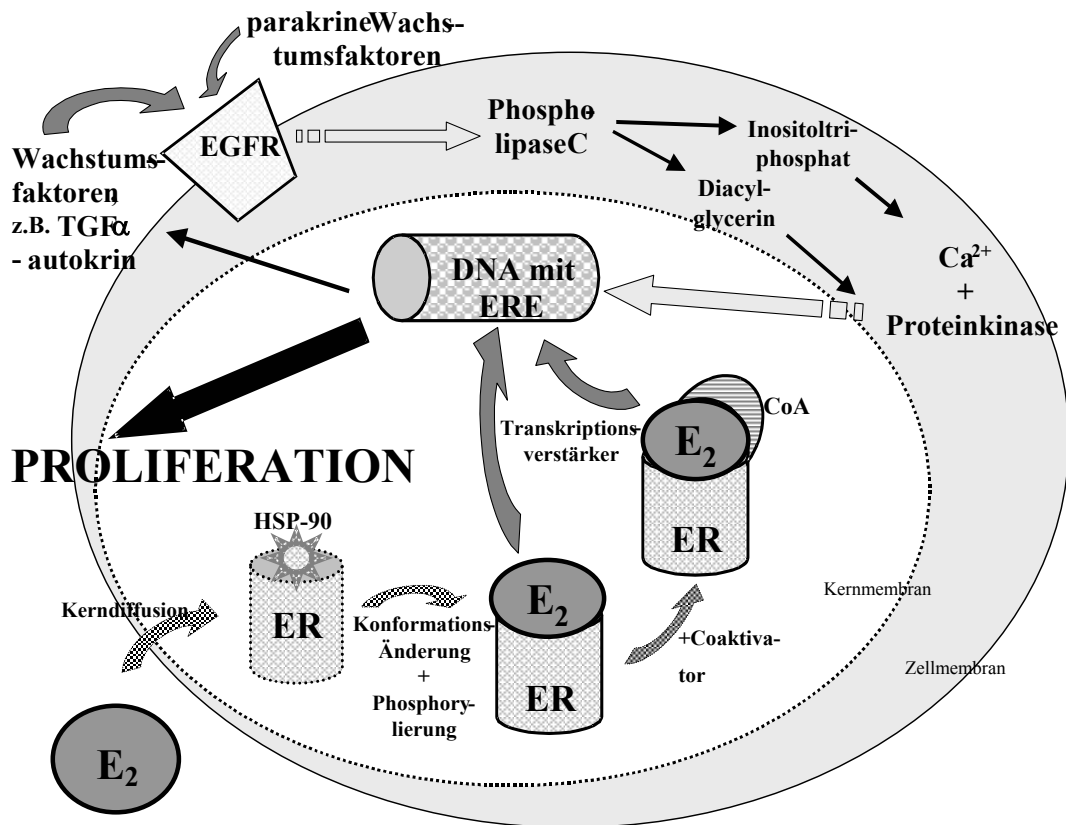


Abb.3 Wirkungsmechanismus des estradiol(E<sub>2</sub>)-bedingten Wachstums einer Tumorzelle

Das Wachstum dieser Tumorzelle wird durch Estrogenstimulation über den Estrogenrezeptor (ER) und durch autokrine Stimulation nach Sekretion von TGFα (*Transforming growth factor alpha*) über den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) angeregt. [Koaktivatoren (CoA) und *estrogen response elements* (ERE)]

können sich zusätzlich an die LBD-Region des aktivierten ER anlagern. Durch diese Anlagerung wird die transkriptionale Aktivität des Rezeptors verstärkt (Parker et al. 1998, Baniahmad et al. 1995) (Abb.3). In malignen Zellen werden durch die E<sub>2</sub>-ER-bedingte Transkriptionsaktivierung zusätzliche Wachstumsfaktoren produziert, die durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren zu einer weiteren Autostimulation des Zellwachstums führen (Sporn and Todaro 1980, Reynolds et al. 1996). Ein solcher, autokriner Regelkreis mit Expression von TGFα (*Transforming growth factor alpha*) ist für Mamma- und Endometriumkarzinom beschrieben worden (Dickson and Lippman 1988, Reynolds et al. 1998). Durch Bindung an den EGFR stimuliert TGFα seinerseits das Zellwachstum (Abb.3).

## B.2 Estrogenrezeptor-Liganden

### B.2.1 Estrogene — endogene Liganden des Estrogenrezeptors

Estrogene wurden erstmals Anfang der 30er Jahre isoliert und strukturell aufgeklärt. Es sind Steroidhormone mit 18 Kohlenstoffatomen und einem ungesättigten, aromatischen Steran-Ring. Estrogene werden neben geringen Mengen in der Nebennierenrinde hauptsächlich in den Ovarien gebildet. Mit einer Halbwertszeit von 60-90 Minuten sind Estradiol, Estron und Estriol die wichtigsten, physiologischen Estrogene. 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) ist das wirksamste Estrogen und in das um den Faktor 3 biologisch geringer aktive Estron umwandelbar (Abb.4). Die Ausscheidung von Estrogenen erfolgt als Glukuronide über die Nieren.

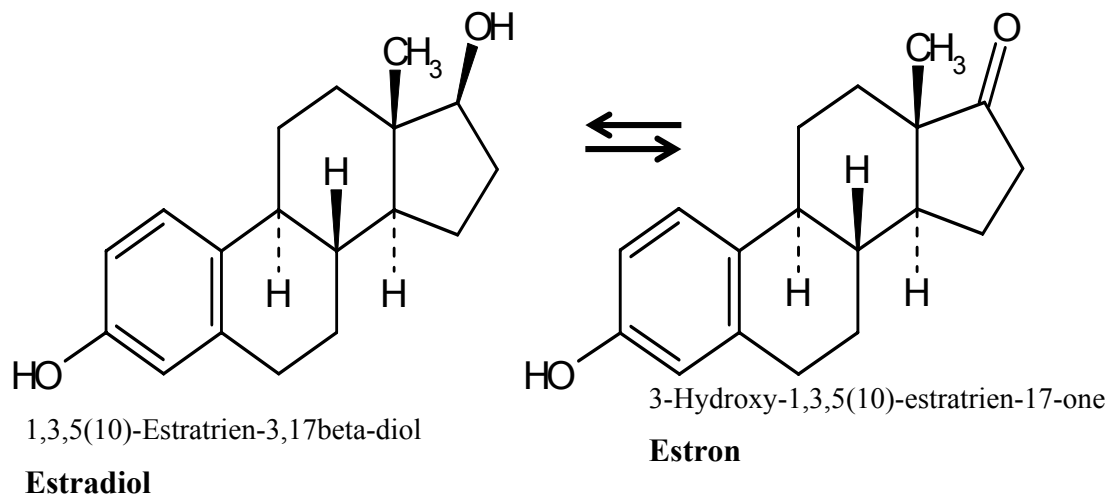


Abb.4 Strukturformeln der ineinander umwandelbaren Estrogene Estradiol und Estron

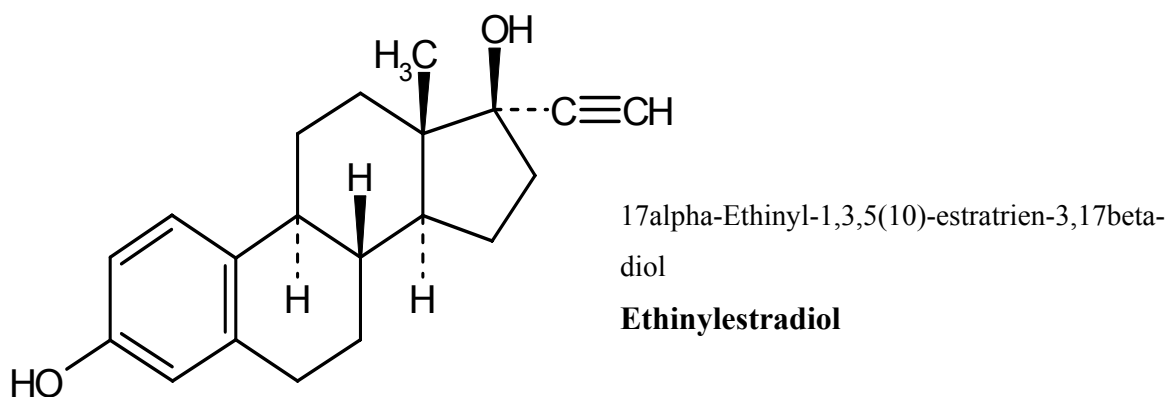


Abb.5 Strukturformel des synthetischen Ethinylestradiols

Neben natürlichem Estradiol finden synthetische Estrogenderivate wie Ethinylestradiol, Mestranol oder Estradiolvalerat am häufigsten Verwendung in der Medizin (Abb.5, S.10). Estrogene diffundieren in den Zellkern, binden an den Rezeptor und wirken in einem Estrogen-ER-Komplex auf transkriptionaler Ebene. Neben der Zellproliferation von Endometrium- und Mammagewebe gehören auch positive Rückkopplung zur Hypophyse (Hohlweg-Effekt), Senkung der Cholesterinwerte im Blut und Wasserretention zu den physiologischen Wirkungen. Ferner wirken Estrogene positiv auf den Knochenstoffwechsel. Auge, Haut, Schleimhäute, Blase, zentrales Nervensystem (vor allem kognitive Funktionen) gehören ebenfalls zu den Zielgeweben von Estrogenen.

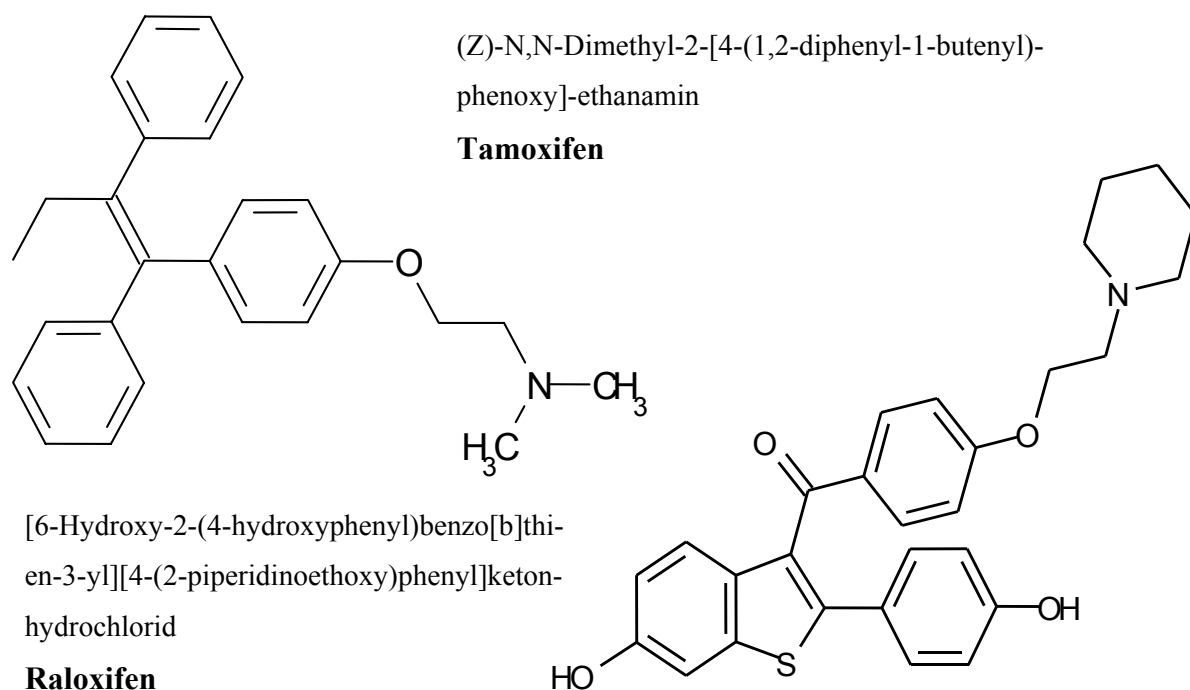
### B.2.2 Antiestrogene — exogene Liganden des Estrogenrezeptors

AE wirken durch kompetitive Verdrängung der Estrogene vom ER estrogenantagonistisch. Die antitumorale Aktivität ist in den 60er bis 70er Jahren entdeckt worden (Harper and Walpole 1967). Bis heute ist das Gebiet der Tumorthherapie hauptsächliche Indikation dieser Substanzklasse.

#### *Partialagonistische Antiestrogene Tamoxifen und Raloxifen*

Partialagonistische AE werden auch als selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) bezeichnet. Sie wirken in bestimmten Organen estrogen-antagonistisch und in anderen Organen estrogen-agonistisch. Der Wirkungsmechanismus für diese SERM ist komplex und noch nicht vollständig erklärt. SERM binden an den ER $\alpha$ - und an den ER $\beta$ -Subtyp. Je nach organspezifischer Expression des ER-Subtyps wird durch die Rezeptorbindung die Transkription unterschiedlicher Gene aktiviert. Die daraus translatierten Proteine sind verantwortlich für unterschiedliche Wirkungen in den Organen (Enmark and Gustafsson 1998). Obwohl SERM ebenso an die Ligandenbindungsstelle des ER wie Estrogene binden, nimmt der Komplex eine andere Konformationsstellung ein als mit Estrogenen. Diese Konformationsänderung führt zu einer funktionellen Inhibition der ligandenabhängigen AF-2 Einheit des ER im Bereich der LBD (Berry et al. 1990, Tzukerman et al. 1994). Untersuchungen deuten daraufhin, daß Tamoxifen AF-2 inhibiert, AF-1 im Bereich der DBD jedoch weiterhin transkriptional aktiv ist. Die partialagonistische Eigenschaft wird somit über AF-1 gesteuerte Transkriptionen erklärt (Berry et al. 1990). Durch das geringer estrogenwirksame Raloxifen werden beide AF-Regionen inhibiert (Levenson and Jordan 1998). Diese Beobachtung erklärt jedoch nicht die estrogenische Wirkung von Raloxifen. In einer Studie beschriebene, auf der DNA lokalisierte

antiestrogene RE können diese estrogene Wirkung erklären (Dana et al. 1994). Die antiestrogenen RE werden ähnlich den ERE durch den SERM-ER-Komplex gebunden, wodurch Transkriptionen aktiviert werden, die estrogene Effekte bewirken. Weitere Studien postulieren anstelle einer Rezeptor-DNA-Interaktion eine Rezeptor-Protein-Interaktion, die für die estrogenen Effekte verantwortlich ist (Yang et al. 1997). Die gewebsspezifische, estrogen-agonistische und –antagonistische Wirkung partialagonistischer AE lässt sich also mit der Dosis, da Estrogene nur kompetitiv verdrängt werden, mit verschiedenen Rezeptortypen, an die AE binden, und mit der unterschiedlichen Inhibition von AF-2 und/oder AF-1 des Rezeptors begründen. Gewebe- und speziesspezifisch unterschiedlich vorhandene ERE-Sequenzen und mögliche antiestrogene RE-Sequenzen in der Zell-DNA variieren die Antwort zusätzlich. Weiterhin können Koaktivatoren oder-repressoren nach Anlagerung an den Komplex die transkriptionale Aktivität modulieren (Graham et al. 2000). Tamoxifen ist das am häufigsten angewendete, partialagonistische AE. Es handelt sich bei diesem nichtsteroidalen AE um eine Triphenylethylen-Struktur, die erstmals von Harper and Walpole 1967 beschrieben wurde. Raloxifen, ein SERM zweiter Generation, leitet sich von der Benzothiophen-Struktur ab (Abb.6).



**Abb.6 Strukturformeln der nichtsteroidalen, partialagonistischen Antiestrogene Tamoxifen und Raloxifen**

Trotz Zugehörigkeit in eine gemeinsame Substanzklasse haben beide AE unterschiedliche, periphere Wirkungen. Tamoxifen wird wegen seines stark auf das Mammagewebe antiproliferativen Effekts bei Mammakarzinomen klinisch eingesetzt. Die schon erwähnte, estrogene Wirkung auf das Endometriumgewebe kann jedoch zur Induktion oder Proliferation von endometrialen Karzinomen führen (Gusberg 1990, Andersson et al. 1991). Trotz der knochenprotektiven und cholesterolsenkenden Wirkung wird Tamoxifen wegen dieser Risikohöherung für Endometriumkarzinome nicht zur Osteoporoseprophylaxe bei postmenopausalen Frauen eingesetzt (Burckhardt 1999). Raloxifen wirkt ebenfalls knochenprotektiv und hat eine cholesterolsenkende Wirkung im Fettstoffwechsel, aber keine proliferative auf das Endometriumgewebe und nur geringe antiproliferative Wirkung auf das Mammagewebe. Raloxifen wird deshalb für die Osteoporoseprophylaxe eingesetzt (Tab.1) (Holst 2000, Burckhardt 1999).

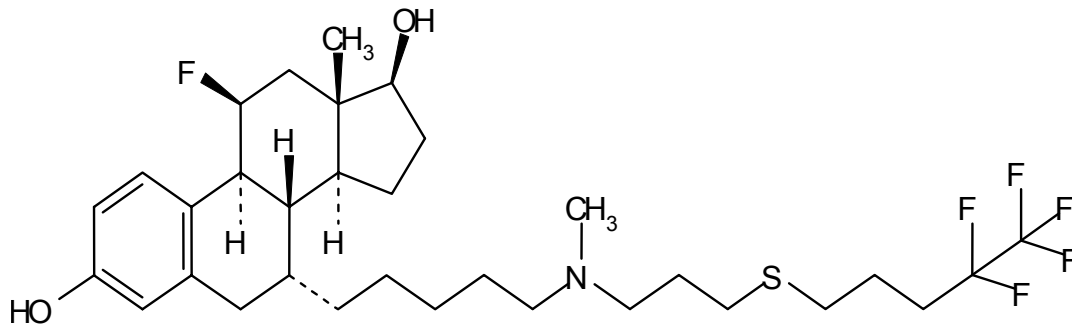
**Tab.1 Periphere Wirkungen von Antiestrogenen im Vergleich zu Estrogenen (modifiziert nach Holst 2000)**

	Reine	SERM's		Estrogene
	Antiestrogene	1.Generation	2.Generation	
<b>Knochen</b>	neutral*	Agonist	Agonist	Agonist
<b>Cholesterolfstoffwechsel</b>	?	Agonist	Agonist	Agonist
<b>Uterus</b>	Antagonist	Agonist	Antagonist	Agonist
<b>Mamma</b>	Antagonist	Antagonist	Antagonist	Agonist
<b>Prototypen</b>	<b>ICI 182,780</b> <b>ZK 191703</b>	<b>Tamoxifen</b>	<b>Raloxifen</b>	<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>

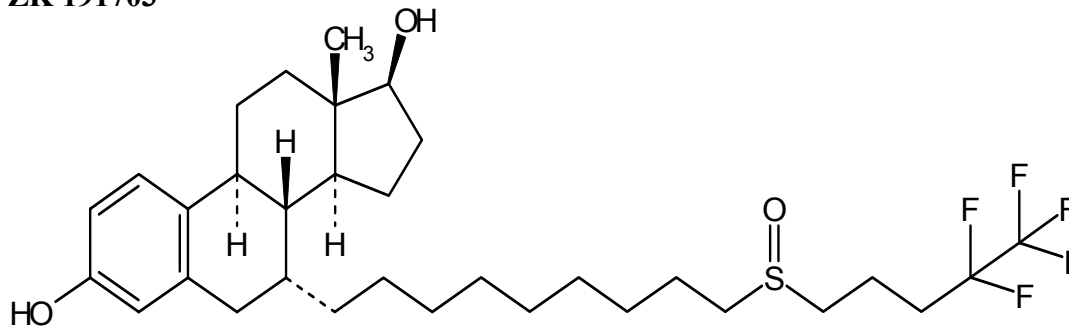
\*nach Wakeling et al 1991

*Reine Antiestrogene ZK 191703 und ICI 182,780*

Reine AE besitzen keine Restestrogenität (Tab.1, S.13). Die Substanz ICI 182,780 (Faslodex®), von Wakeling et al. 1991 beschrieben, und ZK 191703 leiten sich beide strukturell von Estradiol ab. Beide Substanzen gehören somit zur steroidal Strukturklasse (Abb.7).



11beta-Fluoro-7alpha-[5-(methyl{3-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl)sulfanyl]propyl}amino)pentyl]estra-1,3,5(10)-trien-3,17 beta-diol

**ZK 191703**

7alpha-[9-(4,4,5,5,5-Pentafluoropentylsulfinyl)-nonyl]-estra-1,3,5(10)-trien-3,17beta-diol

**ICI 182,780 (Faslodex®)**

**Abb.7 Strukturformeln der steroidalen, reinen Antiestrogene ZK 191703 und ICI 182,780**

Der Wirkungsmechanismus reiner AE beruht infolge Konformationsänderung des AE-ER-Komplexes auf Inaktivierung beider AF-Regionen (AF-1 und AF-2) (Gronemeyer et al. 1992, Berry et al. 1990). Diese Konformationsänderung ist so gravierend, daß der gesamte ER instabil wird. Die ER-Halbwertszeit des E<sub>2</sub>-ER-Komplexes beträgt fünf Stunden, die des reinen AE-ER-Komplexes weniger als eine Stunde. Diese Beobachtung wurde mit ICI 164,384, einer Vorläufersubstanz von ICI 182,780, gemacht (Dauvois et al. 1992). Die Eigenschaft reiner AE, den ER zu destabilisieren, führte zu der Bezeichnung selektive Estrogenrezeptor-Destabilisatoren (SERD) (DeFriend et al. 1994, Howell et al. 2000). Reine AE verdrängen Estro-



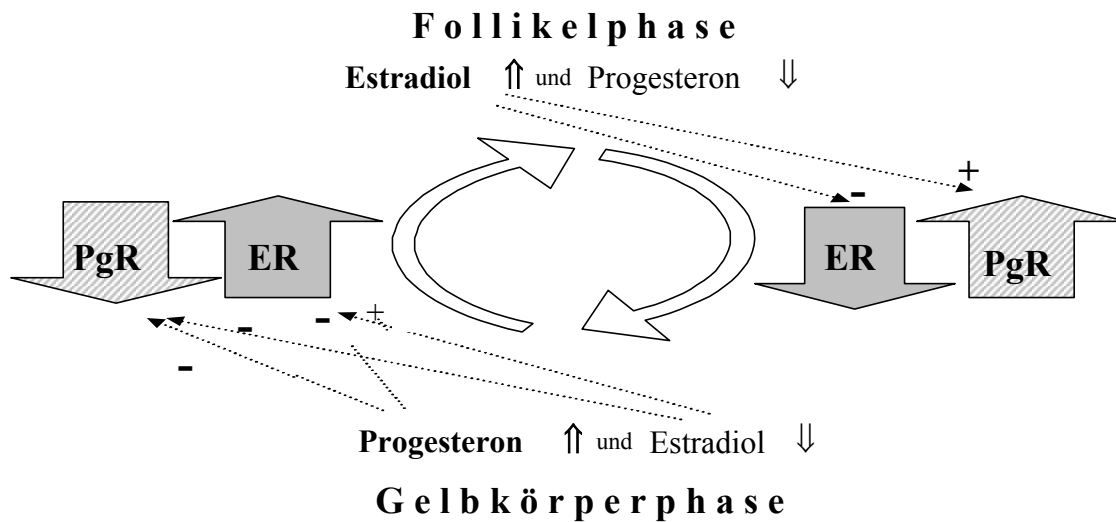
gene kompetitiv vom ER. ICI 182,780 hat mit einer  $K_D \text{ ICI 182,780} = 0,89\text{nM}$  (Wakeling et al. 1991) eine ähnliche Bindungsaffinität zum Rezeptor wie Estrogen ( $K_D = 0,6\text{nM}$ ). Diese neue Substanzklasse ist eine erfolgversprechende Alternative zu Tamoxifen in der hormonellen Mammakarzinomtherapie (Wakeling 1993, DeFriend et al. 1994) und zu Progesteronen in der Endometriumkarzinomtherapie (O'Regan et al. 1998). Von den beiden steroidal, reinen AE ist ZK 191703 oral wirksam. ICI 182,780 wird wegen seiner geringen, oralen Bioverfügbarkeit subkutan appliziert (Wakeling and Bowler 1992). Die Behandlung mit ZK 191703 führte in einem Mammakarzinommodell zu einer längerdauernden Tumorremission als die Behandlung mit ICI 182,780 (Hoffmann et al. 2000).

### **B.3 Expression von Estrogen-, Progesteron- und epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in endometrialen Adenokarzinomzellen**

#### **B.3.1 Regulation der Expression von Estrogen- und Progesteronrezeptoren in endometrialen Zellen**

Während der menstruellen Follikelwachstumsphase wird das Endometrium auf eine Schwangerschaft vorbereitet. Die heranreifenden Ovarialfollikel produzieren unter FSH-Einfluß vermehrt  $E_2$ . Die Bindung von  $E_2$  an die ER endometrialer Zellen aktiviert die Zellproliferation und sensibilisiert die Zellen für Gestagene durch Induktion der PgR-Expression. Die ansteigende  $E_2$ -Konzentration bewirkt gleichzeitig eine gegenregulatorische Verringerung der ER-Expression in den endometrialen Zellen. Unmittelbar vor der Ovulation steigt der  $E_2$ -Spiegel so hoch an, daß in einer positiven Rückkopplung in den hypophysären Vorderlappenzellen eine vermehrte Ausschüttung von LH induziert wird (Hohlweg-Effekt). Das LH bewirkt die Ovulation des Graaf-Follikels in den Ovarien. Aus dem Follikel entsteht ein Gelbkörper. Dieser synthetisiert und sezerniert Progesteron. Progesteron bewirkt nun die Umwandlung des proliferierenden Endometriums in ein sekretorisches und wirkt negativ auf die ER-Expression in den endometrialen Zellen. In dieser Gelbkörperphase kommt es zu einer allmählichen Desensitivierung der Zellen gegenüber Progesteron. Denn die Anzahl der PgR in den endometrialen Zellen verringert sich einerseits gegenregulatorisch aufgrund des hohen Progesteronspiegels und andererseits aufgrund der in geringer Menge vorhandenen  $E_2$ -ER-Komplexe, die die PgR-Expression induzieren. Zusätzlich exprimieren die endometrialen Zellen in dieser Gelbkörperphase wieder zunehmende Mengen an ER. Diese Expression wird durch den niedrigen  $E_2$ -Spiegel induziert. Mit dem Einsetzen der Luteolyse wird die Progesteronsekretion wieder

gesenkt. Neue heranwachsende Follikel in den Ovarien führen wiederum zu einem Ansteigen des E<sub>2</sub>-Spiegels. Der menstruelle Zyklus beginnt von neuem (Abb.8).



**Abb.8 Regulation der Expression von Estrogen- und Progesteronrezeptoren (ER, PgR) in endometrialen Zellen innerhalb des Menstruationszyklus**

Eine verstärkte Rezeptorexpression kann demnach durch die Verringerung der zugehörigen Ligandenkonzentration oder durch vollständigen Entzug des Liganden (Ablation) erreicht werden. Eine hohe Konzentration des Liganden führt gegenregulatorisch zu einer Runterregulation der exprimierten Rezeptoren. Diese hormonell geregelte ER/PgR-Expression verhält sich beim Mammakarzinom in gleicher Weise (Horwitz and McGuire 1978). Die erhöhte PgR-Expression im Mammakarzinom nach Estrogengabe ist ein Marker für die Funktionalität der ER (Horwitz and McGuire 1975). Beim Endometriumkarzinom wurde in *in vitro*-Studien (Lessey et al. 1996) und *in vivo*-Studien am Rattenuterus (Kraus and Katzenellenbogen 1993) ebenfalls eine durch Estrogenzufuhr aktivierte Estrogen- und Progesteronrezeptorregulation beobachtet. Wird durch eine Gestagentherapie der Progesteron-Spiegel angehoben, führt das im Endometriumkarzinom ebenfalls zu einer Absenkung von ER und PgR (Jänne et al. 1979, Philipson et al. 1985). Die Behandlung mit Tamoxifen führt zu einer Hochregulation beider Rezeptoren (Gottardis et al. 1988, Satyaswaroop et al. 1984). Die Hochregulation der PgR-Expression weist auf eine estrogene Wirkung von Tamoxifen am Endometrium hin. Das reine AE ICI 182,780 bewirkte in Studien an Mammakarzinommodellen eine Abnahme der PgR-Expression (DeFriend et al. 1994, Howell et al. 2000). Aufgrund der selektiven ER-Destabilisierung durch ICI 182,780 werden PgR, induziert durch den E<sub>2</sub>-ER-Komplex, nicht expri-

miert. Eine Studie mit ICI 182,780 an nicht tumorös entartetem Endometriummaterial ergab keine signifikanten Effekte auf die Expression von ER und PgR (Dowsett et al. 1995).

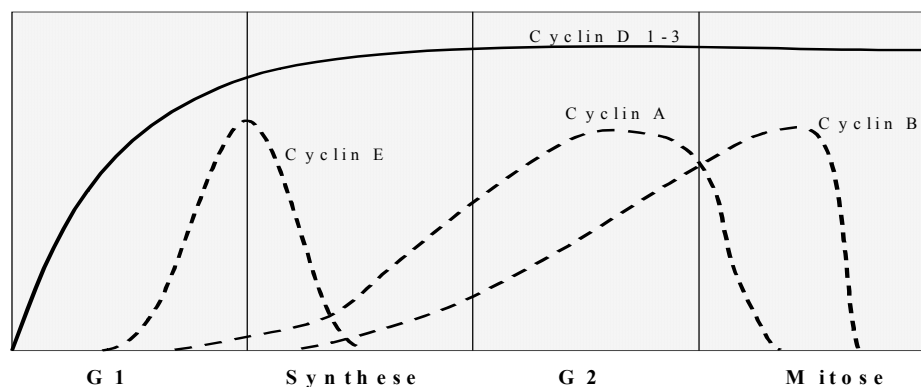
### B.3.2 Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in endometrialen Zellen

Der EGFR ist ein transmembraner 170 kD-Glykoprotein-Rezeptor. Er besteht aus einer extrazellulär lokalisierten LBD zur Bindung von Wachstumsfaktoren wie Insulin, Insulin-like Wachstumsfaktor (IGF) und epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und aus einer intrazellulär gelegenen, zytoplasmatischen Tyrosin-Kinase-Domäne. Über die Phospholipase C wird die Phosphoinositidkaskade katalysiert, wodurch letztendlich das Zellwachstum induziert wird (Stryer 1987 -b) (Abb.3, S.9). Die Expression von EGFR und ER beim Mammakarzinom verläuft negativ korrelierend (Fitzpatrick et al. 1984, Sainsbury et al. 1985). Beim Endometriumkarzinom sind derartige Untersuchungen an Klinikmaterial durchgeführt worden. Einige Studien bestätigen diese negative Korrelation (Wang et al. 1993, Llorens et al. 1989). In anderen Arbeiten wurde keine Korrelation zwischen ER- und EGFR-Expression beobachtet (Zarcone et al. 1995). Es deuten Arbeiten darauf hin, dass der EGFR Marker für ein aggressives, invasives Verhalten des Tumors ist und prognostisch für eine geringe Überlebensdauer der Patientinnen steht (Khalifa et al. 1994, Niikura et al. 1995). Unter Estrogenbehandlung wurde eine erhöhte Expression von EGFR beim Mammakarzinom und im Endometriumgewebe gezeigt (Berthois et al. 1989, Taketani and Mizuno 1988, Mukku and Stancel 1985). In der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1-B wurde eine EGFR-Hochregulation durch Estrogen- und auch Progesterongabe induziert (Watson et al. 1994). Diese Beobachtungen sprechen ebenfalls für eine negativ korrelierende Expression von ER und EGFR. Denn durch die Applikation von Estrogenen oder Progesteronen wird die ER-Expression runterreguliert. Der Wirkungsmechanismus dieser negativ korrelierenden Rezeptorexpression ist noch nicht geklärt. AE wurden diesbezüglich am Endometriumkarzinom noch nicht untersucht. Eine immunhistochemische Studie mit gesunden, endometrialen Gewebeproben, die Mammakarzinompatientinnen unter Tamoxifenbehandlung entnommen wurden, hat ergeben, daß die EGFR-Konzentration nur in endometrialen Zellen von Frauen nach der Menopause, also in Abwesenheit von Estrogenen, ansteigt (Hachisuga et al. 1999).

## B.4 Zellwachstum und Zelltod

### B.4.1 Grundlagen, Regulation und Beeinflussung des Zellzykluses

Zellen entstehen in einem zyklischen Prozeß von Wachstum und Teilung aus ihresgleichen. Der Zellzyklus gliedert sich in zwei Hauptphasen, die Interphase und die Teilungsphase. In der Interphase ist die Zelle funktionell aktiv, nimmt an Masse zu und repliziert ihre DNA. Diese Phase lässt sich in die drei Abschnitte präsynthetische Phase (G1), synthetische Phase (S) und postsynthetische Phase (G2) unterteilen. Die sich anschließende Teilungsphase besteht aus Kernteilung (Mitose) und Cytoplasmateilung (Cytokinese). Die Dauer eines Zellzyklus, Generationszeit genannt, variiert abhängig von der Zellart. Zellen, die sich nicht teilen, arretieren in der G1-Phase. Im Falle einer vollständigen Arretierung wird sie auch als G0-Phase bezeichnet. Der Eintritt von der G1-Phase in die S-Phase und dann in die Mitosephase wird von bestimmten Proteinen, den Cyclinen, katalysiert. Sie werden periodisch während der Zellzyklusphasen synthetisiert und kontinuierlich akkumuliert, bis sie am Ende der Mitosephase abrupt abgebaut werden. Dann setzt ein neuer Zyklus von Synthese und Degradation ein, was den Cyclinen ihren Namen gegeben hat (Wehner and Gehring 1990). Die Akkumulation einzelner Cycline in bestimmten Zellzyklusphasen ermöglicht bei Bestimmung der Cyclinmenge in den Zellen die genaue Zuordnung dieser Zellen zu einer Zellzyklusphase (Abb.9).



**Abb.9 Akkumulation der zyklisch exprimierten Cycline in einer Zelle**

Durch Bindung an cyclinabhängige Kinasen (cdK) katalysieren Cycline das Fortschreiten des Zyklus. Cyclin D1 katalysiert in einem Komplex mit cdK4 den Wechsel der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase. Diese katalytischen Aktivitäten von Cyclin-cdk-Komplexen werden über regulatorische Proteine kontrolliert. Sogenannte Mitoseinhibitoren wie p21, p27, p16 oder p17 inaktivieren die Komplexe. Die Synthese von Cyclinen und Mitoseinhibitoren in den

Zellen wird wiederum über Hormone und andere Wachstumsfaktoren gesteuert. Der E<sub>2</sub>-ER-Komplex induziert eine vermehrte Expression von Cyclin D1, da auf seiner Promoterregion ERE zur Bindung des Komplexes liegen. Die vermehrte Cyclin D1-Produktion katalysiert den Wechsel der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase und ermöglicht so das Fortschreiten der Zellteilung und letztendlich das Zellwachstum (Sutherland et al. 1983). Diese estrogeninduzierte Stimulation des Zellwachstums ist auch bei Mammakarzinomen und am Uterus von Ratten beobachtet worden (Altucci et al. 1996, Altucci et al. 1997). Wie in anderen Arbeiten beschrieben wurde, arretierten Tamoxifen und ICI 182,780 das Zellwachstum der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in der G1-Phase durch Hemmung der E<sub>2</sub>-induzierten, mitogenen Cyclin D1-Expression (Osborne et al. 1984, Sutherland et al. 1983, Watts et al. 1995). Weiterhin wurde nach ICI 182,780-Inkubation in MCF-7-Zellen ein Anstieg in der p21-Expression beobachtet (Watts et al. 1995). Zusätzlich hemmte ICI 182,780 im Mammakarzinom die Aktivität des Cyclin E-cdk2-Komplexes (Carroll et al. 2000). Vergleichbare Untersuchungen am Endometriumkarzinom über Cyclin/cdk-Wechselwirkungen aufgrund einer AE-Einwirkung sind in der Literatur nicht zu finden.

#### B.4.2 Ursachen der Entwicklung einer Apoptose in Zellen

Der Zelltod kann in Form einer Nekrose oder einer Apoptose erfolgen. Unter Nekrose versteht man die Zerstörung der Zellmembran infolge Einwirkung äußerer Noxen. Es handelt sich um einen für die Zelle passiven Vorgang. Die Apoptose ist definiert als ein aktiv durch die Zelle selbst eingeleiteter, programmierter Zelltod. Jede Zelle besitzt Mechanismen, die diese Form des Zelltods bewirken. Durch die verschiedensten Ursachen kann der Mechanismus aktiviert werden. Apoptosen im Rahmen embryonaler Organbildungen, Organreifungen und -erneuerungen oder hormonabhängiger Umbauprozesse sind physiologischer Natur. Pathologisch können Apoptosen durch Ischämie, Traumata, Tumore, Autoimmunkrankheiten oder andere degenerative Erkrankungen entstehen. Manche Tumorthapeutika induzieren in ihren Zielzellen Apoptosen (Hickman 1992). Von Tamoxifen und ICI 182,780 ist beim Mammakarzinom eine Apoptose-induzierende Wirkung beschrieben worden. Das reine, steroidale AE induzierte in diesen Studien im Mammakarzinom mehr Apoptosen als Tamoxifen (Johnston et al. 1999, Diel et al. 1999). Am Endometriumkarzinom ist diese Wirkungsweise von ICI 182,780 noch nicht untersucht worden. Tamoxifen wirkte in einer Studie an gesundem Endometriumgewebe nur in Anwesenheit von Estrogenen, also bei Frauen vor der Menopause, apoptoseinduzierend. Am Endometrium von Frauen nach der Menopause wurden durch Tamoxifengabe Zellproliferationen beobachtet (Stackievicz et al. 2001). Als Ursache

für die endometrialen Zellapoptosen wird eine antitumoral wirkende Reaktion des Gewebes diskutiert. Nur hormonell reaktives Endometriumgewebe ist nach diesen Studien zu dieser Reaktion in der Lage.

## B.5 Testmodelle

Für präklinische Untersuchungen der Biologie und Therapie des Endometriumkarzinoms stehen nur wenige Testmodelle zur Verfügung. Untersuchungen mit Zellen aus Biopsiematerial von Endometriumkarzinomen können nur über einen Zeitraum von wenigen Passagen durchgeführt werden. Denn in der *in vitro*-Kultivierung inaktivieren die meisten Zellen innerhalb kurzer Zeiträume (4-6 Passagen) aufgrund der veränderten Wachstumsbedingungen viele ihrer Zellfunktionen. Die Expression von Steroidrezeptoren in endometrialen Karzinomzellen geht ebenfalls zurück. Es gibt wenige stabile, endometriale Karzinomzelllinien, die in der Zellkultur funktionsfähige Steroidrezeptoren exprimieren.

### B.5.1 Endometriumkarzinom-Zelllinien

Alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien stammen von humanen, endometrialen Adenokarzinomen 64- bis 81-jähriger Frauen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad. Die gut differenzierte Zelllinie Ishikawa wurde aus dem Karzinom einer Japanerin etabliert. Es wurde berichtet, daß sie wegen vorhandener, funktioneller ER und PgR ein gutes Modell für das Studium steroidhormonell vermittelter Ereignisse im Endometriumkarzinom ist (Somkuti et al. 1997, Lessey et al. 1996). Funktionelle EGFR werden ebenfalls exprimiert (Reynolds et al. 1998). Auch die Expression der Wachstumsfaktoren TGF $\alpha$ -und Insulin-like Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) (Reynolds et al. 1998) sowie die Expression der Integrine  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$  (Castelbaum et al. 1997) ist für Ishikawazellen beschrieben worden. ECC-1 ist eine ebenfalls gut differenzierte humane, endometriale Adenokarzinomzelllinie. Sie ist aus dem estrogensensitiven, in Nacktmäusen transplantierten Adenokarzinom EnCa-101-Modell etabliert worden. Neben funktionellen ER weisen diese Zellen auch PgR auf und bilden *in vitro* glanduläre Strukturen aus (Ricci et al. 1999, Satyaswaroop and Tabibzadhe 1991). KLE ist eine schwach differenzierte Adenokarzinomzelllinie, etabliert aus dem Endometriumkarzinom einer nordamerikanischen Patientin. Die Tumorzellen bilden Kernstrukturen aus, die denen gesunder, endometrialer Zellen unter Progesteroneinfluß gleichen. Die in Nacktmäusen wachsenden Tumore zeigen elektronenmikroskopisch Mikrovilli und Zellkontakte. Eine Expression von Rezeptoren wird nicht beschrieben (Hendricks et al. 1997). Die Zelllinien MFE-296, MFE-319

und MFE-280 wurden von Hackenberg et al. 1997 etabliert und sind schwach differenzierte Adenokarzinomzellen. In den stabilen Zelllinien ist die Expression von ER vollständig zurückgegangen. MFE-280 und MFE-296 exprimieren PgR in geringer Menge (7-14 fmol PgR/mg Protein).

### B.5.2 In vitro-Proliferationstest

Die *in vitro*-Testung des Proliferationsverhalten von Zelllinien nach Inkubation mit Testsubstanzen erfolgt meistens in Lochplatten verschiedener Größen. Zellen einer definierten, vorher festgesetzten Anzahl werden zu Versuchsbeginn in die Lochplatten ausplattiert und bei Beendigung des Versuches gezählt. Für diesen zweiten Teil des Versuches liegen verschiedene Methoden vor. Direkt kann die Zellzahl durch ein Zellzählgerät ermittelt werden. Indirekt kann sie durch Messung der Zellaktivität (RedOx-Potential mit AlamarBlue) oder durch Anfärbung einzelner Zellbestandteile (Kernfärbung mit Kristallviolett) ermittelt werden. Bei Testung der proliferativen bzw. antiproliferativen Wirkung von Estrogenen bzw. AE ist die Estrogenität von Phenolrot, das häufig als Indikator für oxidative Prozesse im Medium verwendet wird, zu berücksichtigen. Es bindet wie  $E_2$  an den ER, ruft estrogene Effekte hervor und führt so zu irreführenden Ergebnissen (Berthois et al. 1986, Bindal and Katzenellenbogen 1988). Bei Verwendung von phenolrotfreiem Medium treten diese estrogenen Effekte nicht auf. Ähnliche Interferenzen entstehen durch Estrogene, die im fetalen Kälberserum enthalten sind. Wird das Serum mit Aktivkohle inkubiert, werden die endogenen Estrogene an die Aktivkohle gebunden. Die anschließende Filtration des Serums zur Entfernung der Aktivkohle führt zu einem estrogenfreien Serum. Die Produktion und Sekretion des Wachstumsfaktors TGF $\alpha$  in endometrialen Adenokarzinomzellen führte zu einer autokrinen Wachstumsstimulation der Zellen (Reynolds et al. 1998). Bei Untersuchungen, Substanzen in ihrer Eigenschaft zu testen, das Zellwachstum zu stimulieren oder zu inhibieren, führt diese autokrine Wachstumsstimulation zu abweichenden Ergebnissen. Ein Mediumwechsel nach zwei bis drei Tagen minimiert die Akkumulation von sezernierten Wachstumsfaktoren und erneuert die Testsubstanzen, die im Laufe des Versuches durch die Zellen metabolisch zu Substanzen geringerer oder keiner Wirksamkeit umgesetzt werden können.

### B.5.3 In vivo-Testmodelle

Die komplexen, metabolischen Bedingungen in einem *in vivo*-Modell können zu einem anderen Tumorverhalten, als *in vitro* beobachtet wurde, führen. Die Wechselbeziehung zwischen

Tumor und Tier kann die Aktivierung von *in vitro* inaktiven Zellfunktionen und die Expression von Rezeptoren, die *in vitro* nicht exprimiert wurden, bewirken. Aus diesem Grunde kann auch die Applikation einer Testsubstanz im Tiermodell zu anderen Effekten im Tumor führen, als *in vitro* beobachtet wurden. Die Xenotransplantation von Karzinomzellen subkutan in Nacktmäuse ist das am häufigsten verwendete Tiermodell für Mammakarzinome (Clarke 1996). Die 1962 entdeckte, thymuslose Nacktmaus besitzt keine T-Lymphozyten. Sie eignet sich wegen dieser fehlenden, zellulären Immunabwehr besonders für Tumortransplantationen anderer Spezies. Auch beim Endometriumkarzinom ist das Modell der Nacktmaus ein etabliertes *in vivo*-Modell (Satyaswaroop et al. 1983, Satyaswaroop et al. 1987). 1983 wurde mit der SCID (*severe combined immunodeficient*) Maus ein noch immundefizienteres Tier gezüchtet (Pennisi 2000). Diese Maus besitzt weder B- noch T-Lymphozyten. Aufgrund dieser fehlenden, humoralen und zellulären Immunabwehr reagiert die SCID Maus in noch geringerem Maße mit Abstoßung und Entzündung auf Tumortransplantate humanen Ursprungs. SCID Mäuse, ebenfalls im spezifisch pathogenfreien Bereich gehalten, müssen sehr sorgfältig gehandhabt werden, da sie gegenüber Keimen jeder Art extrem empfindlich reagieren.