

# 1 Einleitung

## 1.1 Brustkrebs

Allein in Deutschland erkranken jährlich 350.000 Menschen an Krebs.

Im Jahr 2001 starben ungefähr 210.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Somit ist der Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Der Brustkrebs ist mit geschätzten 46.300 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebsart bei Frauen [1].

Risikofaktoren für eine Krebserkrankung sind im Allgemeinen ungesunde Ernährung, Übergewicht, übermäßiger Alkoholkonsum, Tabakkonsum und fehlende Bewegung [2, 3, 4]. Den Brustkrebs begünstigende Faktoren sind zudem genetische und familiäre Disposition sowie eine späte Erstgeburt, eine späte Menopause und ein früher Beginn der Menstruation [5].

Die Behandlung des Mammakarzinoms erfolgt nach unterschiedlichen Kriterien und ist individuell auf die Patientin zugeschnitten. Entscheidungsmerkmale für die richtige Therapie sind neben der Tumorgröße und eventuell vorhandener Metastasen auch das Lebensalter der Patientin, ihre körperliche Belastbarkeit, der Zeitpunkt der Erkrankung und der Estrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus des Karzinoms.

Die Therapie besteht primär aus einem chirurgischen Eingriff zur Entfernung des Tumors. Im Anschluss erfolgt adjuvant die Strahlentherapie zur Zerstörung von Tumorrestgewebe und zur Rezidivvorbeugung. Die Chemo-, Hormon- und Immuntherapie werden ebenfalls adjuvant zur Vernichtung vorhandener Mikrometastasen und von Tumorrestgewebe angewendet.

Die Chemotherapie erfolgt mit zytostatisch wirksamen Substanzen entweder nach der OP oder neoadjuvant vor der OP zur Karzinomverkleinerung. Bei der Hormontherapie wird durch den Eingriff in den Hormonhaushalt der für die Proliferation des Krebses notwendige Hormonspiegel erniedrigt. Beispiele dafür sind Antiestrogene, Aromatasehemmstoffe und GnRH-Superagonisten. Die Immuntherapie durch monoklonale Antikörper, durch Gentherapie oder durch Interferone, Interleukine und Zytokine ist für die Behandlung des Mammakarzinoms umstritten bzw. für die Praxis momentan noch unbedeutend [6]. Zugelassen ist mittlerweile jedoch Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen ERbB2, einen Rezeptor des Wachstumsfaktors EGF [7].

## **1.2 Klimakterium**

### **1.2.1 Die weiblichen Wechseljahre**

Das Klimakterium der Frau ist die Übergangsphase von der Geschlechtsreife zum Alter. Man unterscheidet im Klimakterium zwischen der Prämenopause mit Zyklusstörungen und unregelmäßigen Blutungen, der Menopause als den Zeitpunkt der letzten Regelblutung und der Postmenopause mit klimakterischen Ausfallerscheinungen [8, 9].

Die Ursache der so genannten Wechseljahre ist das Erlöschen der Ovarialfunktion, welches zu einer stark verminderten Estrogenproduktion führt. Der Estrogenmangel äußert sich in psychischen Störungen wie emotionaler Labilität und in vegetativen Störungen wie Hitzewallungen, Schlaflosigkeit, Schwindel [8, 10]. Er kann zudem zu Osteoporose führen.

### **1.2.2 Die Hormonersatztherapie**

Neben der gezielten Behandlung der einzelnen Symptome erfolgt die Behandlung der Wechseljahresbeschwerden bislang durch Substitution mit Estrogen- und Estrogen-Gestagen-haltigen Arzneimitteln [11].

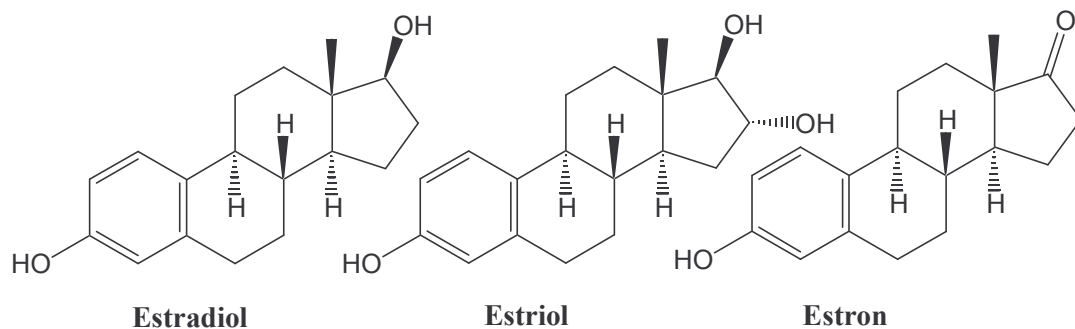
In der US-amerikanischen WHI-Studie wurde das Nutzen-Risiko-Verhältnis einer Hormonsubstitution (HRT) mit einer Estrogen-Gestagen-Kombination in der Menopause untersucht [12].

Die Studie ergab einen signifikanten Anstieg der Komplikationen bei koronaren Herzkrankheiten und eine erhöhte Zahl invasiver Mammakarzinome unter der HRT. Die Inzidenz von Kolonkarzinomen und Hüftfrakturen sank jedoch. Aufgrund der hohen Anzahl der Komplikationen wurde ein Teil der Studie im Jahr 2002 frühzeitig abgebrochen.

Das BfArM empfiehlt vorerst, die HRT nur noch kurzfristig bei stark ausgeprägten klimakterischen Beschwerden nach dem Ausschluss von Risikofaktoren wie Krebs und Herz-Kreislaufkrankungen einzusetzen. Dabei sollten die Hormone so niedrig wie möglich dosiert werden. Estrogene sollten nicht mehr als Osteoporoseprophylaxe verordnet werden [13].

### 1.3 Estrogene

Estrogene sind Sexualhormone mit einer  $C_{18}$ -Steroidstruktur, die überwiegend in den Eierstöcken und der Plazenta, daneben aber auch im Hoden, in der Nebennierenrinde und durch Aromatisierung von Androgenen im Fettgewebe gebildet werden. Es sind über 20 Estrogene bekannt. Die wichtigsten Estrogene sind 17- $\beta$ -Estradiol, Estriol und Estron (Abb. 1.1) [14].



**Abb. 1.1:** Strukturformeln der wichtigsten Estrogene

Neben der Ausbildung und dem Erhalt der weiblichen sekundären Geschlechtsorgane beeinflussen Estrogene Stoffwechselfvorgänge im Körper. Sie wirken sich positiv auf den Plasmacholesterolspiegel aus, indem sie u.a. den HDL-Plasmaspiegel erhöhen und den LDL-Plasmaspiegel erniedrigen [15, 16]. Daneben wirken Estrogene proteinanabol. Des Weiteren fördern sie die Knochenbildung, erhöhen die Resorption von Calcium, Natrium und Phosphor, bewirken Wasserretention und erhöhen die Gerinnungsfähigkeit des Blutes [14]. Die Estrogene zeigen direkte und indirekte Effekte auf Blutgefäße, u.a. durch verstärkte Vasodilatation [17].

Zusammen mit Progesteron sorgen sie für den Erhalt der Schwangerschaft, sind aber auch neben dem Eitransport für die Uterusmotilität und die Sekretzusammensetzung der Gebärmutter und der Eileiter verantwortlich [18].

## 1.4 Estrogenrezeptoren

### 1.4.1 Entdeckung der Estrogenrezeptoren

Schon gegen Ende des 19. Jahrhunderts machte *Beatson* die Entdeckung, dass es bei prämenopausalen Frauen, die an Brustkrebs erkrankt waren, durch Entfernung der Eierstöcke zu einer Regression der Erkrankung kommen kann [19]. Mitte des 20. Jahrhunderts kamen dann die Adrenal- und Hypophysektomie als chirurgische Therapien des Mammakarzinoms hinzu [20, 21]. Der eigentliche Zusammenhang zwischen den operativen Eingriffen und der Karzinomregression war jedoch noch unbekannt.

*Jensen* und *Jacobson* entdeckten im Jahr 1962, dass Estradiol sich zwar im Uterus, der Vagina und der Hypophyse, nicht jedoch in der Lunge oder im Muskelgewebe anreicherte [22]. Sie stellten die These auf, dass in den Zielgeweben des Estradiols ein Rezeptor für das Molekül vorhanden sein müsste. Das Rezeptorprotein konnte im Jahr 1966 von *Toft* isoliert werden [23, 24]. *Jensen* postulierte, dass der Brustkrebs auf eine endokrine Therapie ansprechen sollte, wenn Estrogenrezeptoren im Karzinom nachweisbar seien [25].

Mitte der 80er Jahre gelang es erstmals, den Estrogenrezeptor zu klonen [26, 27, 28]. *Kuiper* konnte im Jahr 1996 einen weiteren Estrogenrezeptor aus dem Prostatagewebe von Ratten isolieren, den Estrogenrezeptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ), der später auch aus Mäusen und menschlichem Gewebe isoliert werden konnte [29, 30, 31]. Es folgte die Umbenennung des bisher bekannten Rezeptors in Estrogenrezeptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ).

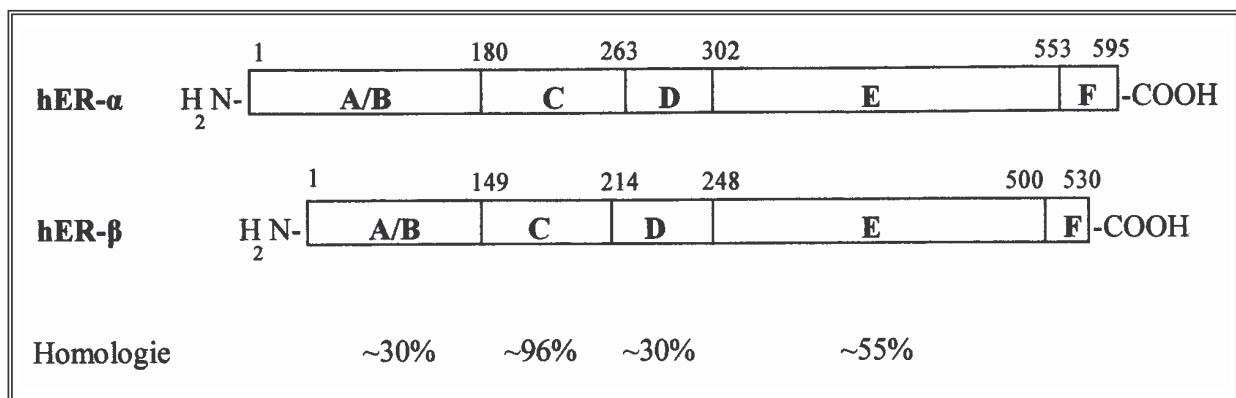
*Hawkins* veröffentlichte im Jahr 2000 die Identifikation eines dritten Estrogenrezeptors, des ER- $\gamma$  [32]. Er wurde aus dem Fisch *Micropogonias undulatus*, *Sciaenidae*, isoliert. Dieser Fisch exprimiert neben ER- $\gamma$  ebenfalls ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . In Studien mit ER- $\alpha/\beta$ -knockout Mäusen gibt es Hinweise auf die mögliche Existenz eines dritten ER bei Säugetieren [33]. Die genauen physiologischen Aufgaben des ER- $\gamma$  konnten jedoch noch nicht geklärt werden.

### 1.4.2 Die funktionellen Domänen der Estrogenrezeptoren- $\alpha$ und - $\beta$

ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren. Es handelt sich dabei um ligandeninduzierbare Transkriptionsfaktoren.

Die beiden Estrogenrezeptoren weisen Übereinstimmungen in ihren konservierten Strukturen auf. Der menschliche ER- $\alpha$  besteht aus 595 Aminosäuren, ER- $\beta$  besitzt hingegen nur 530 Aminosäuren [34, 35]. Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Rezeptor ER- $\beta$ 530 sind noch mehrere Isoformen dieses Rezeptors bekannt, die in ihrer Länge und in ihrer Aminosäuresequenz variieren [30, 34, 36, 37].

Die Estrogenrezeptoren werden in sechs funktionelle Domänen unterteilt, die Domänen A bis F (Abb. 1.2) [36].

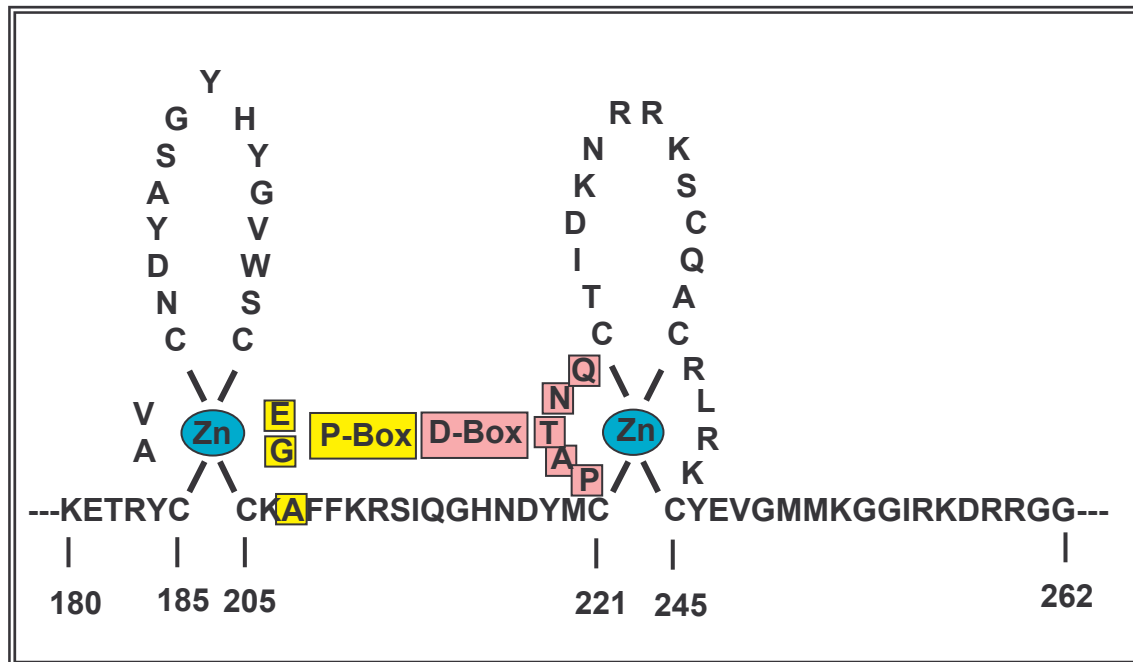


**Abb. 1.2:** Funktionelle Domänen der Estrogenrezeptoren, Angabe der Aminosäurenummern und der Homologie der Domänen nach *Dechering* [35], *Mosselman* [30]

Die N-terminale Region A/B besitzt nur eine Übereinstimmung von 30% bezüglich der Länge und der Aminosäuresequenz der beiden ER. Diese Region ist jedoch in der gesamten Familie der Steroidhormonrezeptoren variabel. Sie ist der Sitz der Aktivierungsfunktion-1 (AF-1), die bei ER- $\alpha$  ligandenunabhängig für eine gen- und zellspezifische Aktivierung sorgt [38]. Hierfür tritt sie mit dem Präinitiationskomplex der Transkription oder mit Coaktivatoren in Wechselwirkung [39, 40]. Die ligandenunabhängige Aktivierung des ER- $\alpha$  über die AF-1-Domäne steht in engem Bezug zum Phosphorylierungsstatus des Rezeptors [41]. Die Aktivierungsfunktion-1 wird für die partiell agonistische Wirkung der selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) verantwortlich gemacht [42]. Eine funktionsfähige AF-1 scheint bei ER- $\beta$  zu fehlen [43].

Die DNA-bindende Domäne (DBD), welche eine 95 %ige Homologie von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  aufweist, liegt in der Region C des Rezeptors. Sie ist für die Rezeptordimerisierung und die

DNA-Bindung verantwortlich. Die C-Domäne enthält acht Cysteinmoleküle, die durch Koordination an Zink zwei Zinkfinger ausbilden können (Abb. 1.3) [44].



**Abb. 1.3:** Zinkfinger motive des ER nach Fuller [45], Tsai [46]. Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgt im Ein-Buchstaben-Code

Die Zinkfinger dienen der Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb der Promotoren der estrogenabhängigen Zielgene, den „estrogen response elements“ (ERE). Sie sind für die Dimerisierung der Rezeptoren zuständig. Die in der P-Box gelb hervorgehobenen Aminosäuren E, G und A sind essentiell für die ERE-Bindung [46]. Nach Green und Umesono führten Mutationen dieser Aminosäuren zu den Glucocortikoidrezeptor-spezifischen Aminosäuren G, S und V, die zur Erkennung des „glucocortikoid response elements“ dienen [47, 48].

Die D-Box gewährleistet die Rezeptordimerisierung und die unspezifische DNA-Erkennung [46]. Die Estrogenrezeptoren können jedoch nicht nur Homodimere (z.B. ER- $\alpha$ / ER- $\alpha$ ), sondern auch Heterodimere (z.B. ER- $\alpha$ / ER- $\beta$ ) bilden [36, 49, 50].

Die kurze Domäne D ist in ihrer räumlichen Struktur auf Grund ihrer hohen Flexibilität variabel [51]. Jackson postulierte, dass sie auch ein Angriffspunkt für Coaktivatoren sein könnte [52].

Die E-Domäne ist die so genannte Ligandenbindungsdomäne (LBD). Sie beinhaltet die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion-2 (AF-2) des Estrogenrezeptors [53, 54], daneben aber auch die ligandenunabhängige AF-2a [55] und die AF-2b [56]. Neben den

Aktivierungsfunktionen enthält die Domäne E aber auch eine Dimerisierungsregion und eine Bindungsstelle für das „heat shock protein 90“ (HSP 90) [53].

AF-1 und AF-2 können unabhängig voneinander die Transkription aktivieren, jedoch wirken sie in den meisten Fällen synergistisch zusammen [57, 58, 59].

Die geringe Übereinstimmung der LBD der beiden Estrogenrezeptoren ist ein Hinweis darauf, dass eine Entwicklung subtypspezifischer Liganden möglich ist. Die Homologie beträgt nur 55% und entspricht damit in etwa der Homologie der LBD des Glucocortikoid- und des Progesteronrezeptors, die über unterschiedliche Liganden verfügen.

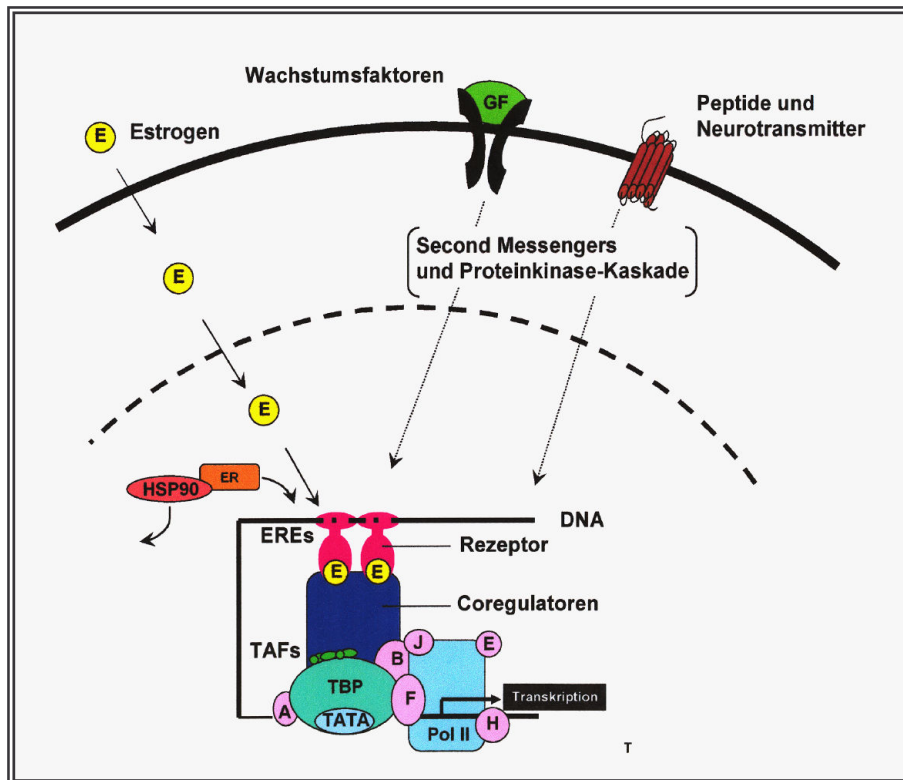
Für die C-terminale Domäne F konnte noch keine Funktion eindeutig nachgewiesen werden [46]. Man vermutet eine modulatorische Transkriptionsaktivierung bei ER- $\alpha$  [60].

### 1.4.3 Rezeptoraktivierung

In Abwesenheit eines Liganden liegen die kernständigen Estrogenrezeptoren in inaktiver Form im Zellkern vor. Sie sind dabei an HSP 90 assoziiert [61].

Bindet ein Ligand an einen inaktiven ER, so dissoziiert der ER-HSP 90-Komplex und der Rezeptor wird an verschiedenen Serin- und Tyrosinresten phosphoryliert, wodurch sich seine räumliche Struktur ändert [62, 63]. Durch die Ligandenbindung erhöht sich der basale Phosphorylierungsgrad des ER auf das drei- bis vierfache, wodurch sich die Transaktivierungsstärke und die Affinität zu bestimmten DNA-Sequenzen erhöht [63, 64].

Der Konformationswechsel des ER ermöglicht die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren und nach der Bindung der Coaktivatoren die Bindung an das ERE [46, 65]. *Pettersson* konnte zeigen, dass ER- $\beta$  bei einem niedrigen Estrogenlevel die Aktivität des ER- $\alpha$  hemmt. Er führt dies auf die Bildung von Heterodimeren zurück [66]. Die Bindung von Antiestrogenen und SERM bewirkt eine Konformationsänderung des ER, die die Interaktionen mit Coaktivatoren unterschiedlich stark behindert [39].



**Abb. 1.4:** Modell der Transkriptionsaktivierung durch den ER nach *Katzenellenbogen* [67] und *Tsai* [46]. TATA: Basensequenz TATAAA innerhalb des Promotors; ERE: „estrogen response element“; HSP 90: „heat shock protein 90“; TBP: „TATA-box binding protein“; TAF: „TBP-associated factor“; pol II: RNA-Polymerase II; A/B/E/F/H: Transkriptionsfaktoren (TFII) der RNA-Polymerase II

Nach erfolgter Dimerisierung bindet der Komplex aus Rezeptoren, Liganden und Coaktivatoren an das ERE [68].

Durch die Bildung des ER-ERE-Komplexes binden mehrere Proteine, die Transkriptionsfaktoren TFII, an die TATA-Box. Bei der TATA-Box handelt es sich um eine DNA-Sequenz, die 25-30 Basenpaare oberhalb des Startpunkts der Transkription liegt. Zuerst bindet der Transkriptionsfaktor TFIID, bestehend aus dem „TATA-box binding protein“ (TBP) und mindestens acht TAFs (TBP-associated factors), an die TATA-Box-Sequenz [69, 70]. Der Präinitiationskomplex der Transkription bildet sich durch Bindung von TFIIA/B/E/F/H und RNA-Polymerase II [71]. Der Estrogenrezeptor interagiert über die AF-1 (ER- $\alpha$ ) und AF-2 mit dem TBP [72].

Aus diesem Initiationskomplex heraus beginnt die RNA-Polymerase II mit der Transkription und der Bildung von mRNA.



### 1.4.3.1 Membranständige Estrogenrezeptoren

Die oben beschriebene Aktivierung der ER erstreckt sich mitunter über einen Zeitraum von einigen Stunden oder länger. Verschiedene Berichte, die von estrogenen Wirkungen innerhalb weniger Minuten handelten, gaben Rätsel auf. Weitere Untersuchungen führten zu der Entdeckung membranständiger Estrogenrezeptoren, die nicht-genomische Signalwege auslösen können [73, 74]. Diese Rezeptoren sind identisch mit den kernständigen Rezeptoren ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  [75].

Die membranständigen Rezeptoren wirken in der hormonabhängigen MCF-7-Zelllinie innerhalb weniger Minuten über den MAPK-Signalweg [76, 77]. MAP-Kinasen sind Serin/Threoninkinasen, die extrazelluläre Signale von verschiedenen Membranrezeptoren nach innen an Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteine und Enzyme weitergeben.

In MCF-7-Zellen werden die MAP-Kinasen ERK-1 und ERK-2 über den c-Src-Ras-Raf-MAPK-Signalweg aktiviert. Die estrogenabhängige Aktivierung des c-Src erfordert die intrazelluläre Freisetzung von Calcium [78]. Durch die Aktivierung dieses Signalwegs wirkt Estrogen ähnlich wie ein Wachstumsfaktor.

Die schnelle Aktivierung des MAPK-Signalweges spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Zellzykluskontrolle durch Estrogen.

### 1.4.4 Coregulatoren

Die gegenwärtigen Modelle der Genregulation in eukaryotischen Zellen postulieren die Existenz verschiedener Genaktivitätsstadien, zum einen die Unterdrückung der Genaktivität, gegensätzlich dazu die Aktivierung oder den Ruhezustand des Gens [79, 80]. Die Estrogenwirkung wird üblicherweise mit einer Aktivierung des Gens aus seinem Grundzustand heraus assoziiert.

Die Forschung hat in den letzten Jahren viele Proteine identifizieren können, die mit Steroidhormonen interagieren und so zu einer Transkriptionssteigerung führen (Coaktivatoren), oder aber die Genaktivität inhibieren und aktivierte Zielgene „abschalten“ (Corepressoren). Bisher wurden für die ER 19 Coaktivatoren und 5 Corepressoren beschrieben.

#### 1.4.4.1 Coaktivatoren

Eine Vielzahl der Coaktivatoren besitzt eine intrinsische Histonacetyltransferase-Aktivität, welche Lysinreste am N-Terminus der Histone 3 und 4 im Chromatin acetyliert [81]. Dies führt zu einer schwächeren Histon-DNA-Bindung [82]. Das Chromatin ändert seine Konformation, so dass Transkriptionsfaktoren der Zugang zur DNA ermöglicht wird [83].

Die überwiegende Mehrzahl der Coaktivatoren bindet an die LBD des Rezeptors. Diese tritt mit der AF-2 des ER-Agonist-Komplexes über ihre NR-Box in Wechselwirkung. Die NR-Box besteht aus drei gleichmäßig verteilten leucinreichen LXXLL-Motiven [84]. L steht für die Aminosäure Leucin, X für eine weitere Aminosäure. Coaktivatoren reagieren weder mit einem freien noch mit einem an einen Antagonisten gebundenen Rezeptor, sondern nur mit dem Agonist-ER-Komplex.

Eine wichtige Gruppe der Coaktivatoren ist die p160/SRC-Coaktivator-Familie. Sie besteht aus SRC-1, SRC-2 und SRC-3 [85]. SRC-1 wurde im Jahr 1995 als erster Coaktivator geklont [86]. Er interagiert mit der AF-1 und der AF-2 der Agonist-gebundenen ER und steigert die Transkription [35]. Bemerkenswert ist, dass SRC-1 die ligandenunabhängige Transkriptionsaktivität des ER- $\beta$  erhöht, nicht aber die des ER- $\alpha$  [31], wohingegen SRC-3 die ER- $\alpha$ -vermittelte, jedoch nicht die ER- $\beta$ -vermittelte Transkription steigert [87]. Interessanterweise ist das SRC-3-codierende Gen AIB1 in vielen Estrogenrezeptor-positiven Brustkrebszellen überexprimiert [88]. SRC-1 und SRC-3 zeigen Histonacetyltransferase-Aktivität. Alle SRCs besitzen zwei unterschiedliche Transkriptionsaktivierungsdomänen, AD-1 und AD-2, was zumindest teilweise ihre transkriptionsaktivierende Wirkung erklären könnte [61].

#### 1.4.4.2 Corepressoren

Als negative Coregulatoren werden RIP140 und SHP bezeichnet. Es sind AF-2-bindende Proteine, die *in vivo* SRC-1 antagonisieren können [89]. Die genaue Wechselwirkung der Corepressoren mit den Transaktivierungsfaktoren ist noch nicht geklärt [52, 90].

Die Corepressoren N-CoR [90] und SMRT [91] binden an die ligandenfreien Retinoid- und Thyroidrezeptoren und unterdrücken als Teil eines Histondesacetylase-Komplexes aktiv die Transkription [84]. Scheinbar binden jedoch sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  im ligandenfreien Zustand weder SMART noch N-CoR [92].

In der Gegenwart von 4-Hydroxytamoxifen interagieren die Corepressoren hingegen mit ER- $\alpha$  [92]. Eine Überexpression der beiden Faktoren blockiert die partiell agonistische Aktivität des 4-Hydroxytamoxifens. *Montano* gelang es im Jahr 1999, einen neuen Corepressor zu identifizieren, den „repressor of estrogen receptor activity“ (REA), der bei beiden Estrogenrezeptorsubtypen die durch SRC-1 gesteigerte Aktivität hemmt [93]. Ein weiterer Corepressor ist RSP5/RPF1, der die Tamoxifen-vermittelte partiell-agonistische Aktivität am ER- $\alpha$  unterdrückt [94].

#### 1.4.5 Alternative Aktivierungswege

Zusätzlich zu den oben beschriebenen klassischen Aktivierungswegen können die ER auch über alternative Signalwege aktiviert werden. Ein wichtiger Schritt ist hierbei die Phosphorylierung der ER, die sowohl Teil der ligandenabhängigen als auch der –unabhängigen Aktivierung ist [95].

Dopamin [96], die Proteinkinase-A (PKA), Cycline und der Wachstumsfaktor TGF- $\alpha$  [97] können ER-vermittelte Transkriptionsaktivität induzieren bzw. steigern. Der Wachstumsfaktor EGF induziert in Abwesenheit von Estradiol die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 118 des ER- $\alpha$ . Diese Phosphorylierung ist abhängig von MAPK und führt zu ligandenunabhängiger Aktivität des ER- $\alpha$  [41, 98]. Estradiol kann ebenfalls die Phosphorylierung von Serin 118 induzieren. Dieser Vorgang ist jedoch unabhängig von MAPK [99]. Bei ER- $\beta$  erfolgt ebenfalls eine Phosphorylierung der Serinreste 106 und 124 über den MAPK-Weg, was zu einer ligandenunabhängigen Rekrutierung von SRC-1 und einer erhöhten Transkriptionsaktivierung führt [100].

Cycloadenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert die Proteinkinase-A. Durch Erhöhung der zellulären cAMP-Konzentration wird eine ligandenunabhängige Transkriptionsaktivierung induziert, die dennoch AF-2 und PKA-abhängig ist [101]. Hierdurch wird die agonistische Aktivität Tamoxifen-verwandter Antiestrogene erhöht und die antagonistische Wirkung der SERM reduziert [102].

Cycline und cyclinabhängige Kinasen (CDK) regulieren den Zellzyklus. Estradiol erhöht in MCF-7-Zellen die Menge der den Zellzyklus G1 regulierenden Cycline A, B1, D1, D3 und E. Das in Brustkrebszellen stark exprimierte Cyclin D1 induziert ligandenunabhängige Aktivität der ER, indem es als Brückenfaktor zwischen SRC-1 und einem ligandenfreien ER funktioniert [103]. Serin 104 und Serin 106 des ER- $\alpha$  werden durch den Cyclin A-cdk2-

Komplex phosphoryliert, der sowohl die ligandenabhängige als auch die ligandenunabhängige Transkriptionsaktivierung fördert [104, 105].

Des Weiteren können beide Estrogenrezeptoren die Transkription über ein zweites ERE aktivieren, das AP-1-Element, das die Bindungsstelle des Fos-Jun-Transkriptionsfaktor-Komplexes ist. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren Gene, die in Zellprozessen wie Proliferation, Differenzierung, Zellbeweglichkeit und Apoptose involviert sind. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Transkriptionsaktivität in der Gegenwart von Estradiol. ER- $\alpha$  erhöht im Beisein von Estradiol die Transkriptionsaktivität von AP-1, wohingegen ER- $\beta$  die Transkription hemmt. In Gegenwart von Raloxifen und Tamoxifen hingegen stimuliert ER- $\beta$  die Transkription, ER- $\alpha$  hemmt sie [106, 107].

#### 1.4.6 ERR: Estrogenrezeptor-verwandte Rezeptoren

Bei den ERR handelt es sich um eine Unterfamilie der „orphan nuclear receptors“, um Nuklearrezeptoren, denen noch kein physiologischer Ligand zugeordnet werden konnte. Man hat bisher drei ERR identifizieren können, ERR- $\alpha$ , ERR- $\beta$  und ERR- $\gamma$  [108, 109, 110]. Die ERR sind den ER strukturell ähnlich. In der DBD weist ERR- $\alpha$  beispielsweise eine Übereinstimmung von 68 % mit ER- $\alpha$  auf, in der LBD sind es noch 36 % [111].

Estradiol und andere natürliche Estrogene sind jedoch keine Liganden der ERR [112, 113]. ERR- $\alpha$  findet sich in vielen Geweben [112]. Er aktiviert u.a. die Transkription von Lactoferrin [113]. ERR- $\beta$  hingegen kommt in geringem Maße in inneren Organen wie dem Herz vor [108, 112]. Bei Mäusen ist ERR- $\beta$  wichtig für die embryonale Entwicklung [114]. ERR- $\gamma$  liegt in sehr hohen Konzentrationen im fötalen Gehirn vor [109]. In adulten Geweben ist der Rezeptor in vielen inneren Organen weit verbreitet, so z.B. im Gehirn und der Lunge [109].

Die ERR binden als Monomere an die ERRE (ERR-response elements) der DNA, können aber auch als Homo- oder Heterodimere an das ERE binden [110, 113, 115, 116]. Es wurde berichtet, dass ER- $\alpha$  im Gegensatz zu ER- $\beta$  in der Lage ist, als Homodimer an bestimmte ERRE zu binden [117]. Heterodimere aus ER und ERR konnten bis jetzt nicht *in vivo* beobachtet werden, jedoch konnte *Yang in vitro* Bindungen zwischen ER- $\alpha$  und ERR- $\alpha$  unter kontrollierten Bedingungen nachweisen [113].

Diethylstilbestrol (DES) wurde kürzlich als inverser Agonist an allen ERR beschrieben [118, 119]. Die Bindung von DES führt zu einer Dissoziation von Coaktivatoren und einer Minderung der Transkriptionsaktivität [118]. Auch 4-Hydroxytamoxifen (OHT) wurde als

inverser Agonist an ERR- $\beta$  und ERR- $\gamma$  beschrieben [119]. Raloxifen ist hingegen kein Ligand der ERR.

Interessanterweise zeigt ERR- $\gamma$  in Abwesenheit eines Liganden Transkriptionsaktivität, wohingegen die Bindung eines Liganden zu einer antagonistischen LBD-Konformation führt [110, 120].

Da die ERR zu einer Abnahme der Cyclin D1-Synthese in Calvariazellen der Ratte führen [121] und Cyclin D1 sowohl Ziel als auch Regulator der Estrogenaktivität ist, ist die Frage interessant, ob Cyclin D1 ein zentraler Punkt des cross talks zwischen dem ERR- und dem ER-Signalweg sein könnte. Ein weiterer Anhaltspunkt für einen cross talk der Rezeptoren liefert das TFF1-Gen (synonym pS2), ein Prognosefaktor für Brustkrebs, das neben einem TFF1-ERE auch ein TFF1-ERRE aufweist [116]. Die ERR-Transkriptionsaktivität am TFF1 konnte durch SRC-Coaktivatoren gesteigert werden. ERR- $\alpha$  ist sowohl beim Estrogenrezeptor-positiven als auch -negativen Brustkrebs entdeckt worden [116].

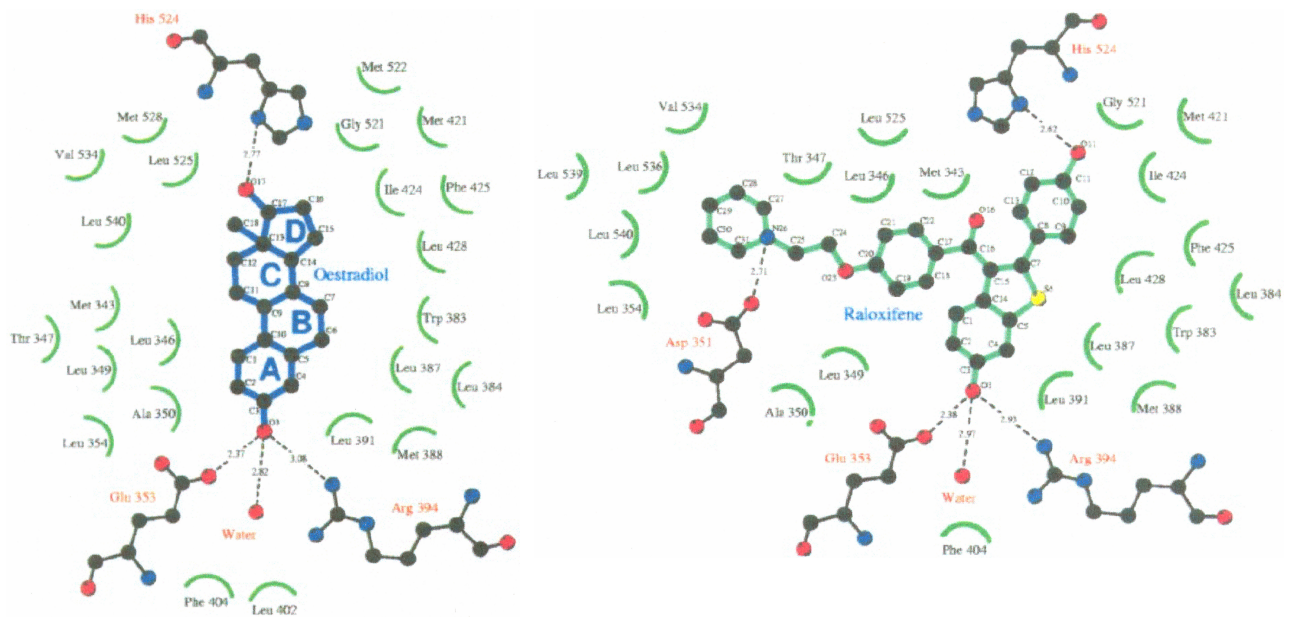
Obwohl die Pharmakologie der ERR noch nicht genau bekannt ist und weitere Forschungen nötig sind, um das Zwischenspiel von ER und ERR besser verstehen zu können, ist die Aussicht interessant, gemeinsame Liganden für ER und ERR zu finden und dadurch einen neuen Therapieansatz für die Bekämpfung des Mammakarzinoms zu erhalten.

#### **1.4.7 Bindungsmodi verschiedener Liganden an ER- $\alpha$ und ER- $\beta$**

*Pike, Brzozowski et al.* ist es gelungen, zum einen Estradiol und Raloxifen mit ER- $\alpha$  und zum anderen Genistein und Raloxifen mit ER- $\beta$  zu kristallisieren [122, 123, 124].

Die Ligandenbindungstasche des Rezeptors liegt in der hydrophoben Region der LBD. Sie wird aus den Helices H3, H6, H8, H11, H12 und den Haarnadelbiegungen S1/S2 gebildet [122]. H12 verschließt die Rezeptorbindungstasche.

Estradiol bindet in der Rezeptorbindungstasche zwischen H11, H3 und H6. Die phenolische OH-Gruppe des Estradiols sitzt zwischen H3 und H6, durch eine Wasserstoffbrückenbindung (WBB) mit der Carboxylgruppe der Aminosäure Glu 353, mit der Guanidiniumstruktur des Arg 394 und mit einem Wassermolekül fixiert. Die 17 $\beta$ -OH-Gruppe interagiert mit His 524 der H11 (Abb. 1.5). Hydrophobe Wechselwirkungen werden zwischen dem Ring A des Estradiols und der Verbindungsstelle der Ringe A und B mit Ala 350, Leu 387 und Phe 404 ausgebildet. Der Ring D des Estradiols tritt mit Ile 424, Gly 521 und Leu 525 in unpolaren Kontakt [122].



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung der Interaktionen des Agonisten Estradiol (links) und des SERM Raloxifen (rechts) mit ER- $\alpha$  [122]

Raloxifen bindet ebenfalls in der hydrophoben Tasche des ER- $\alpha$ . Die OH-Gruppe des Benzothiophens bindet zwischen H3 und H6 wie die phenolische OH-Gruppe des Estradiols, wohingegen eine OH-Gruppe des Raloxifens mit His 524 wechselwirkt [122]. Die Seitenkette des Raloxifens geht hydrophobe Wechselwirkungen mit H3, H5/6, H11 und der Schleife zwischen H11 und H12 ein und bildet eine WBB zwischen Asp 351 und der Piperidinstruktur aus. Die basische Seitenkette verdrängt H12 und steht aus der von H3/H11 gebildeten Tasche hervor [122].

Im Falle des Estradiols verschließt H12 die Bindungstasche des Rezeptors und ist an H3, H5/6 und H11 gedrängt (Abb. 1.8). Durch diese präzise Positionierung wird die AF-2 hervorgebracht und Coaktivatoren können rekrutiert werden.

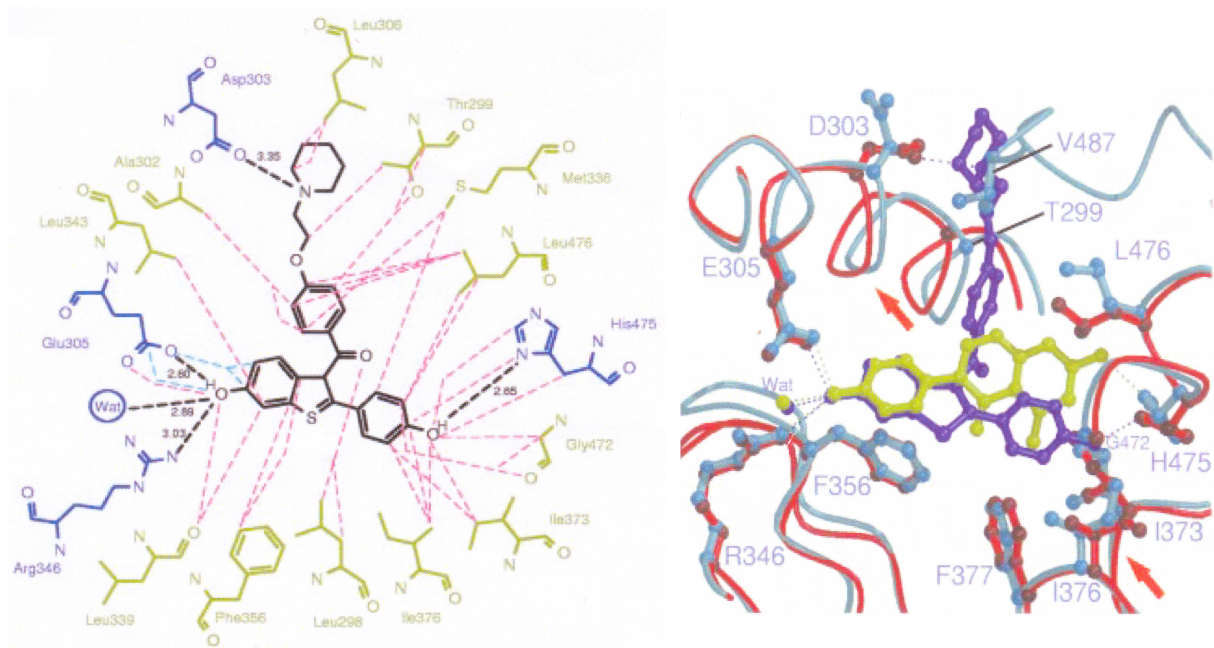
Mit Raloxifen als Ligand liegt H12 aber in einer aus H5 und dem C-terminalen Ende der H3 gebildeten Furche in einer Antagonisten-ähnlichen Weise vor [122]. So wird Lys 362 maskiert, das essentiell für die Transkription ist [125]. Die Coaktivator-Rekrutierung wird antagonisiert [123].

Die Bindung voller Antagonisten bedingt eine weitere Verschiebung der H12 und führt zu einer im Vergleich zu Raloxifen noch stärkeren Abschirmung der AF-2 [123].



Bei beiden ER- $\beta$ -Ligand-Komplexen wird die LBD am N-terminalen Ende der H11 von den Seitenketten des Met 403, Ala 456, Met 460 und Leu 462 gebildet und durch WBB stabilisiert.

Genistein wurde mit dem menschlichen ER- $\beta$  (hER- $\beta$ ) kristallisiert, Raloxifen hingegen mit dem ER- $\beta$  der Ratte (rER- $\beta$ ; da die beiden Rezeptoren sich nur in der AF-1 unterscheiden, in der LBD jedoch weitgehend übereinstimmen, wurde die Bezifferung des hER auf den rER übertragen). Die Ligandenbindungstasche sitzt tief in der hydrophoben Region des Rezeptors, umgeben von den Helices H3, H6, H8, H11 und H12.



**Abb. 1.6:** Links: Schematische Darstellung der Interaktionen von Raloxifen und der rER- $\beta$ -LBD [WBB blau, van-der-Waals-Kräfte grün, Interaktionen zw. Protein und Ligand gestrichelt dargestellt (WBB mit Entfernungen in schwarz,  $d \leq 3.3$  Å cyanfarben,  $3.3$  Å  $< d \leq 3.8$  Å pinkfarben)]. Rechts: Vergleich der Bindungsart des Genisteins (Protein hellblau, Genistein grün) und des Raloxifens (Protein rot, Raloxifen violett) in der rER- $\beta$ -LBD. Die Pfeile markieren Konformationsänderungen bedingt durch Raloxifen [124]

Raloxifen wechselwirkt über die OH-Gruppe des Benzothiophens mit ER- $\beta$ , die mit Glu 305 (Glu 353 bei ER- $\alpha$ ), Arg 346 (Arg 394) und einem Molekül Wasser in Kontakt tritt (Abb. 1.6). Die zweite OH-Gruppe bildet eine WBB mit His 475 (His 524) aus. Die Seitenkette ragt aus der Tasche hinaus, wobei das Ende der Seitenkette durch Ausbildung einer WBB mit der Carboxylat-Gruppe von Asp 303 (Asp 351) verankert ist [124]. Um die Seitenkette zu binden, bewegen sich Thr 299 (Thr 347), Ala 302 (Ala 350) und Trp 335 (Trp 383) nach außen, und

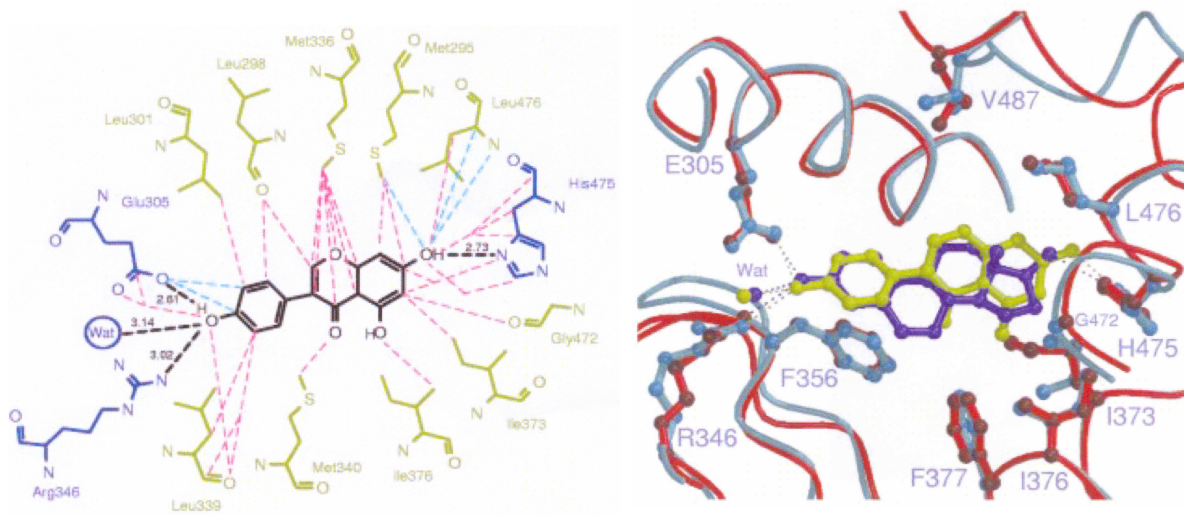
die N-terminale Hälfte von H3 bewegt sich um 0.8-1.4 Å von der LBD weg. Als Ausgleich streben am entgegengesetzten Taschenende H7 und die H7/H8-Schleife zu Raloxifen hin.

Genistein bindet ähnlich wie Estradiol an den Rezeptor [122, 126].

Die phenolische Struktur sitzt zwischen H3, H6 und der  $\beta$ -Haarnadelbiegung. Die phenolische OH-Gruppe interagiert mit den Seitenketten von Glu 305 (Glu 353 im ER- $\alpha$ ), Arg 346 (Arg 394) und einem Molekül Wasser (Abb. 1.7). Die 7-OH-Gruppe des Isoflavons geht eine WBB mit His 475 (His 524) ein.

Genistein und Estradiol binden sehr ähnlich an die ER. Genistein ist geringfügig länger (12.1 Å) als Estradiol (10.8 Å), was durch eine kleine Bewegung der H11 mit einer Auswärtsbewegung von His 475 (His 524) kompensiert wird [124].

Mit 390 Å ist die Bindungstasche des hER- $\beta$ -Genistein-Komplexes kleiner als die des ER- $\alpha$ -Estradiol-Komplexes (490 Å). Der Hauptgrund dafür ist der Austausch von Leu 336 (Leu 384) des ER- $\alpha$  gegen Methionin bei ER- $\beta$ . Dadurch und durch die höhere Planarität des Genisteins schließt sich die Bindungstasche dichter um Genistein [124].



**Abb. 1.7:** Schematische Darstellung der Interaktionen von Genistein und der hER- $\beta$ -LBD [WBB blau, van-der-Waals-Kräfte grün, Interaktionen zw. Protein und Ligand gestrichelt dargestellt (WBB mit Entfernungen in schwarz,  $d \leq 3.3$  Å cyanfarben,  $3.3$  Å  $< d \leq 3.8$  Å pinkfarben)]. Rechts: Vergleich der Bindungsart des Genisteins (Protein hellblau, Genistein grün) in der hER- $\beta$ -LBD mit Estradiol (Protein rot, Estradiol violett) in der hER- $\alpha$ -LBD [124]

Genistein und Raloxifen verursachen eine Konformationsänderung der AF-2, die von der Konformationsänderung der AF-2 in Gegenwart eines Agonisten abweicht (Abb. 1.7).

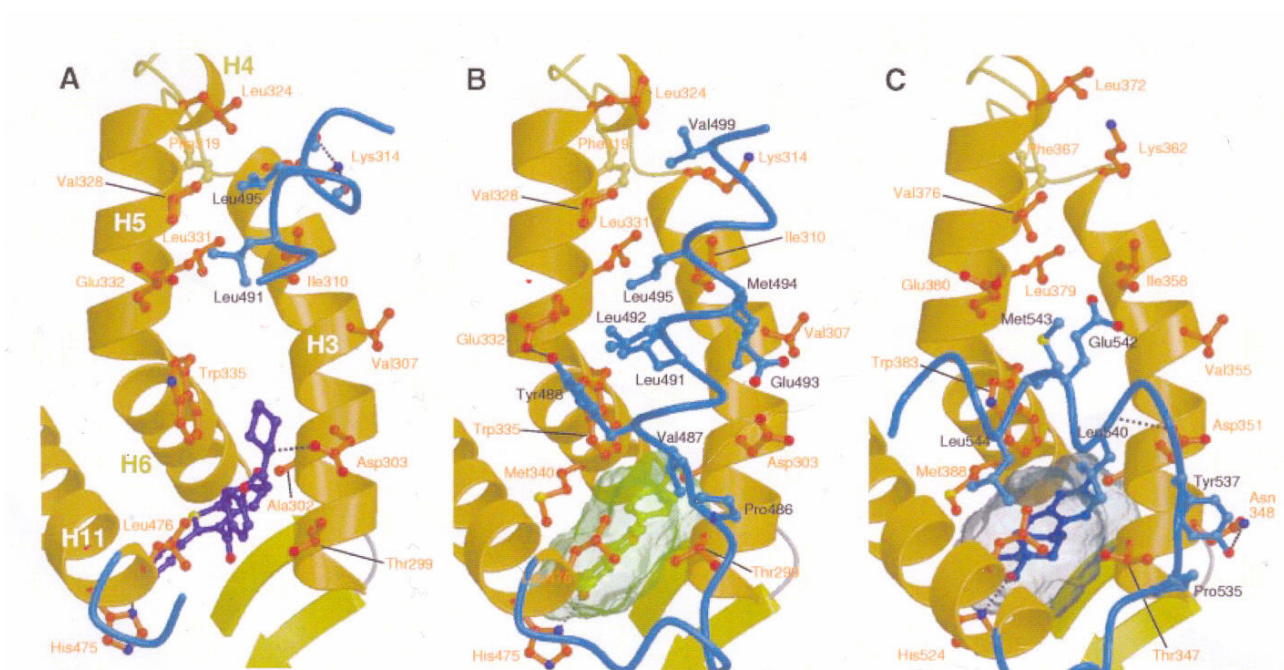


Die Bindung von Raloxifen verhindert durch die basische Seitenkette die für Agonisten typische Position der H12 über der Bindungstasche [124]. H12 liegt vielmehr in einer Furche zwischen H3, H4 und H5.

Die Konformation der H12 ähnelt der der H12 in dem Raloxifen-ER- $\alpha$ -Komplex, nur ist H12 in der hydrophoben Furche um 1.9-3.2 Å verschoben. Die Furche, in der die H12 liegt, ist die Bindungsseite der NR-Box der Coaktivatoren [127].

Die Helix H12 imitiert in Gegenwart von 4-Hydroxytamoxifen und Raloxifen die Konformation, die sie bei der Bindung von Agonisten einnimmt [122, 128]. Durch Asp 303 (Asp 351) wird die Seitenkette der SERM gebunden.

Betrachtet man den Genistein-hER- $\beta$ -Komplex, so liegt H12 auch hier zwischen H3 und H5 [124]. Am Eingang der Ligandenbindungstasche liegt Val 487 (Val 536) und forciert H12 in eine räumliche Position, die sich von der des Raloxifen-Komplexes unterscheidet. Die Position der H12 ähnelt derjenigen Position, die sie bei der Bindung eines Antagonisten einnimmt [124].



**Abb. 1.8:** Position der H12 in (A) Raloxifen- und (B) Genistein-ER- $\beta$ -LBD und (C) Estradiol-ER- $\alpha$ -LBD. H12 und H11/H12-Schleife sind blau dargestellt, Teile von H3, H5, H6 und H11 golden und die S1/S2-Nadelkurve gelb (oben in der Abbildung). Orange dargestellt sind die mit H12 interagierenden Reste, die interagierenden Reste der H11/H12-Schleife und der H12 sind schwarz dargestellt. Transparent sind die Ligandenbindungstaschen, gestrichelt die WBB dargestellt [124].

Die relativ ähnliche Tertiärstruktur der beiden ER-Bindungstaschen erklärt, weshalb viele Substanzen mit ähnlichen Affinitäten an die beiden Rezeptoren binden.

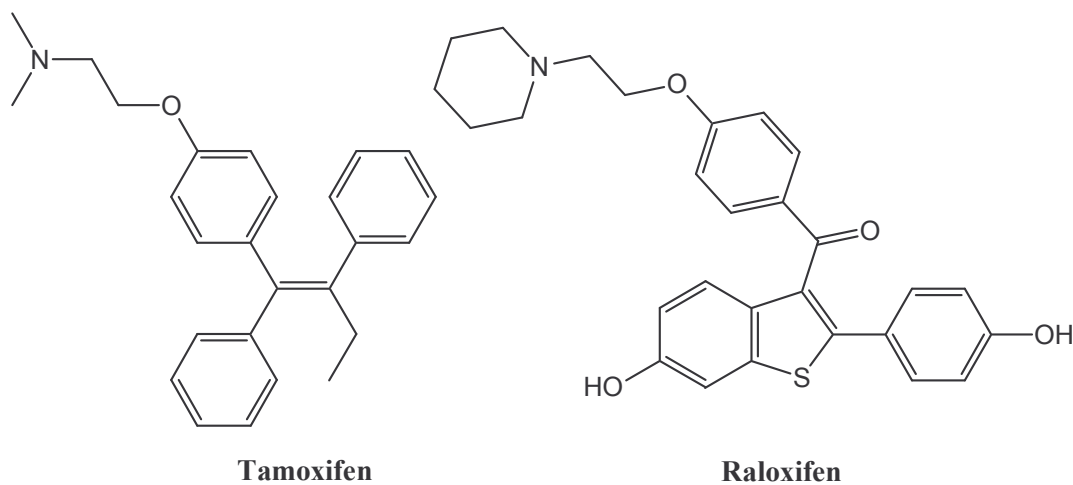
Die 30fach höhere Affinität des Genisteins für ER- $\beta$  [129] könnte auf den Austausch von Leucin in Position 336 (Leu 384 in ER- $\alpha$ ) der H6 des ER- $\alpha$  gegen Methionin beim ER- $\beta$  zurückzuführen sein. Der Schwefel des Methionins ist schwach polar und kann mit Proteinen WBB ausbilden [130]. Des Weiteren ist beim ER- $\beta$  an Position 373 (421) der H8 Methionin gegen Isoleucin ausgetauscht [124]. Die Wanderung des Methionins von der  $\alpha$ - zur  $\beta$ -Seite der Tasche könnte laut *Pike* den ER- $\beta$  befähigen, polarere Substanzen in der Tasche zu tolerieren. Allerdings reicht diese Erklärung nicht aus, die ER- $\beta$ -Präferenz des Genisteins zu erklären. Die unterschiedlichen Positionen der H12 im Genistein-hER- $\beta$ -Komplex und im Estradiol-hER- $\alpha$ -Komplex sind noch nicht eindeutig erklärbar.

Eine Ursache des partiellen Agonismus des Genisteins an ER- $\beta$  könnte in der nicht optimalen Position der H12 im Genistein-hER- $\beta$ -Komplex liegen [124, 129]. H12 imitiert hier nur teilweise die NR-Box von Coaktivatoren. Da bei der Bindung reiner Antagonisten die H12 perfekt die Interaktionen von NR-Box-Proteinen imitiert, liegt nach *Shiau* die Erklärung nahe, dass H12 als Autoinhibitor agieren kann [128]. Bei partiellen Agonisten wie Genistein müssten Coaktivatoren mit H12 um die NR-Box konkurrieren [124].

## 1.5 Selektive Estrogenrezeptor–Modulatoren

Tamoxifen wurde in den 70er Jahren zur Therapie des hormonabhängigen Brustkrebses zugelassen. Es wurde aufgrund seiner antagonistischen Wirkung an Estrogenrezeptoren im Brustgewebe irrtümlicherweise als Antiestrogen klassifiziert [131].

Die anfängliche Befürchtung, dass Tamoxifen und andere Antiestrogene im Langzeitgebrauch zu einem erhöhten Risiko führen, an Osteoporose und kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken, wurde jedoch nicht bestätigt. Stattdessen konnten Tamoxifen und später Raloxifen die Estrogenaktivität in Knochen und im Gefäßsystem imitieren (Abb. 1.9) [132].



**Abb. 1.9:** Strukturformeln der SERM Tamoxifen und Raloxifen

Tamoxifen begründete die Wirkstoffklasse der selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren, kurz SERM genannt. In einigen Geweben wirken die SERM als Agonisten, in anderen als Antagonisten [133]. Diese spezielle Pharmakologie macht die Wirkstoffklasse so interessant, da sie ein breites Spektrum von Brustkrebsprävention und -therapie bis hin zur Minderung klimakterischer Beschwerden der Frau sowie Prävention und Behandlung der Osteoporose eröffnet. Da die HRT als Behandlung der Wechseljahresbeschwerden in die Kritik geraten ist, könnten neuentwickelte SERM eine wirksame Therapiealternative darstellen.

Ein wichtiger Unterschied besteht jedoch zwischen Tamoxifen und Raloxifen: Tamoxifen wirkt als Agonist an den Estrogenrezeptoren des Uterus und wird mit einem Anstieg von Uteruskarzinomen in Verbindung gebracht [134].

Raloxifen erhöht das Risiko für Uteruskarzinome hingegen nicht [135]. Es ist zur Prävention und Behandlung der Osteoporose zugelassen. In Studien aus den 80er Jahren zeigte es keine

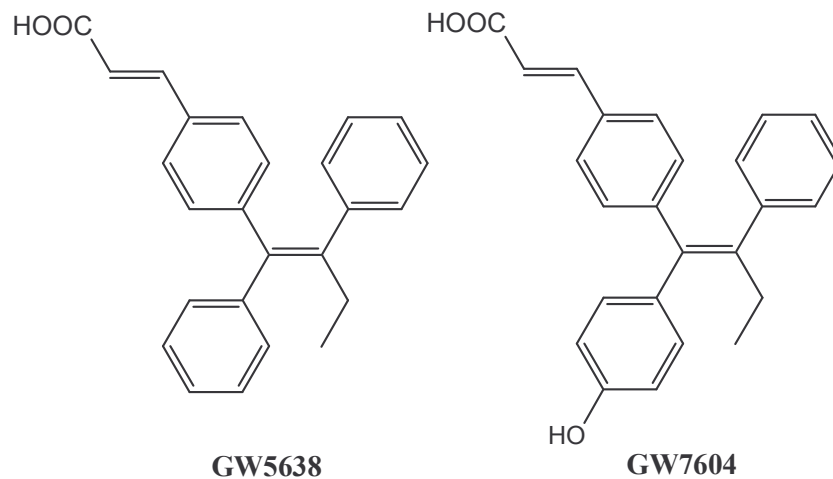
Wirksamkeit beim therapieresistenten fortgeschrittenen Brustkrebs [136]. Neuere Studien mit einer Hochdosistherapie (300 mg täglich) zeigen jedoch nur eine geringe Wirksamkeit gegen Brustkrebs [137].

Tamoxifen gilt als SERM der ersten Generation, Raloxifen als SERM der zweiten Generation.

### 1.5.1 Neue selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren

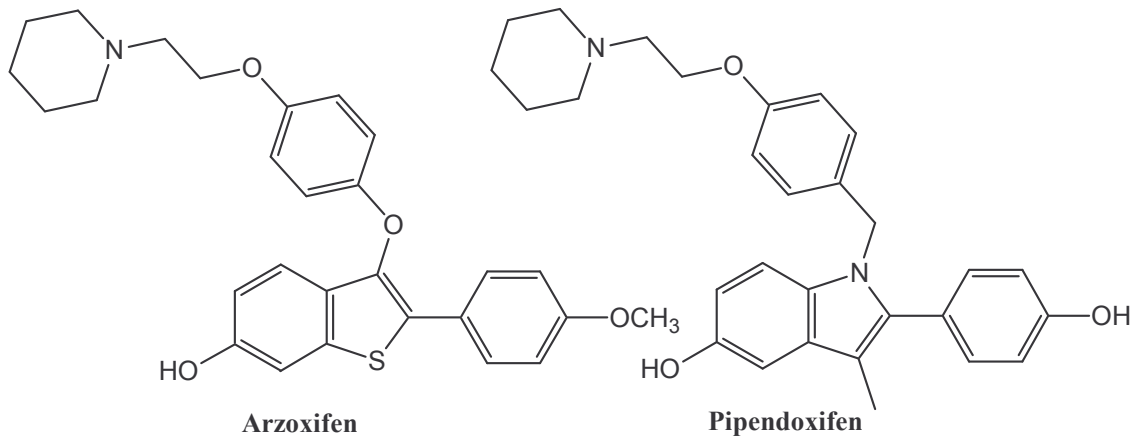
Ausgehend von den Strukturen Tamoxifens und Raloxifens wurden strukturell sehr unterschiedliche SERM hergestellt.

Abgeleitet von der Triphenylethylenstruktur des Tamoxifens wurden GW5638 und sein Metabolit GW7604 entwickelt (Abb. 1.10). GW5638 schützt die Knochenstruktur und zeigt nur minimale uterotrope Aktivität [138]. Mit Molecular Modelling konnte gezeigt werden, dass GW5638 mit dem ER eine für SERM typische Konformation einnimmt [139]. Dennoch wird überlegt, ob es sich nicht um ein Antiestrogen handelt, da GW5638 und insbesondere sein Metabolit GW7604 den Estrogenrezeptorlevel reduzieren und nach *Wijyaratne* und *McDonnell* keine uterotrope Wirkung haben [140].



**Abb. 1.10:** Strukturformeln von zwei SERM mit Triphenylethylenstruktur

Arzoxifen besitzt eine ähnliche Struktur wie Raloxifen (Abb. 1.11). Es ist Raloxifen durch den Austausch der Keto-Gruppe in seinen antiestrogenen Eigenschaften jedoch überlegen. Die Einführung einer Methoxy-Gruppe verbessert zudem die Bioverfügbarkeit [141]. Arzoxifen befindet sich in der klinischen Testphase zur Behandlung des metastasierenden Brustkrebses.

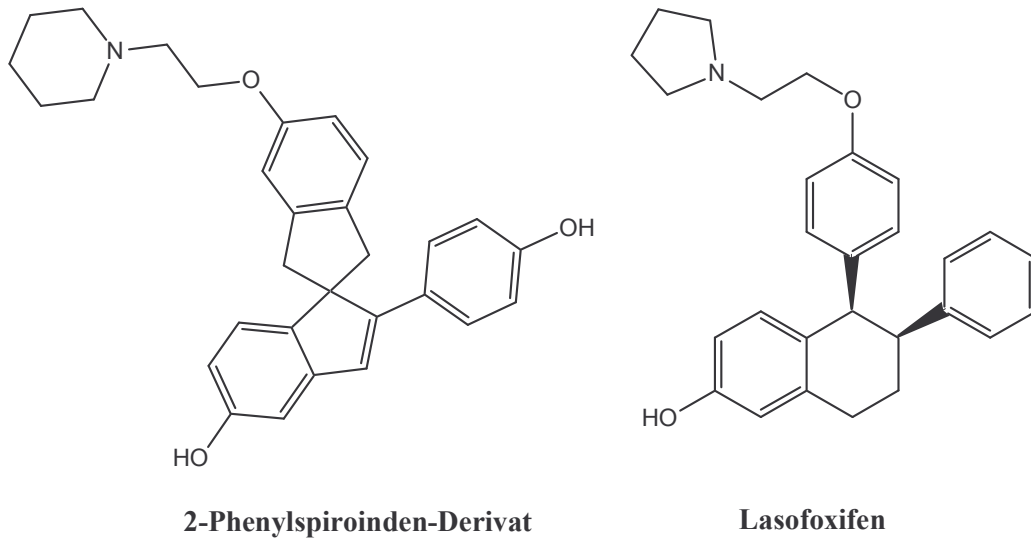


**Abb. 1.11:** Strukturformeln von zwei Raloxifen-ähnlichen SERM. (Die Strukturformeln auch der nachfolgenden SERM wurden teilweise rotiert, um ihre Strukturähnlichkeit mit Raloxifen zu verdeutlichen).

Pipendoxifen ist ein Indolderivat mit sehr guten antiestrogenen Eigenschaften, das nicht uterusstimulierend wirkt (Abb. 1.11) [142]. Es befindet sich in der klinischen Prüfung zur Behandlung des Mammakarzinoms.

Bazedoxifen entspricht strukturell dem Pipendoxifen, nur ist hier die Piperidinstruktur gegen Perhydroazepin ausgetauscht. Es wurde zur Prävention und Therapie der Osteoporose entwickelt [143]. Sein pharmakologisches Profil ist viel versprechend, denn es zeigt ebenfalls keine uterusstimulierenden Eigenschaften und wirkt als Antagonist in der Brust.

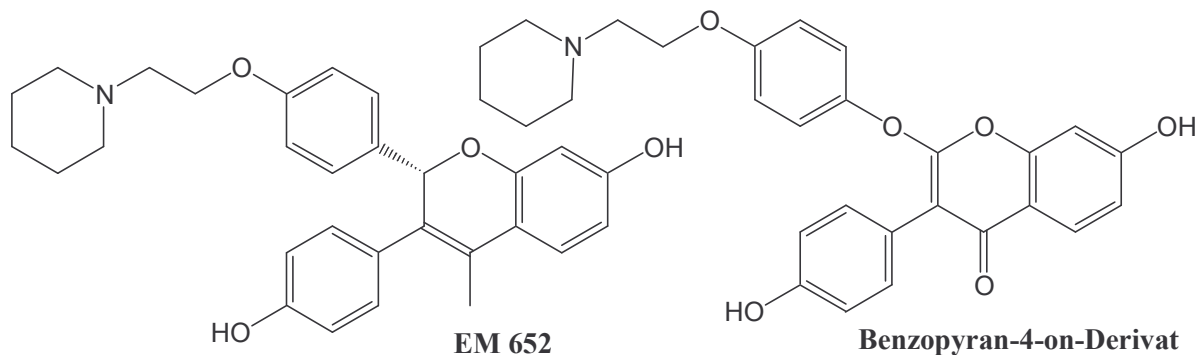
Das 2-Phenylspiroinden-Derivat wurde als eine isostere Verbindung zu Raloxifen entwickelt (Abb. 1.12) [144]. Es zeigt wie Raloxifen eine hohe Affinität zu den ER.



**Abb. 1.12:** Strukturformeln von zwei SERM mit unterschiedlichen Grundgerüsten

Eine Vielzahl der SERM besitzt ein Naphthalen- oder Benzopyrangerüst. So auch das Lasofoxifen, welches von Pfizer zur Prävention und Behandlung der Osteoporose entwickelt wurde (Abb. 1.12) [145].

EM652 wurde früher als reines Antiestrogen klassifiziert, jedoch wurde eine knochenprotektive und cholesterolsenkende Wirkung beschrieben (Abb. 1.13) [146]. Das S-Enantiomer EM652 ist der aktive Metabolit von EM800, bei dem die Hydroxy-Gruppen als Pivaloatester maskiert sind. Es besitzt eine höhere Affinität zu den ER als das R-Enantiomer.



**Abb. 1.13:** Strukturformeln von zwei SERM mit Benzopyranstruktur

Das Benzopyran-4-on-Derivat sollte als SERM entwickelt werden (Abb. 1.13) [147]; ausgegangen wurde bei der Entwicklung von den Isoflavonen Daidzein und Genistein (Abb. 1.14). Die neu entwickelte Substanz zeigt ebenso wie die strukturverwandte Thioetherverbindung hingegen nur geringe Bindungsaffinitäten zu den ER [147].

### 1.5.2 Wirkmechanismus der SERM

Der genaue Wirkmechanismus der SERM ist noch nicht verstanden, aber es gibt viele Erklärungsansätze für ihre einzigartige Pharmakologie.

Die Ausstattung der Zelle mit Estrogenrezeptoren, insbesondere das Verhältnis von ER- $\alpha$  zu ER- $\beta$  und die dadurch zahlenmäßig unterschiedliche Bildung von Homo- und Heterodimeren auf der DNA, kann die Antwort einer Zelle auf SERM beeinflussen [67]. Ebenso beeinflusst die unterschiedliche Affinität der SERM zu den Rezeptorsubtypen die Zellantwort.

Da unterschiedliche Liganden zu unterschiedlichen Konformationsänderungen der ER führen und dadurch die Rekrutierung jeweils anderer Coregulatoren ermöglichen [39], hängt die zellspezifische Antwort sicherlich auch von der gewebsspezifischen Zellausstattung mit Coaktivatoren und Corepressoren ab.

Ebenso beeinflussen alternative Signalwege der Zelle, die unabhängig vom klassischen Estrogen-Signalling ablaufen und z.B. durch Wachstumsfaktoren geregelt werden, die biologische Aktivität der SERM.

Inwieweit auch die bisher wenig untersuchten ERR Einfluss auf die SERM-Aktivität nehmen und ob gegebenenfalls auch beim Menschen ein physiologisch relevanter ER- $\gamma$  vorhanden ist, kann momentan nicht beurteilt werden.

Nach *MacGregor* ist die partiell agonistische Aktivität der SERM, bedingt durch ER- $\alpha$ , eher abhängig von der AF-1 als von der AF-2 [42, 148]. Da 4-Hydroxytamoxifen nur die AF-2 blockiert, nicht jedoch die AF-1, und Raloxifen hingegen AF-1 und AF-2 blockiert, könnte dies die höhere estrogene Aktivität des 4-Hydroxytamoxifens erklären [152].

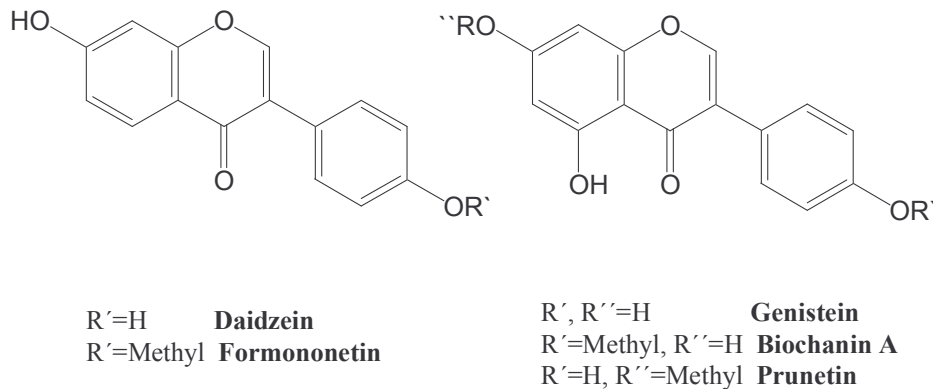
Der Antagonismus der SERM an ER- $\beta$  lässt sich laut *Barkhem* auf die nahezu funktionslose ligandenunabhängige AF-1 des ER- $\beta$  zurückführen [129].

## 1.6 Phytoestrogene

### 1.6.1 Vorkommen der Phytoestrogene

Phytoestrogene sind natürliche Pflanzeninhaltsstoffe, die estrogene Wirkung besitzen. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um die Substanzklassen der Lignane, der Isoflavone und der Coumestane. Es sind überwiegend diphenolische Verbindungen mit Strukturähnlichkeit zu natürlichen und künstlichen Estrogenen [153]. Daneben zeigen auch die Resorcylsäurelaktone verschiedener Mucotoxine, einige Chalone sowie Flavonoide und verschiedene Indole aus *Brassicaceae* estrogene Wirkung [154].

Isoflavone finden sich überwiegend bei den Schmetterlingsblütlern *Fabaceae*, vereinzelt auch bei den *Compositae*, *Iridaceae*, *Myricaceae* und *Rosaceae*. Die wichtigsten Isoflavone mit estrogener Wirkung sind Genistein, Biochanin A, Prunetin, Formononetin und Daidzein, die eine hohe Strukturähnlichkeit aufweisen (Abb. 1.14) [155].

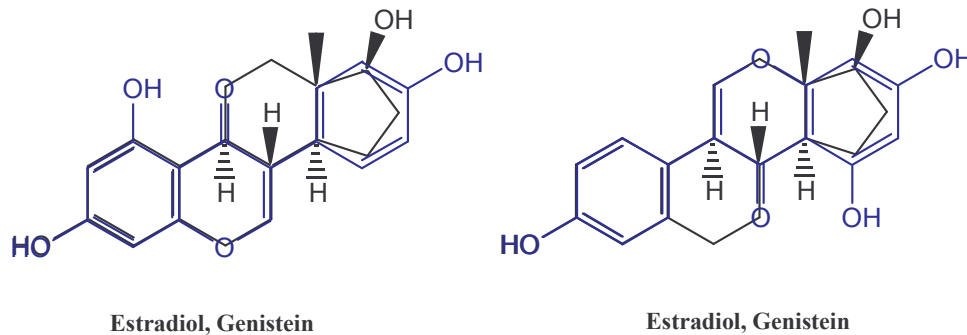


**Abb. 1.14:** Strukturformeln wichtiger Phytoestrogene



### 1.6.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen von Phytoestrogenen mit Isoflavonstruktur

Vergleicht man die Struktur des Genisteins mit der des Estradiols, so sind Gemeinsamkeiten der beiden Substanzen auffällig (Abb. 1.15).



**Abb. 1.15:** Überlagerte Darstellung von Estradiol (schwarz) mit Genistein (blau). Bei der rechten Figur wurde Genistein um  $180^\circ$  in der Ebene gedreht

In welcher Orientierung Genistein an die ER bindet, ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings konnte Genistein gemeinsam mit ER- $\beta$  isoliert werden und liegt in dem Kristall in einer Orientierung vor, die mit der in der Abbildung 1.15 rechts übereinstimmt [124]. Zumindest theoretisch kann Genistein jedoch in beiden Ausrichtungen an die ER binden [156].

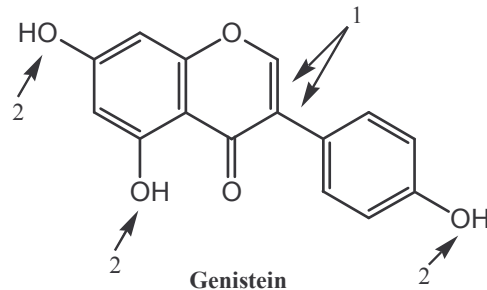
Wichtig für eine estrogene Wirkung der Phytoestrogene ist der Abstand der 4'- und 7-OH-Gruppen, der wie beim Estradiol ungefähr  $10.83 \text{ \AA}$  betragen sollte. Der Abstand beträgt bei Genistein und Daidzein  $12.00 \text{ \AA}$ .

Daneben sind auch hydrophobe Interaktionen mit der Ligandenbindungstasche notwendig. Im Falle des Estradiols wirkt die tetrazyklische Struktur des Steroidgrundgerüsts als hydrophobes Element.

Des Weiteren scheint eine phenolische Struktur für die Wirkung vorteilhaft zu sein. Elektronendonatoren am Phenolrest erhöhen die relative Bindungsaffinität eines Estrogens. Wichtig sind auch WBB-ausbildende Substituenten. Insbesondere die WBB durch die 3-OH-Gruppe des Estradiols bestimmt die Bindung an die ER.

Eine sterische Anordnung von Substituenten, die von der Anordnung der Substituenten beim Estradiol abweicht, führt im Allgemeinen zu einer Minderung der estrogenen Wirkung.

Studien zur estrogenen Aktivität unterschiedlicher Isoflavone erlauben Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Isoflavone, die in Abbildung 1.16 anhand des Genisteins aufgezeigt werden [157].



**Abb. 1.16:** Struktur-Wirkungsbeziehungen von Genistein

Isoflavone haben eine höhere estrogenere Wirkung als Flavone (1). Zudem erhöht die Doppelbindung zwischen C2 und C3 die Wirkung der Isoflavone im Vergleich zu den Isoflavanonen, denen diese DB fehlt (1) [156, 157].

Die Anzahl und die Lage der OH-Gruppen ist ebenfalls wichtig. Die Isoflavone weisen zwischen 2 und 4 OH-Gruppen auf. Hydroxy-Gruppen in Position 3 bzw. 8 vermindern die estrogenere Wirkung, wohingegen sie in Positionen 4' und 6 vorteilhaft sind (2). Eine 5-OH-Gruppe steigert die Wirkung nochmals.

Eine Methylierung der 4'- bzw. der 7-OH-Gruppe, wie sie bei den Isoflavonen Biochanin A und Prunetin vorliegt, erniedrigt die estrogenere Aktivität, wobei eine Methylierung der 7-OH-Gruppe sich stärker auswirkt als eine 4'-Methoxy-Gruppe [157].

*Kuiper* bestimmte die relative Bindungsaffinität (RBA) der Phytoestrogene an den ER und fand für Genistein eine 20fach höhere Affinität für ER- $\beta$  als für ER- $\alpha$ . Auch Daidzein zeigt eine höhere Präferenz für ER- $\beta$ , jedoch besitzt Genistein eine deutlich höhere RBA als Daidzein [158].

### 1.6.3 Genistein

Das Phytoestrogen Genistein ist ein Derivat des 3-Phenylchromons, das 4',5,7-Trihydroxyisoflavon. Es handelt sich um das Aglykon des Genistins, des Sophicorosids, des Sphaerobiosids und des Sarothamnosids, aus denen es durch saure Hydrolyse freigesetzt wird. Daneben liegt Genistein aber auch in freier Form in Pflanzen vor [215].

Es findet sich in hohen Konzentrationen in den Blättern des Erdklee *Trifolium subterraneum*, *Fabaceae*, und in der Sojabohne *Glycine max*, *Fabaceae* [155].

Als Phytoestrogen verfügt es über agonistische Wirkung an den ER, obwohl Genistein keine für Agonisten typische Konformation der Rezeptoren induziert [124, 158].

#### 1.6.3.1 Estrogenrezeptor-abhängige Wirkungen des Genisteins

Die tumorhemmende Wirkung des Genisteins konnte sowohl in hormonabhängigen als auch in hormonunabhängigen Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden [150, 151].

Genistein bewirkt in hormonabhängigen MCF-7-Zelllinien in Konzentrationen  $< 10 \mu\text{mol/L}$  eine Stimulation des Zellwachstums, bevor es bei höheren Konzentrationen das Wachstum hemmt [150, 159].

Es existieren unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die gemeinsame Gabe von Genistein und Estradiol zu verschiedenen Krebszelllinien. In MCF-7-Zellen stimuliert Genistein das Zellwachstum in Gegenwart von Estradiol [160]. Wenn Genistein in nanomolaren Konzentrationen zu ER-positiven T47D-Zellen gegeben wird, führt es selbst in Gegenwart hoher Estradiolkonzentrationen zu keiner Wachstumsstimulation. In geringfügig höheren Dosen verabreicht, inhibiert Genistein sogar das Zellwachstums [161].

*Miodini* konnte zeigen, dass Genistein in Konzentrationen  $< 5 \mu\text{mol/L}$  bei Abwesenheit von Estradiol das Wachstum von MCF-7-Zellen stimuliert, hingegen in der Konzentration von  $5 \mu\text{mol/L}$  durch Estradiol stimuliertes Wachstum hemmt [162]. Da die physiologischen Genisteinkonzentrationen im Serum sehr viel geringer sind als die untersuchten Konzentrationen der Zellversuche *in vitro*, erklärt man die antikanzerogenen Wirkungen des Genisteins *in vivo* durch eine stärkere Anreicherung im Gewebe als im Serum [163, 164].

Aufgrund verschiedener Studien an Nagetieren wird spekuliert, dass Genistein in Gegenwart hoher Estradiolkonzentrationen, wie sie in der Prämenopause vorliegen, antiproliferativ und

estrogenantagonistisch wirkt. In einem Milieu mit geringer Estradiolkonzentration, wie es während der Postmenopause vorhanden ist, soll es jedoch proliferativ wirken [165, 166].

*Shao* konnte nicht nur eine Hemmung des Zellwachstums der hormonabhängigen MCF-7-Zelllinie durch Genistein nachweisen, sondern auch eine Wachstumshemmung der ER-negativen MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie. Er schloss daraus, dass Genistein das Zellwachstum auch unabhängig von den ER hemmen kann [165].

Von besonderem Interesse ist auch die Frage, ob der Zeitpunkt der Genisteinaufnahme sich auf die möglicherweise tumorprotektiven Wirkungen des Isoflavons auswirkt. *Lamartiniere* konnte an Ratten zeigen, dass neonatale Injektionen von Genistein ebenso wie präpubertäre Genisteininjektionen die Inzidenz DMBA-induzierter Mammakarzinome erniedrigten [167, 168]. Sie führte diese Ergebnisse der frühen Genisteinexposition auf eine erhöhte Zelldifferenzierung der Brustdrüse zurück [166, 167].

Es gibt Hinweise darauf, dass Genistein bei erwachsenen Ratten nur protektiv wirkt, wenn diese schon als Jungtiere Genistein ausgesetzt wurden [166]. *Shu* konnte diese Ergebnisse bestätigen. Frauen, die in ihrer Pubertät Tofu konsumierten, wiesen sowohl prä- als auch postmenopausal ein verringertes Brustkrebsrisiko auf [169]. Die Aussagekraft verschiedener Studien aus westlichen Ländern, die eine tumorprotektive Wirkung durch Sojaaufnahme feststellten, ist noch unklar [170]. Die geringere Zahl der Brustkrebserkrankungen wird weniger der Aufnahme von Sojaprodukten als viel mehr einer vor Krebs schützenden gesunden Lebensweise zugerechnet [166].

### 1.6.3.2 Estrogenrezeptor-unabhängige Wirkungen des Genisteins

*Akiyama* postulierte im Jahr 1987 einen inhibitorischen Effekt des Genisteins auf die EGFR-Tyrosinkinase [171]. Er konnte *in vitro* eine kompetitive Verdrängung des ATP durch Genistein und damit eine Blockierung der EGFR-Autophosphorylierung nachweisen.

Die Hemmung des durch EGF stimulierten Wachstums unterschiedlicher Zelllinien führen *Peterson* und andere Arbeitsgruppen nun aber weniger auf direkte Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität zurück [172]. Vielmehr scheint eine Abnahme der Zahl der EGF-Rezeptoren für die Wachstumshemmung EGF-stimulierter Zellen verantwortlich zu sein [163, 167].

Genistein führt sowohl in hormonabhängigen als auch in –unabhängigen Krebszelllinien zu einer Blockade des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>M-Phase [173, 174]. Diese Blockade wird auch nach

Bestrahlung oder nach der Gabe zytotoxischer Substanzen beobachtet. *Fioravanti* beobachtete ebenfalls eine Blockade des Zellzyklus verschiedener Zelllinien in der G<sub>2</sub>M- und S-Phase und die anschließende Apoptose dieser Zellen [150].

Genistein führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu Angiogenese [165, 175]. Dies steht in Zusammenhang mit einer Hemmung der DNA-Topoisomerase II durch Genistein [175].

*Fotsis* berichtet, dass Genistein bei proliferierenden Zellen zytostatisch (Konzentration < 25 µM) bzw. in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt. Ruhende Zellen werden jedoch nicht angegriffen. Sie diskutieren als Mechanismus eine Hemmung der bFGF-Tyrosinkinase und der S6-Kinase, die durch bFGF, den Fibroblastenwachstumsfaktor, aktiviert wird. Sie ziehen auch eine Hemmung der Topoisomerasen I und II in Betracht [175].

Genistein werden auch antioxidative Effekte zugeordnet. *In vitro* verhindert es im Xanthin/Xanthinoxidase-System sowohl die Bildung von Superoxidradikalanionen als auch die Bildung von Wasserstoffperoxid. Es wirkt als Radikalfänger und schützt vor Oxidation durch Singulett-Sauerstoff [176]. Des Weiteren konnte *Li* beobachten, dass die Gabe von Genistein und Daidzein bei Mäusen, denen Melanomzellen intravenös verabreicht wurden, zu einer Reduzierung der Metastasen und zu einer Abnahme der Tumorgöße im Vergleich mit einer Kontrollgruppe führte [177].