

Einleitung und Problemstellung

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Vorkommen

In den westlichen Industrienationen stehen maligne Tumoren nach Herz-Kreislauf-erkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik ^[1]. In Deutschland werden schätzungsweise 350 000 Krebsneuerkrankungen pro Jahr festgestellt. Allein im Jahr 1999 starben 210 800 Menschen an den Folgen einer Tumorerkrankung ^[2].



Abbildung 1.1 Verteilung der Krebsneuerkrankungen auf die einzelnen Organe (Deutschland 1998); Robert Koch Institut Berlin ^[2]

Mit 46 295 von insgesamt 178 755 Fällen (ca. 25%) im Jahr 1998 stellte Brustkrebs die häufigste aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen dar (siehe Abbildung 1.1), wobei zunehmend auch jüngere Frauen betroffen waren.

Auch in der Statistik über krebsbedingte, organbezogene Todesursachen steht Brustkrebs bei Frauen mit 17 585 Gestorbenen im Jahr 1999 an erster Stelle. Insgesamt wird ein leichter Anstieg der Brustkrebsinzidenz beobachtet. So stieg die Rate der an Brustkrebs Erkrankten in den Jahren von 1990 bis 2000 um jährlich ca. 2% ^[3, 4, 5]. Bei Männern spielt Brustkrebs eine untergeordnete Rolle.

1.1.2 Ursachen

Die Entstehung von Krebs ist ein multifaktorielles Geschehen und lässt sich auf eine Vielzahl von Risikofaktoren zurückführen. Diese lassen sich in

- physikalische (radioaktive und Röntgenstrahlung, UV-Strahlung)
- chemische (Asbest, Schwermetalle, Nitrosamine, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Alkylantien)
- biologische (Virusinfektionen: Papillomaviren, Hepatitis-B-Viren)

Faktoren unterteilen^[6]. Aus diesen Risikofaktoren lassen sich Verhaltensweisen ableiten, die eine Entstehung von Krebs begünstigen können, wie z. B. Rauchen (Lungenkrebs), intensive Sonnenexposition (Hautkrebs), regelmäßiger Alkoholkonsum (Rektumkarzinom)^[7] sowie eine fett- und kalorienreiche Ernährung (Brust- und Dickdarmkrebs).

Als spezielle Risikofaktoren für Brustkrebs sind eine frühe Menarche, eine späte Menopause, eine späte Erstgeburt, eine familiäre / genetische Prädisposition und die im vorhergehenden genannte ungesunde Ernährung anzusehen^[8, 9].

1.1.3 Klassifizierung

Ein wichtiges Kriterium zur Auswahl der geeigneten Behandlungsmethode und Prognose ist die Bestimmung der Ausbreitung des Tumors, auch Grading, Staging oder Krebsklassifikation genannt. Die Einteilung erfolgt nach bestimmten Normen, für die vor allem drei Gesichtspunkte maßgeblich sind:

- T (Tumor)
- N (Lymphknoten)
- M (Metastasen)

Man verwendet deswegen den Begriff TNM - Klassifikation, wobei $T_0 - T_4$ eine Aussage über die Größe des Primärtumors trifft (T_0 = Tumor in situ, T_1 = Primärtumor < 2 cm, T_2 = 2 - 5 cm, T_3 > 5cm, T_4 = Tumor jeder Größe mit Ausdehnung in die Nachbarschaft), $N_x - N_2$ den Befall der Lymphknoten umschreibt und $M_x - M_1$ eine Aussage über eventuelle Metastasen trifft^[10].

Durchschnittlich 13% der Brustkrebspatientinnen haben bei Diagnose einen Tumor im Stadium T_0 , 41% im Stadium T_1 , bei 29% befindet sich der Tumor bereits im T_2

Stadium, 5% werden mit T3 diagnostiziert und 4% mit T4, bei 8% läßt sich der Tumor nicht eindeutig in das TNM Schema einordnen ^[3].

Die Überlebensrate von Brustkrebspatientinnen nimmt seit den siebziger Jahren beständig zu. Für Deutschland wird die 5-Jahresüberlebensrate insgesamt mit 73% für die USA sogar mit 86% angegeben. ^[2, 11] Wird der Tumor im Stadium T0 entdeckt und operativ entfernt, besteht eine 98%ige Chance, den Tumor länger als 5 Jahre zu überleben. Mit fortschreitender Tumorentwicklung sinkt diese jedoch von T1: 95% > T2: 70 - 85% > T3: 40 - 50% bis zu unter 20% bei T4. ^[12] Durch Mammographiescreening läßt sich, wie Studien gezeigt haben, die Brustkrebssterblichkeit bei Frauen zwischen 50 und 69 Jahren um bis zu 30% senken.

Neben der Einteilung von Brusttumoren nach dem TNM - Schema findet man häufig auch die Unterscheidung von nicht infiltrierenden epithelialen Tumoren und infiltrierenden epithelialen Tumoren. Zur erstgenannten Gruppe werden die Tumoren im Frühstadium, auch carcinoma in situ genannt, gezählt. Ihr Wachstum beginnt in den Oberflächenzellen (Epithelien) der Milchgänge oder in den Drüsenläppchen. Die zweite, weitaus größere Klasse der infiltrierenden epithelialen Tumoren lässt sich dadurch charakterisieren, dass die Tumorzellen bereits die Wand der Drüsenläppchen oder der Milchgänge durchbrochen haben und je nach Zelltyp mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in das umliegende Fettgewebe der Brust hineinwachsen.

Ferner lassen sich durch die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus des Tumors Voraussagen über das Ansprechen einer Patientin auf endokrine Therapie treffen ^[13]. Etwa 72% der prämenopausalen und 83% der postmenopausalen Frauen verfügen über einen positiven Estrogenrezeptorstatus ^[14], von diesen sprechen 55 - 60% auf eine endokrine Therapie an ^[15, 16]. Dabei wird ein Hormonrezeptorgehalt von 10 fmol / mg Protein im Zytosol des Tumorgewebes als Grenze zwischen rezeptorpositiven und rezeptornegativen Tumoren angesehen ^[17].

1.1.4 Therapie

Im wesentlichen stehen für die Therapie des Mammakarzinoms die im Folgenden aufgeführten Möglichkeiten zur Verfügung ^[18, 19, 20, 21]. Die Behandlung des Brustkrebs richtet sich dabei nach Ausbreitung und Art des Tumors sowie seinem Hormonrezeptorgehalt (siehe 1.1.3):

- Chirurgischer Eingriff: Zur operativen Entfernung eines carcinoma in situ (s.o.)
- Strahlentherapie: Abtötung von strahlensensiblen, lokal umschriebenen Tumoren oder Tumorresten (fast nur noch adjuvant, d. h. nach einer Operation)
- Chemotherapie: Behandlung primärer oder metastasierender Tumoren durch zytotoxisch aktive Wirkstoffe (z. B. Alkylantien, Antimetaboliten, Mitosehemmstoffe, interkalierende Antibiotika). Adjuvanter Einsatz oder nach Bestrahlung zur Zerstörung etwaiger Mikrometastasen und verbliebener Tumorzellen, neoadjuvanter Einsatz, d. h. vor einer Operation als Hochdosischemotherapie zur Erhöhung der Chance auf Brusterhaltung
- Endokrine Therapie: Eingriff in den Hormonhaushalt zur Veränderung des für die Proliferation des Tumors notwendigen Hormonspiegels (Antiestrogene, GnRH-Super-Agonisten, Aromatasehemmstoffe, Gestagene)
- Immuntherapie: Eine teilweise noch in der Entwicklung befindliche Behandlungsmethode (z. B. monoklonale Antikörper, Vaccine, Gentherapie).

1.1.5 Hormontherapeutika

Bei einem positiven Hormonrezeptorstatus stellt der Einsatz von endokrin wirksamen Substanzen eine geeignete Behandlungsmöglichkeit für das Mammakarzinom dar (siehe Abschnitt 1.1.4). Dabei wird heute weltweit für die Hormonbehandlung am häufigsten das partielle Antiestrogen Tamoxifen (TAM) (siehe Abbildung 1.2) eingesetzt. TAM (ICI 46 747, Novaldex[®]) hat seine Wirksamkeit bei geringen Nebenwirkungen in mehreren Studien unter Beweis gestellt ^[22, 23].

Durch adjuvante Tamoxifentherapie wird das Auftreten von kontrateralem Brustkrebs nach chirurgischen Eingriffen verringert ^[24], da TAM in der Brust als Antiestrogen wirkt. Auf Knochen, Fettstoffwechsel und das Endometrium ^[25] übt TAM dahingegen eine estrogenartige Wirkung aus. Diese gewebsspezifische Wirkung führte zu der Bezeichnung selektiver Estrogenrezeptor Modulator (SERM).

Die Einführung in die Brustkrebsprophylaxe bei postmenopausalen Frauen ist umstritten, da neben der positiven Wirkung auf den Brustkrebs auch die oben genannte estrogenartige Wirkung auf das Endometrium festgestellt wurde. Diese estrogenartige Wirkung ist dafür verantwortlich, dass das Risiko, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken, bei TAM-behandelten Frauen um den Faktor 3 höher ist als bei nicht behandelten Frauen. ^[24]

Raloxifen (RAL), ein SERM, der in der Osteoporoseprophylaxe eingesetzt wird, hat neben ähnlich positiven Effekten auf Brustkrebs und Fettstoffwechsel wie TAM einen geringeren Einfluss auf das Endometrium.

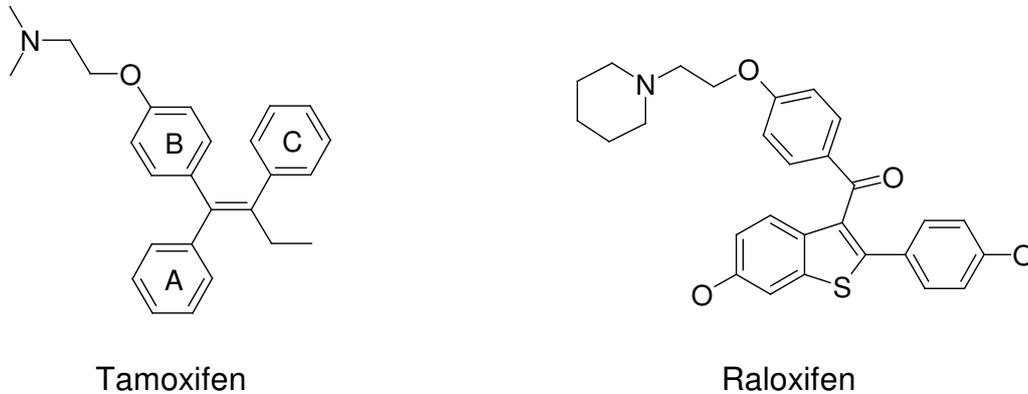


Abbildung 1.2 Hormontherapeutika; links: TAM; rechts: RAL

Momentan werden Tamoxifen und Raloxifen in der STAR Studie (Study of Tamoxifen and Raloxifene) an Patientinnen mit einem hohem Brustkrebsrisiko untersucht ^[26]. Dabei steht die Eignung als Langzeittherapeutika zur Prophylaxe von invasivem Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen im Vordergrund. Ferner soll das Auftreten von Nebenwirkungen in einer solchen Langzeittherapie unter besonderer Berücksichtigung des Endometriumkarzinoms beobachtet werden. Die Ergebnisse der Studie werden im Jahr 2006 erwartet.

1.2 Der Estrogenrezeptor - Struktur und Aktivierung

1.2.1 Historisches

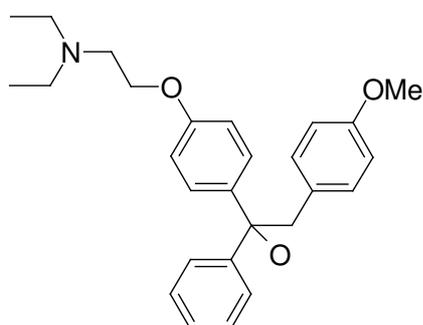
Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Estrogenen und Brustkrebs gab es bereits im späten 19. Jahrhundert, als Beatson ^[27] berichtete, dass durch Ovariectomie bei prämenopausalen Frauen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom in einigen Fällen eine Tumorregression erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtungen von Boyd ^[28] unterstützt, der nach Ovariectomie bei prämenopausalen Frauen ähnliche Ergebnisse erzielte.

Als der Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Estrogenproduktion erkannt war ^[29, 30], wurden die operativen Methoden auf die Entfernung weiterer, in den Hormonhaushalt eingreifender Gewebe wie Nebenniere ^[30, 31] und Hypophyse ^[32]

ausgeweitet. Durch Ovariectomie kommt es zu einer Remission des Tumorstadiums. Nach der Entfernung der Eierstöcke kann die Nebennierenrinde die Estrogenproduktion übernehmen, wodurch die Wirkung der Ovariectomie mit der Zeit nachlässt. Um die tumorstimulierende Wirkung zu minimieren, kann eine Adrenalectomie durchgeführt werden. Der letzte Schritt zur operativen Ausschaltung aller theoretisch tumorstimulierenden Hormone stellt die Hypophysektomie dar, mit der ebenfalls gute Remissionsraten erzielt wurden.

Der exakte Mechanismus, der zum Tumorstadium führte, konnte allerdings lange Zeit nicht aufgeklärt werden. Erst im Jahr 1962 wurde der ER von Jensen und Jakobsen^[15] entdeckt und seine Beteiligung an estrogenstimulierten biologischen Prozessen vermutet^[33]. Die Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung des ER durch Toft^[16] führten zu Methoden zur Bestimmung des Hormonrezeptorgehaltes in Zellen^[34], womit man ein Instrument zur Prognostik bei Mammakarzinomen an der Hand hatte.

Des Weiteren lieferte die Entdeckung des ER ein neues *target* (Ziel) für die Brustkrebstherapie^[35]. Nicht nur die operative Entfernung von estrogenproduzierenden Geweben, sondern auch der Einsatz antiestrogen wirksamer Verbindungen sollte zu einer Verminderung des Tumorstadiums führen. Das erste nichtsteroidale Antiestrogen, MER-25 (siehe Abbildung 1.3), fand Lerner 1958^[36] auf der Suche nach postkoitalen Kontrazeptiva. Bei der pharmakologischen Testung wies es in allen untersuchten Tierarten ein antiestrogenes Wirkpotential ohne agonistische Eigenschaften auf. Aufgrund nicht tolerierbarer Toxizität auf das menschliche ZNS wurde die Substanz jedoch nicht weiterentwickelt^[37]. Ein weiteres Produkt dieser Suche war Tamoxifen (siehe Abschnitt 1.1.5)^[38, 39], das 1977 als erstes Antiestrogen zur Behandlung des hormonsensitiven Mammakarzinoms zugelassen wurde^[40, 41].



MER-25

Abbildung 1.3 Struktur des Antiestrogens MER-25

Der ER, der heute als ER α bezeichnet wird, wurde von Green et al. 1986 ^[42] aus menschlichen MCF-7-Brustkrebszellen geklont und seine Primärstruktur bestimmt. Die Identifizierung eines zweiten Estrogenrezeptors (ER β) gelang Kuiper 1996 ^[43]. Durch die Identifizierung der codierenden DNA-Abschnitte auf Chromosom 6 für ER α und auf Chromosom 14 für ER β konnte gezeigt werden ^[44], dass diese beiden Rezeptoren keine Splicevarianten, sondern unterschiedliche Genprodukte sind. Auf die Verteilung im menschlichen Körper wird in Abschnitt 1.2.5. näher eingegangen. Der Bindungsmodus von Wirkstoffen an den ER α konnte 1997 von Brzozowski ^[45] aufgeklärt werden, ihm gelang es, die Röntgenkristallstruktur der mit Estradiol kokristallisierten Ligandenbindungsdomäne (LBD) des ER α aufzuklären (vgl. Abschnitt 1.3).

1.2.2 Der Aufbau der Estrogenrezeptoren

Die humanen Estrogenrezeptoren (ER) ^[a] ER α und ER β sind kernständige Rezeptoren ^[46] und gehören als Steroidhormonrezeptoren (SHR) zur Klasse der liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktoren ^[47, 48]. ER α besteht aus 595 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 66 kDa ^[42, 49]. ER β , ein Protein mit einem Molekulargewicht von 59 kDa, ist aus 530 Aminosäuren aufgebaut. Im allgemeinen bestehen SHR aus sechs funktionellen Domänen, die mit A - F bezeichnet werden, wobei die Domänen A und B zusammengefasst werden ^[50, 51]. Der schematische Aufbau der ER ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

^a Die Abkürzung ER bezieht sich im Folgenden auf beide Rezeptorsubtypen.

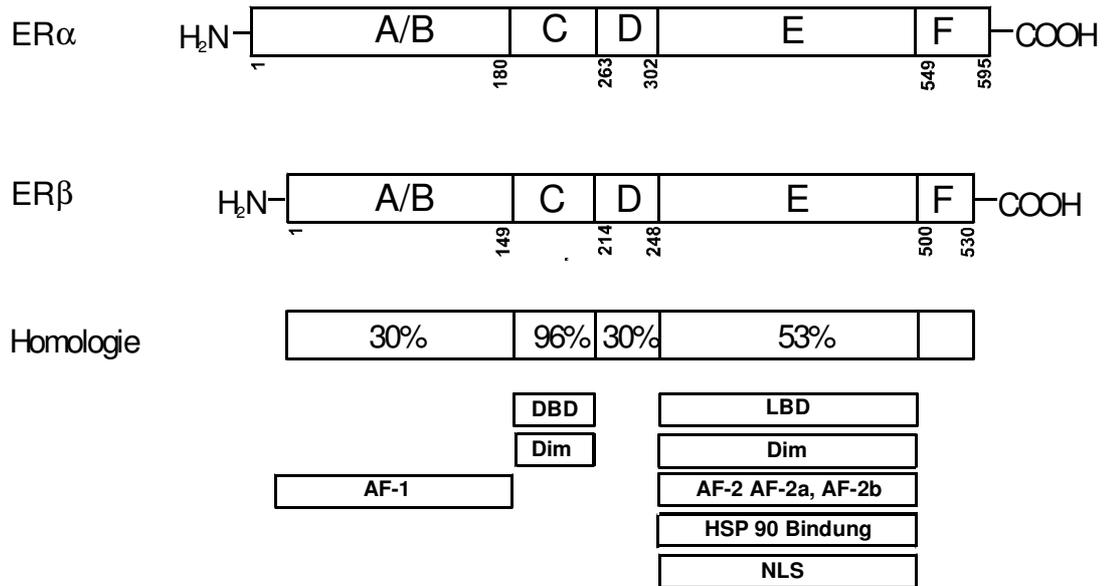


Abbildung 1.4 Funktionelle Domänen der ER mit Angabe der Aminosäurenummern nach Green ^[52], Gronemeyer ^[53] und Tsai ^[54]; NLS: nuclear localization signal; HSP90: heat shock protein 90; AF: Aktivierungsfunktion; DBD: DNA binding domain; LBD: Ligand binding domain; Dim: Dimerisierung; Homologien nach Dutertre ^[55]

Die N - terminale Region A / B weist nur wenig Homologie innerhalb der Gruppe der SHR auf. Sie besitzt einen sehr variablen Aufbau und ist dadurch für die Schwankungen in der Größe der einzelnen SHR verantwortlich. Hier sitzt AF-1, eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion. Sie aktiviert die Transkription, indem sie mit dem Präinitiationskomplex der Transkription oder Koaktivatoren in Wechselwirkung tritt ^[56, 57]. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine ligandenunabhängige Aktivierung des ER via AF-1 eng mit dem Phosphorylierungsstatus des Rezeptors zusammenhängt ^[58, 59, 60]. Außerdem wird AF-1 für die partiell agonistische Wirkung von SERM wie z. B. TAM verantwortlich gemacht ^[61, 62].

Die zentrale Domäne C ist die am höchsten konservierte Region der SHR ^[63, 64], auch zwischen ERα und ERβ besteht eine Homologie von 96%. Sie beinhaltet 8 Cysteinmoleküle, die durch Koordination an Zink zwei Zinkfinger ausbilden (Abbildung 1.5). Diese sind für die Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb der Promoter der estrogenabhängigen Zielgene, sogenannter Estrogen - Response - Elements (ERE), und für die Rezeptordimerisierung verantwortlich ^[65, 66, 67].

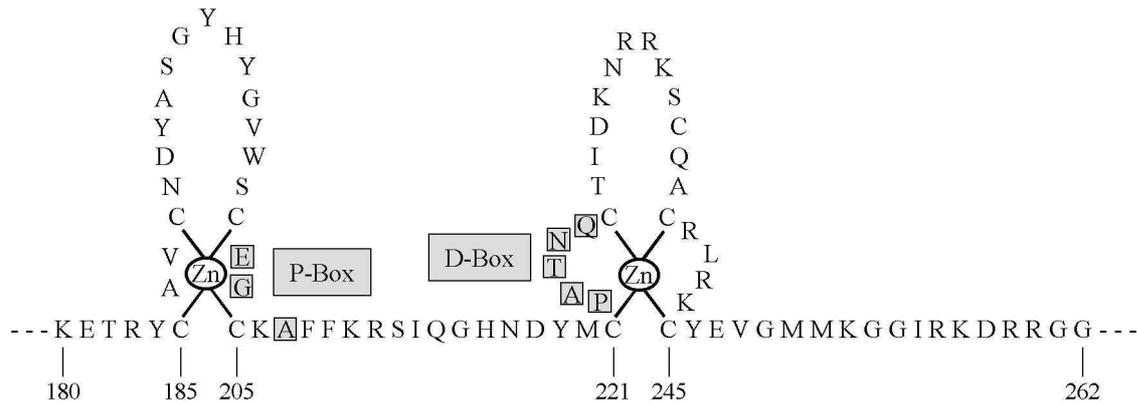


Abbildung 1.5 Zinkfinger motive des humanen ER α nach Green und Chambon ^[68], Fuller ^[69] und Tsai ^[54]; Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgt im Ein-Buchstaben-Code.

Die gekennzeichneten Aminosäuren der P-Box (E, G, A) vermitteln die spezifische Erkennung der ERE-Sequenz ^[54, 70]. Mutationsstudien an diesen drei Aminosäuren führten bei Austausch durch Glucocorticoidrezeptor-spezifische Aminosäuren (G, S, V) zur Erkennung des GRE (Glucocorticoid - Response - Element) durch den veränderten ER ^[71, 72]. Durch die D-Box wird eine unspezifische DNA-Erkennung sowie die Rezeptordimerisierung gewährleistet ^[54, 73].

An die DNA-Bindungsdomäne (DBD) schließt sich eine sogenannte hinge-Domäne D (hinge = Gelenk, Scharnier) an, die noch sehr wenig charakterisiert ist. Durch ihre Variabilität wird die der Hormonbindung folgende Rezeptortransformation ermöglicht. Sie stellt eventuell auch einen Angriffspunkt für Koaktivatoren dar ^[74].

Die Domäne E, die Hormon- bzw. Ligandenbindungsdomäne (LBD), ist relativ groß und verfügt über eine funktionelle Komplexität. Neben der ligandenabhängigen AF-2 des ER beinhaltet sie eine ligandenunabhängige AF-2a ^[75] und eine AF-2b ^[76], ein nuclear localization signal (NLS), eine Dimerisierungsregion und eine heat shock protein 90 (HSP90) bindende Region ^[77, 78].

AF-1 und AF-2 können die Transkription zwar unabhängig voneinander aktivieren, jedoch wird in den meisten Fällen ein synergistisches Zusammenwirken der beiden AF beobachtet ^[62, 79]. Durch dieses synergistische Zusammenwirken aktiviert der ER nach Bindung an ERE die Genexpression. ^[80]

Die Homologie zwischen der LBD des ER α und des ER β liegt nur bei 53% ^[55]. Obwohl dies in etwa der Homologie zwischen den LBD des Glucocorticoid- und Progesteronrezeptors, also zwei Rezeptoren mit unterschiedlichen Liganden entspricht,

binden beide denselben physiologischen Liganden, Estradiol (E2). Durch diese geringe Übereinstimmung in den LBD ist es möglich, für beide Rezeptoren selektive Liganden zu entwickeln (vgl. Abschnitt 1.2.5).

Als letztes folgt die Domäne F, für die bis heute noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden konnte ^[54]. Jedoch scheint sie die Transaktivierungsstärke von AF-1 und AF-2 zu beeinflussen ^[81].

1.2.3 Rezeptortransformation und Genaktivierung

Durchdringt ein Ligand die Zellmembran und gelangt ins Zytoplasma, kann er von dort entweder durch passive Diffusion durch einen Kanal bzw. eine Kernpore oder durch einen aktiven Transport, der durch das NLS im ER ^[82] vermittelt wird, in den Zellkern gelangen. In Abwesenheit eines Liganden liegt der ER im Zellkern ^[46] in seiner physiologisch inaktiven Form vor. Dabei ist er an HSP90 assoziiert ^[83, 84, 85], das den Rezeptor bis zur Hormonbindung stabilisiert, allerdings kann der ER auch an die Korepressoren SMRT oder NCoR gebunden vorliegen. Bindet ein Ligand an den inaktiven ER ^[46] dissoziiert der Komplex aus ER und HSP90. Bagchi ^[86] konnte nachweisen, dass die Abspaltung des HSP90 nicht für die Bildung eines funktionell aktiven ER ausreicht. Durch die Ligandenbindung wird ferner eine Phosphorylierung und ein Konformationswechsel des Rezeptors ausgelöst. Nach Bindung von Estrogenen bzw. Antiestrogenen nimmt der basale Phosphorylierungsgrad des ER auf das 3- bis 4-fache zu ^[87]. Hierdurch steigen die Affinität zu bestimmten DNA - Sequenzen und die Transaktivierungsstärke an ^[88]. Der ligandenabhängige Konformationswechsel des ER ermöglicht auch die Dimerisierung des Rezeptors ^[89, 90, 91, 92], wobei Homodimere oder Heterodimere aus ER α und ER β gebildet werden. Die Rezeptor - Dimere binden anschließend an ihre korrespondierenden DNA-Sequenzen (ERE) und modulieren unter Einwirkung von Koaktivatoren (vgl. 1.2.4) eine spezifische Genexpression ^[54, 93, 94]. Die folgende Abbildung 1.6 zeigt ein Modell der Transkriptionsaktivierung durch den ER.

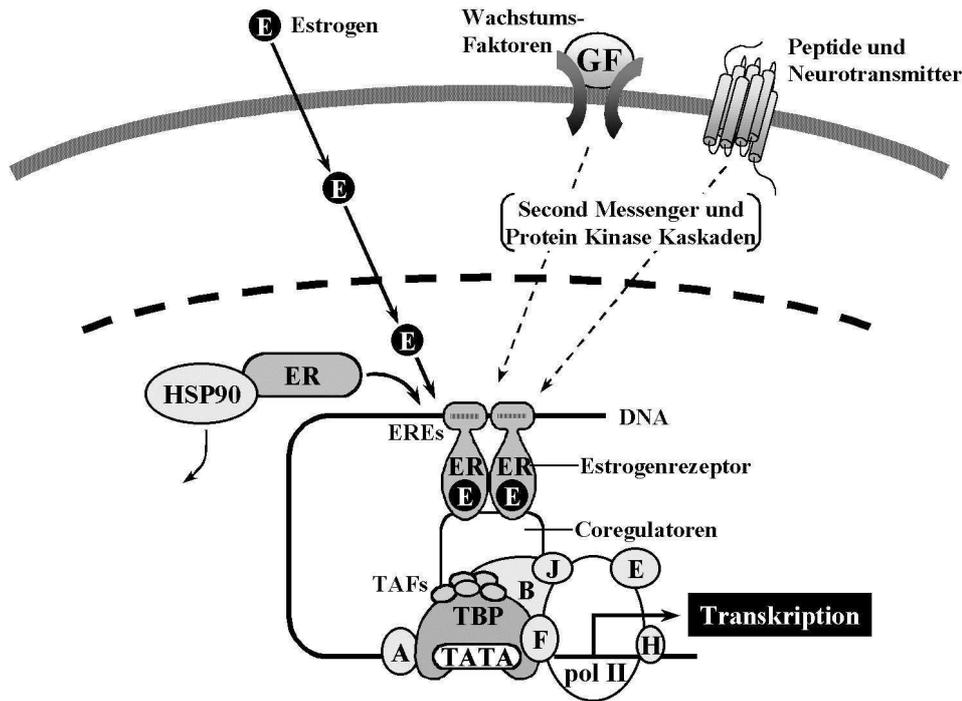


Abbildung 1.6 Modell der Transkriptionsaktivierung durch den ER nach Katzenellenbogen^[95] und Tsai^[54]; TATA: Basensequenz TATAAA innerhalb des Promoters; ERE: Estrogen Response Element; HSP90: heat shock protein 90; TBP: TATA-bindendes Protein; TAF: TBP-assoziierte Faktoren; pol II: RNA-Polymerase II; A/B/E/F/H/J: Transkriptionsfaktoren (TFII) der RNA-Polymerase II

Die Bindung des ER - Dimers an das ERE führt zu einem Zusammenwirken von mehreren Proteinen, den sogenannten Transkriptionsfaktoren, und deren Bindung an eine weitere DNA-Sequenz, die sogenannte TATA-Box^[54]. Diese ist etwa 25 - 30 Basenpaare oberhalb des Startpunktes der Transkription lokalisiert.

Zuerst bindet der Transkriptionsfaktor TFIID, der sich aus dem TATA-bindenden Protein (TBP) und TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammensetzt, an die TATA-Sequenz innerhalb des Promoters^[96]. Durch weitere Koordination mit TFIIB, TFIIF und RNA-Polymerase II^[97] bildet sich der minimale Präinitiationskomplex der Transkription. TFIIB geht hierbei Wechselwirkungen mit DNA-Sequenzen ober- und unterhalb der TATA-Box, mit TBP, TFIIF, RNA-Polymerase II^[98, 99, 100] und der AF-2 des ER ein^[101, 102]. Aus diesem Initiationskomplex heraus beginnt die RNA-Polymerase II mit der Bildung von m-RNA, die wiederum die Proteinexpression in den Ribosomen bewirkt.

1.2.4 Koregulatoren und Wachstumsfaktoren

Koaktivatoren sind Proteine, die direkt mit nukleären Rezeptoren interagieren und dadurch die Transkription steigern^[102]. Für ER α sind in den letzten Jahren wenigstens 19 unterschiedliche Koaktivator-Proteine identifiziert worden^[103].

Koaktivatoren dienen als Brücke zwischen agonistgebundenem Rezeptor und den Transkriptionsfaktoren des Präinitiationskomplexes^[102, 104]. Des Weiteren verfügen viele Koaktivatoren über eine intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität^[105]. HAT acetyliert Lysinreste am N-Terminus der Histone 3 und 4 im Chromatin, was zu einer schwächeren Assoziation der Histone mit der DNA führt; die Bildung eines stabilen Präinitiationskomplexes wird gesteigert und die Transkriptionsaktivierung durch RNA Polymerase II erleichtert^[106, 107, 108, 109, 110]. Allen Koaktivatoren ist gemeinsam, dass die Wechselwirkung zwischen ihnen und dem Agonist - ER - Komplex durch Wechselwirkungen von AF-2 der LBD des ER und der NR-Box^[111] des Koaktivators, die aus dem leucinreichen LXXLL-Motiv besteht, in dem L für Leucin steht und X für jede Aminosäure, vermittelt wird. Die Kontaktfläche an der LBD des ER ist eine komplementäre Tasche, die durch die Helices 3, 4, 5 und 12 des ER gebildet wird^[45, 112, 113, 114, 115]. Diese ist für ER α und ER β nicht identisch^[116]. Des Weiteren reagieren Koaktivatoren nur mit der an E2 oder Agonisten gebundenen LBD des ER, nicht aber mit dem freien Rezeptor oder mit einem antagonistgebundenen ER.

Korepressoren sind in der Lage, die agonistische Wirkung von Antiöstrogenen wie z. B. Tamoxifen zu unterdrücken, wie durch Transfektionsexperimente gezeigt werden konnte. Der Mechanismus der Wechselwirkung der Korepressoren, wie z. B. SMRT (silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors) und NCoR (Nuclear receptor CoRepressor) mit den Transkriptionsfaktoren ist noch nicht geklärt.^[74, 117] Auch die Korepressoren binden über das LXXLL - Bindungsmotiv an die Koaktivatorbindungsstelle des ER. Sie dienen in der Abwesenheit von Liganden dazu, einige nukleäre Rezeptoren in inaktivem Zustand zu halten. Korepressoren interagieren vor allem mit ungebundenen Rezeptoren, die Assoziation wird verstärkt durch die Entfernung von Helix 12 oder durch Zugabe von Rezeptorantagonisten.^[118] Der agonistgebundene Rezeptor interagiert nicht mit klassischen Korepressoren, im Gegensatz zum antagonistgebundenen Rezeptor.

Durch eine Phosphorylierung des ER, die über verschiedene Signalwege reguliert werden kann, kann dessen Transkriptionsaktivität moduliert werden. Wachstumsfaktoren wie z. B. EGF (epidermal growth factor) ^[119], IGF-1 (insulin-like growth factor 1) ^[59], TGF- α (transforming growth factor α) ^[120, 121], Dopamin ^[122, 123] und cAMP ^[59, 124] können den ER dabei auch in Abwesenheit eines Agonisten aktivieren. TGF- β stellt dagegen einen wachstumshemmenden Faktor dar ^[125]. Die Wirkung dieser Wachstumsfaktoren wird über ihre Rezeptoren vermittelt, der genaue Mechanismus der Regulierung der ER-Aktivität ist aber noch unbekannt ^[54, 81, 125].

1.2.5 ER α und ER β

ER α wird vor allem im Uterus und in der Brustdrüse exprimiert, allerdings auch in der Leber; ER β findet man vor allem in den Eierstöcken, den Hoden und der Prostata sowie im Gastrointestinaltrakt. Im ZNS, im Kardiovaskularsystem, im Knochen, im Urogenitaltrakt und auch in der Brust kommen beide ER nebeneinander vor. ^[126]

Der physiologische Ligand Estradiol (E2) hat ungefähr die gleiche Bindungsaffinität zu beiden Rezeptorsubtypen ^[43, 127]. Auch für viele synthetische und natürlich vorkommende estrogen wirksame Substanzen konnte so gut wie keine Rezeptorselektivität festgestellt werden ^[128].

Sun beschrieb 1999 ^[129] die ersten synthetischen nicht-steroidalen Substanzen, die eine ER - subtypenselektive Differenzierung sowohl in der Bindungsaffinität als auch in der Transkriptionsaktivierung zeigen.

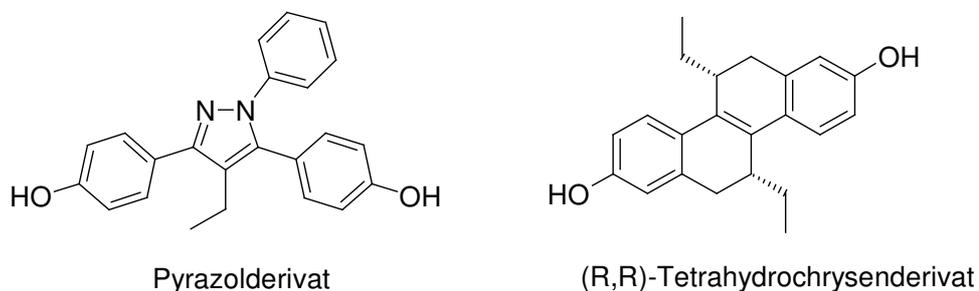


Abbildung 1.7 Strukturen der ER - subtypeselektiven Substanzen

Das Pyrazolderivat (siehe Abbildung 1.7) besitzt eine höhere Bindungsaffinität zum ER α und bewirkt an diesem eine 120-fach höhere Transkriptionsaktivität als am ER β .

Das (*R,R*)-Tetrahydrochrysenderivat hat eine 4-fach höhere Bindungsaffinität zum ER β , wobei es am ER β ein voller Antagonist und am ER α ein reiner Agonist ist^[129].

Mäkela konnte 1999 für die natürlich vorkommenden Phytoestrogene Coumestrol, Apigenin, Kaempferol und Genistein (Abbildung 1.8) eine bis zu 20-fach höhere Affinität zum ER β als zum ER α ^[130] zeigen.

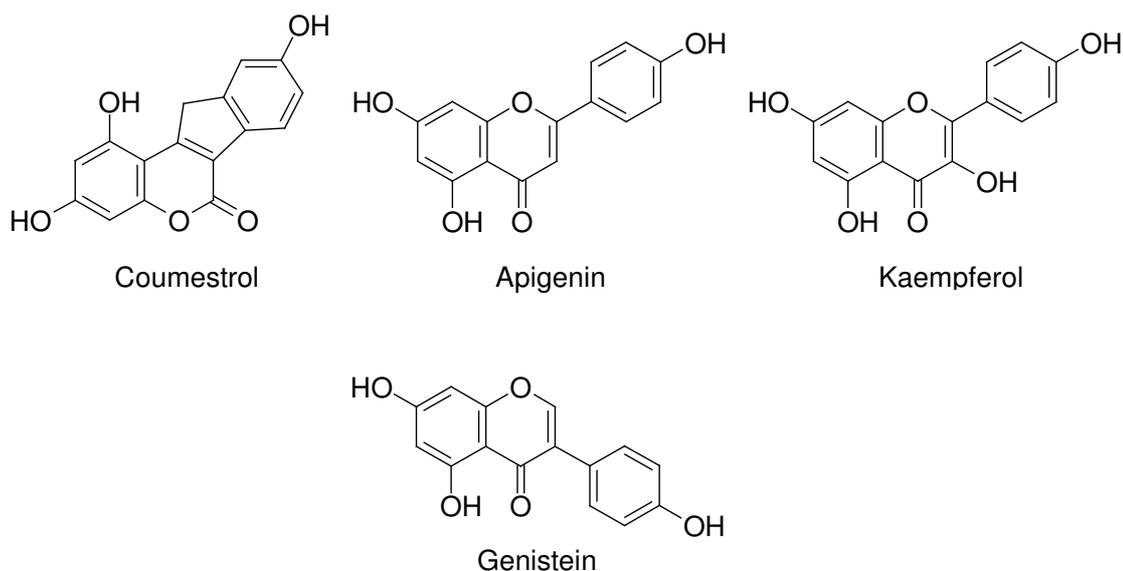


Abbildung 1.8 Strukturen einiger Phytoestrogene mit hoher Bindungsaffinität zum ER β

Die für diese Substanzen beobachtete protektive Wirkung sowohl im Bezug auf Prostata-^[131] und Kolonkrebs^[132] als auch auf die Gefäße^[133] läßt sich auf die Aktivität an ER β zurückführen, da dieser der vorherrschende ER in den entsprechenden Geweben ist^[128, 130, 134]. Der Vorteil gegenüber nicht selektiven Substanzen ist, dass unerwünschte estrogene Wirkungen auf Gewebe, in denen hauptsächlich der ER α vorkommt, wie z. B. das des Uterus, verringert werden^[130].

Die beobachtete Verbesserung der Gedächtnis- und Lernleistungen bei postmenopausalen Frauen durch eine Hormonersatztherapie wird vermutlich ebenfalls durch ER β vermittelt, da er in den entsprechenden Gehirnarealen fast ausschließlich auftritt^[135, 136].

Im Bezug auf die Entwicklung eines Brusttumors ist interessant, dass das Verhältnis von ER α zu ER β im malignen Mammakarzinomgewebe gegenüber dem im gesunden Gewebe deutlich ansteigt. Eventuell spielt die veränderte Expression eine signifi-

kante Rolle in der Veränderung der Estrogenabhängigkeit während der Entwicklung des Mammakarzinoms ^[137, 138].

1.3 Agonistische Wirkung

Für eine agonistische Wirkung wird der Ligand in einer hydrophoben Tasche des Rezeptors, die im Falle des $ER\alpha$ aus Teilen von Helix 3 (Met 342 - Leu 354), Helix 6 (Trp 383 - Arg 394), Helix 8 und der vorangehenden Schleife (Val 418 - Leu 428) und Helix 11 (Met 517 - Met 528) gebildet wird, aufgenommen. Diese Bindungstasche wird durch die Helix 12 (Leu 539 - His 547) verschlossen ^[45], wodurch die Koaktivatorbindungsstelle (AF-2) aus Teilen der Helices 3, 4, 5 und 12 gebildet wird (siehe auch Abschnitt 1.2.4). Diese wird durch Wechselwirkung mit den Aminosäuren Glu 542 und Lys 362 stabilisiert. In dieser Konformation des ER können Koaktivatoren durch die spezifische Bindung eines helikalen LLXXL-Motivs (NR-Box) an die exponierte AF-2 binden.

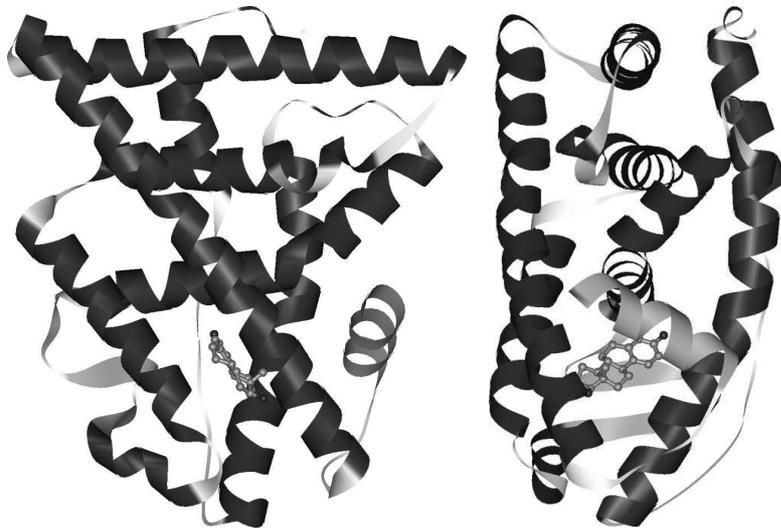


Abbildung 1.9 Röntgenkristallstruktur der mit E2 kokristallisierten LBD des $ER\alpha$ nach Brzozowski ^[45]; links: Aufsicht auf die Dimerisierungsregion eines Monomers (nach Sekundärstruktur eingefärbt, dunkelgrau: α -Helix; hellgrau im Hintergrund: β -Faltblatt, hellgrau: Helix 12); rechts: Monomer um 90° im Uhrzeigersinn gedreht, mit Aufsicht auf Helix 12

1.4 Antagonistische Wirkung

Durch die Röntgenkristallstrukturen verschiedener antagonistisch wirksamer Substanzen kokristallisiert mit den LBD von ER α und ER β konnte der Mechanismus der antagonistischen Wirkung zumindest teilweise aufgeklärt werden.

Die antagonistische Wirkung der SERM 4-OHT und RAL wird durch die Verschiebung der Helix 12 durch die basische Seitenkette der beiden Moleküle hervorgerufen. Helix 12 kann mit ihren Resten Leu 540 bis Leu 544, die einer NR-Box ähneln (LLEML statt LXXLL), die hydrophoben Interaktionen der NR-Box-Peptide imitieren und selbst an die Koaktivatorbindungsstelle binden, wodurch das Koaktivator-Recruitment verhindert wird. ^[115]

Die antiestrogene Wirkung des in Abschnitt 1.2.5 beschriebenen Tetrahydrochrysen-derivats (THC) an ER β wird durch einen sich von 4-OHT und RAL unterscheidenden Mechanismus ausgeübt ^[139], da es keine entsprechende basische Seitenkette besitzt. Da THC den ER β durch die Stabilisierung nicht-produktiver Konformationen von Schlüsselaminosäuren in der Ligandenbindungstasche antagonisiert, statt Helix 12 durch eine voluminöse Seitenkette zu verschieben, wird dieser Mechanismus „passiver“ Antagonismus genannt ^[139].

Bei den steroidalen Antagonisten ICI 182 780 bzw. ICI 164 384 wird die Wechselwirkung der Koaktivatoren mit dem Rezeptor auf eine andere Weise verhindert. Hier lagert sich die Seitenkette des Antiestrogens selbst in die Koaktivatorbindungstasche ein und verschiebt damit die Helix 12 vollständig ^[118], was das Koaktivator-Recruitment verhindert.

1.5 Problemstellung

Der ER als ligandeninduzierbarer Transkriptionsfaktor vermittelt die physiologischen Effekte endogener Estrogene ^[140]. Neben verschiedenen positiven Auswirkungen von Estrogenen beispielsweise auf die Knochendichte ^[141], die Regulation der Blutfette ^[142] und die Gehirnfunktion ^[143], haben Estrogene einen großen Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum von Brustkrebs ^[144]. Aus diesem Grund sind bisher viele Versuche unternommen worden, die Estrogenbildung und -Wirkung zu behindern, was zur Einführung von Antiestrogenen in die Brustkrebstherapie führte. TAM, ein nicht-steroidales Antiestrogen ^[145], wird zur Behandlung aller Stadien von prä-

und postmenopausalem hormonabhängigen Brustkrebs eingesetzt (vgl. auch Abschnitt 1.1.5) ^[146]. Seine estrogenartigen Wirkungen auf einige Gewebe führten zur Klassifizierung als SERM ^[147]. Seine pharmakologischen Eigenschaften beruhen auf der Fähigkeit, mit E2 um seine Bindungsstelle in der LBD des ER zu konkurrieren. TAM selbst ist ein Prodrug ^[148], das durch Hydroxylierung in *para*-Position des A-Rings aktiviert wird. Das resultierende 4-OHT (RBA-Wert = 15.6%) weist eine 8-fach höhere Rezeptoraffinität auf als TAM (RBA-Wert = 1.8%). Seine charakteristischen Strukturmerkmale sind ein Triarylalken-Grundgerüst, eine 4-OH-Gruppe am A-Ring, eine Ethylseitenkette an C2 und eine Dimethylaminoethoxy-Seitenkette in 4-Position des B-Rings. Essentiell für die Affinität zum ER ist die 4-OH-Gruppe des A-Rings, die mit Schlüsselaminosäuren der LBD des ER interagiert. Für die antagonistische Wirkung am ER wird die Dimethylaminoethoxy-Seitenkette verantwortlich gemacht ^[76, 115]. Diese sorgt für eine Konformationsänderung des ER, die zur Inaktivierung von AF-2 führt, und ruft damit die antagonistische Wirkung hervor. Sun fand 1999 ein an ER β antagonistisch wirkendes Tetrahydrochrysenderivat, das nicht über eine basische Seitenkette verfügt (vgl. Abschnitt 1.2.5) ^[129]. Die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur dieser Verbindung kokristallisiert mit den LBD beider ER-Subtypen führte zur Entdeckung des „passiven“ ER-Antagonismus ^[139].

Diese neuen Erkenntnisse, zusammen mit Voruntersuchungen von Bachmann ^[149] und Schneider ^[150], der bei einer Reihe von O-acylierten Triarylalkenen im Unterergewichtstest an unreifen Mäusen eine schwache, aber signifikante, antiestrogene Wirkung feststellen konnte, führten zu der Frage, ob die basische Seitenkette bei Triarylalkenen für die antagonistische Wirkung notwendig ist.

Zur genaueren Untersuchung dieser Frage auf molekularer Ebene sollten in dieser Arbeit Verbindungen synthetisiert und untersucht werden, die eine zu 4-OHT analoge Grundstruktur aufweisen, ohne eine Dimethylaminoethoxy-Seitenkette zu tragen.

Hierzu wurden neben 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkenen auch 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-(3-fluor-4-hydroxyphenyl)alkene sowie die jeweiligen O-Methylether untersucht, wobei der Einfluss der Seitenkette an C2 des Triarylalken-Grundgerüsts auf die antagonistische Wirkung im Vordergrund stand. Die dritte Hydroxygruppe (am C-Ring) wurde analog zu RAL ins Molekül eingeführt, um die Rezeptorbindung zu steigern; das Triarylalken-Gerüst wurde mit einem Fluoratom substituiert, da im Bereich des Kerns vor allem lipophile Wechselwirkung mit der LBD des Rezeptors möglich sind.

Daneben wurden auch die Rezeptoraffinität, die agonistische Wirkung und antiproliferativen Eigenschaften in *in vitro*-Testmodellen untersucht.

Der Einfluss der C2-Seitenkette auf die endokrinen Eigenschaften wurde vertieft untersucht, indem von geeigneten 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkenen und 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkenen Derivate synthetisiert wurden, die an C2 eine Alkylseitenkette mit funktionellen Gruppen (CN, NH₂, NHCOCH₃, NHCOC₂H₅) tragen. Ferner sollten fluoreszierende ER-Liganden mit Triarylalken-Grundgerüst entwickelt werden. Dazu soll das Triarylalken-Gerüst an unterschiedlichen Positionen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Da das Fernziel der Fluoreszenzmarkierung ER-affiner Liganden der Einsatz zum Studium von Ligand - Rezeptor - Interaktionen ist, werden die in diesen Voruntersuchungen erhaltenen Substanzen auf ihre Rezeptoraffinität und Fluoreszenzcharakteristika untersucht.

