

# 1 Einleitung

In der Biologie stellen die Proteine die kleinste eigenständig funktionsfähige Einheit dar. Sie sind für die Ausführung von biologischen Prozessen verantwortlich und nehmen so eine zentrale Stellung bei der Steuerung der zellulären Prozesse ein. Ihre Funktionsweise beruht auf Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, Nukleinsäuren oder kleinen organischen Verbindungen. Um den Funktionsmechanismus einzelner Proteine erklären zu können, ist es daher notwendig, ein genaues Verständnis von den Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartner zu erhalten.

Die Ausbildung der für eine bestimmte Funktion notwendigen Wechselwirkungen ist in der 3dimensionalen Struktur der Bindungspartner festgelegt; ein Umstand, dem es zu verdanken ist, daß Proteine, die auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sind und vergleichbare Funktionen ausführen, meist auch eine ähnliche Gesamtstruktur aufweisen. Da es die Natur im Laufe der Evolution ermöglicht hat, daß bereits kleinste Veränderungen in der Struktur einzelner Proteine eine große biologische Relevanz besitzen, deckt das zu untersuchende System mittels subtiler Unterschiede in der Struktur einen breiten molekularbiologischen Interaktionsraum ab. Um den Mechanismus der Bindung - und somit den Grund für die Ausbildung bestimmter Wechselwirkungen - verstehen zu können, ist es von großem Vorteil ein System zu finden, das die Voraussetzungen einer solchen Untersuchung erlaubt. So stellen z.B. die Nitrat- und Formiat-Oxidoreduktasen [DIEKMANN et al. 2002] auf Proteinebene bzw. Bulgestrukturen auf Seiten der Nukleinsäuren [GOLLMICK et al. 2002] Systeme dar, die eine derartige Untersuchung erlauben.

Ein wesentlich umfangreicheres System, das sowohl einander sehr ähnliche Proteine (als Rezeptoren) als auch einander chemisch verwandte Liganden enthält, ist die Familie der kernständigen Rezeptoren. Mit dieser auch gesellschaftlich relevanten Familie beschäftigt sich diese Arbeit.

## 1.1 Die kernständigen Rezeptoren

Aufgrund ihres enormen physiologischen und pathologischen Einflusses sind die kernständigen Rezeptoren (*nuclear receptors*, NR) von besonders großer medizinischer Relevanz. Sie bilden eine Proteinsuperfamilie die sich aus 48 unterschiedlichen Genen zusammensetzt [ROBINSON-RECHAVI et al. 2001]. Die Anzahl an resultierenden Proteinen ist aber durch posttranslationale Prozesse wie alternatives Splicing sehr viel größer [GRAVELEY 2001], kann aber in ihrem vollen Ausmaß noch nicht ganz überblickt werden [BLACK 2000] [SHOEMAKER und ET.AL. 2001], da die kernständigen Rezeptoren häufig alternative Transkripte aufweisen [KLIEWER et al. 1999]. Fast allen NRs ist gemein, daß sie eine hoch konservierte DNA-bindende Domäne (DBD) und eine etwas geringer konservierte ligandenbindende Domäne (LBD) besitzen. Die meisten von ihnen interagieren mit Hormonen. Es sind allerdings auch einige Vertreter dieser Superfamilie bekannt, die mit keinem bekannten Liganden wechselwirken und als *orphans* (Waisen-Rezeptoren) bezeichnet werden [KLIEWER et al. 1999].

Im weiteren werden primär zwei Sub-Familien der kernständigen Rezeptoren näher betrachtet: Zum einen die Estrogen-Rezeptoren, die sich aus einen  $\alpha$ - und einen  $\beta$ -Subtyp zusammensetzten [KUIPER et al. 1996], und zum anderen die Familie der Glukokortikoid-Rezeptoren, zu der der Androgen-, Mineralokortikoid, Glukokortikoid- und Progesteron-Rezeptor zählen. Evolutiv leiten sich die Steroid-Rezeptoren über eine Serie von Duplikationen von einem gemeinsamen Rezeptor-Gen Vorfahren ab [THORNTON und DESALLE 2000]. Dieser gemeinsame Vorfahre war nach Thornton [THORNTON 2001] ein Estrogen-Rezeptor, von dem sich entsprechend der neodarwinistischen Evolutionstheorie die Familie der Glukokortikoid-Rezeptoren ableitete, mit dem Progesteron-Rezeptor als den zuerst aufgekommenen Vertreter. Die Androgen- und Kortikoid-Rezeptoren sind Entwicklungen neuerer Zeit. Ihnen ist allen gemein, daß sie Liganden binden, die auf eine Grundform zurückzuführen sind und sich teilweise nur sehr geringfügig unterscheiden. „*Mit minimalen strukturellen Variationen zaubert die Natur in virtuoser Weise ein breites Spektrum unterschiedlichster biologischer Wirkungen hervor.*“ aus „Wirkstoffdesign“ [BÖHM et al. 1996].

Die kernständigen Rezeptoren zeigen DNA-Protein-Bindungen über ihre DBD, Ligand-Protein-Wechselwirkungen an ihrer LBD und Protein-Protein-Bindungen bei der Interaktion mit Koaktivatoren [MCDONNELL 1999] und sind deshalb molekularbiologisch intensiv untersucht.

Die klassischen Steroid-Hormone [ TSAI und O'MALLEY 1994 ] - Estrogene ( $17\beta$ -Estra-

diol), Gestagene (Progesteron), Androgene (Testosteron), Glukokortikoide (Cortisol) und Mineralokortikoide (Aldosteron) - werden im Körper in den endokrinen Zellen synthetisiert und freigesetzt. Über die Blutbahn gelangen sie zu ihren Zielzellen, in die sie via Diffusion eindringen, um dort - als endogene Liganden - an ihre spezifischen Rezeptoren zu binden, wie es in vereinfachter Form nach Tsai [TSAI und O'MALLEY 1994] in Abbildung 1.1 dargestellt ist. Die entsprechenden Rezeptoren liegen in un-

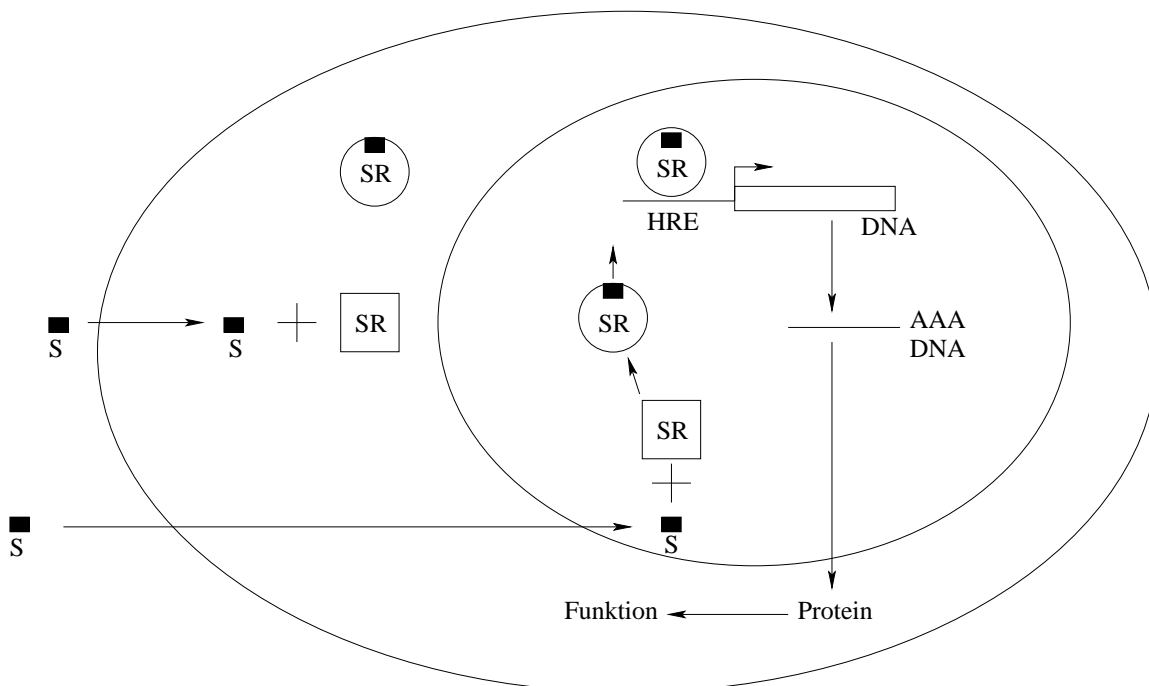


Abbildung 1.1: **Vereinfachte Darstellung der Hormonaktivität nach Tsai** [TSAI und O'MALLEY 1994]. Das Steroid (S) gelangt über die Blutbahn zu seiner Zielzelle, in die es durch freie oder vereinfachte Diffusion eindringt. Durch Bindung an den Steroid-Rezeptor (SR) im Cytoplasma oder im Zellkern erfährt dieses Protein eine Konformationsänderung, die es ihm ermöglicht an bestimmte Sequenzen (*Hormone Response Elements HRE*) DNA zu binden und als Transkriptionsfaktor die Expression bestimmter Proteine zu regulieren.

gebundener Form als Monomere in den Zielzellen vor. Hier können sie entweder frei dissoziiert [WEIGEL und ZAHNG 1998] [DE FRANCO 1998] oder in Assoziation mit Hitzeschock-Proteinen vorliegen [MÉTIVIER et al. 2002], wobei ungeklärt ist, ob diese Komplexe im Cytoplasma [OOSTENBRINK et al. 2000] [TSAI und O'MALLEY 1994] oder im Zellkern [MCDONNELL und NORRIS 2002] lokalisiert sind. Durch Bindung der Steroide erfahren die Rezeptoren eine Konformationsänderung, die es ihnen erlaubt zu dimerisieren. Die hier beschriebenen Sexual- und Glukokortikoid-artigen Rezeptoren bilden ausschließlich Homodimere aus, wohingegen andere Vertreter der

kernständigen Rezeptoren wie Rezeptoren für Thyroid-Hormone (TR), Vitamin D (VDR) oder Retinoidsäure (RAR und RXR) auch untereinander Heterodimere formen können [TSAI und O'MALLEY 1994]. In einigen Fällen ist noch eine Protein-Protein-Wechselwirkung durch einen Koaktivator wie dem GRIP (*Glucocorticoid-Receptor-Interacting-Protein*) notwendig, der durch Bindung an die LBD zur Aktivierung des Rezeptors führt [MCKENNA und O'MALLEY 2002]. Als Dimer ist der Rezeptor in der Lage in den Zellkern einzudringen. Die DNA-Bindung erfolgt nun über die DBD, die zur Gruppe der Zink-Finger zählt und über alle Vertreter der Superfamilie eine hohe Konservierung aufweist. In dieser Form ist das Protein in der Lage als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene zu steuern [KLEIN-HITPASS et al. 1989].

Allen Vertretern der hier in dieser Arbeit untersuchten Steroid-Rezeptoren ist ein breites Wirkungsspektrum gemein. Sie beeinflussen die Reproduktion [KUIPER et al. 1997], Physiologie [KORACH 1994] und auch das psychische Verhalten [WILSON und GRIFFIN 1980] [TRONCHE et al. 1999], was sie zu pharmakologisch sehr interessanten Ziel-Proteinen macht. Ferner zeichnen sie sich dadurch aus, daß sie sich teilweise gegenseitig beeinflussen [DUTERTRE und SMITH 2000]. So führt die Bindung einzelner Liganden an unterschiedlichen Rezeptoren zu Kreuzaktivitäten [FAGART et al. 1998] und verschiedene Rezeptoren regulieren die Transkription gleicher Gene [HALL und MCDONNELL 1999]. Das Wirkungsspektrum ist neben den Liganden auch von dem Gewebe abhängig [KUIPER et al. 1997]. Lokale Effekte einzelner Rezeptoren und das somit selektive Verhalten der Rezeptoren wird ausserdem durch den Expressionsort der Rezeptoren und die dortige Konzentration an Kofaktoren gesteuert.

Die Estrogen-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  binden spezifisch das auch als weibliches Sexualhormon bekannte  $17\beta$ -Estradiol [JORDAN et al. 1985] und beeinflussen somit primär den weiblichen Organismus. Die Aktivierung und Hemmung des Estrogenrezeptors ist für die Steuerung von Prozessen verantwortlich, die den Körperbau und die Reproduktion regulieren [KUIPER et al. 1997], aber auch in das psychische Verhalten der Frau eingreifen können [WILLIAMS und STANCEL 1996]. Diese Effekte sind über den Lebenszeitraum unterschiedlich und greifen in verschiedenen Stadien in die Entwicklung ein [FORTH et al. 2001]. So sind die Estrogen-Rezeptoren für die Ausbildung und den Erhalt der Geschlechtsreife verantwortlich. Diesem Effekt verdanken die Estrogen-Rezeptoren zusammen mit dem Progesteron-Rezeptor ihre pharmakologische Bedeutung in der Fertilitätskontrolle mittels oraler Kontrazeptiva. Ein zusätzlicher, ausgesprochen wichtiger Effekt der Estrogen-Rezeptoren besteht in ihrem Einfluß auf den

Körperbau [RIGGS und MELTON III. 1992]. So sind sie neben der Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und den Aufbau von Knochensubstanz während der Entwicklungsphase auch für den Erhalt der Knochenmasse im ersten Abschnitt der Biphase zuständig. Der Rückgang an Estrogenen in der zweiten Biphase (Postmenopause) kann Osteoporose zur Folge haben [HARDMAN et al. 1996]. Hier ist ein anderer wichtiger pharmakologischer Ansatzpunkt zu erkennen, der sich auf den Ersatz der endogenen Steroide in der Postmenopause konzentriert. So stellen die durch Hormonmangel in dieser Phase hervorgerufenen Krankheiten eine große medizinische Bedeutung dar, die ein genaues Wissen über die Struktur-Aktivitätsbeziehung, wie sie in dieser Arbeit untersucht wird, notwendig machen. Erst ein genaues Verständnis der Spezifität der Estrogen-Rezeptoren und der Kreuzaktivitäten mit anderen kernständigen Rezeptoren wird es ermöglichen das Verhalten dieser Rezeptoren genau zu steuern. So ist zu hoffen, daß für Krankheiten wie Brustkrebs, Osteoporose und Herzinfarkt, die ebenfalls im Zusammenhang mit den Estrogen-Rezeptoren stehen, in Zukunft eine bessere Prevention möglich wird.

Wie die Estrogene über die Estrogen-Rezeptoren greifen auch die Gestagene durch Bindung an den Progesteron-Rezeptor in die Fertilität des weiblichen Organismus ein [BAULIEU 1989]. Das im Organismus physiologisch wirkende Gestagen ist das Progesteron, das auch in dieser Arbeit als endogener Ligand zum humanen Progesteron-Rezeptor herangezogen wurde. Von pharmakologischer Seite gesehen entfalten die Gestagene ihre größte Bedeutung während des weiblichen Zyklus. In ihrer natürlichen Wirkungsweise sind sie für die Vorbereitung und den Erhalt der Schwangerschaft zuständig [WILLIAMS und STANCEL 1996]. Durch negativen Feedback hemmen die Gestagene die Ausschüttung von Gonadotropinen und verhindern so eine Doppelschwangerschaft. Sie haben somit eine kontrazeptive Wirkung, aus der sich, neben der Hormonersatztherapie, ihr Haupteinsatzbereich in der Pharmakologie herleitet [HARDMAN et al. 1996].

In Kombination mit Estrogenen werden Gestagene seit Anfang der 60er Jahre als Kontrazeptiva vertrieben. Die Einführung der Pille (Enovit 1960) stellt einen markanten Wendepunkt der Stellung der Frau in der Gesellschaft dar. Hieran ist zu erkennen, daß zu der Erforschung der Wechselwirkungen der Steroide und ihrer Rezeptoren neben ihrer pharmakologisch-medizinischen und wirtschaftlichen Bedeutung auch ein nicht zu unterschätzender gesellschaftlicher Einfluß hinzukommt [ASBELL 1998].

Die Komplexität der durch Estrogene und Gestagene hervorgerufenen Reaktionen wird bei Betrachtung der Kreuzaktivitäten zu anderen Rezeptoren umfangreicher.