

Senad Medunjanin  
Dr. sc. hum.

**Funktion des IGF - Signalweges bei der Aktivierung  
des Estrogenrezeptors in Brustkrebszellen  
Spezifische Serin-Phosphorylierung in der AF-1 Domäne  
des Estrogenrezeptors**

Geboren am 25.10.1969 in Peć, Jugoslawien

Diplom der Fachrichtung Biologie am 19.11.1992 an der Universität Pristina, Jugoslawien

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Doris Mayer

Der Interaktion zwischen dem Insulin-like Growth Factor (IGF) – Signalweg und der Aktivität des Estrogenrezeptors wird eine große Bedeutung bei der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms zugemessen. Trotz intensiver Forschung ist jedoch der Einfluss des Wachstumsfaktor-aktivierten Signalweges auf die Aktivität des Estrogenrezeptors wenig verstanden. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob Proteinkinasen des IGF-I Signalweges bei der ligandenabhängigen Aktivierung des Estrogenrezeptors eine Rolle spielen, und diese Proteinkinasen zu identifizieren. Die Untersuchungen wurden an estrogenabhängigen Brustkrebszelllinien durchgeführt.

Mehrtägige Estradiol-Behandlung der Zellen resultierte in einer Zunahme des IGF-I Rezeptor-Proteins und seines Substrats Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) sowie in einer Abnahme der Glykogensynthasekinase-3 (GSK3). Daraus ergab sich ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen Estrogenrezeptor-Aktivität und IGF-Signalweg. Eine Interaktion zwischen dem IGF-Signalweg und dem Estrogenrezeptor auf der Ebene schneller Phosphorylierungsreaktionen an Tyrosin bzw. Serin/Threonin konnte an IGF-I Rezeptor und IRS-1 nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurde die Proteinkinase B (PKB/AKT) unter dem Einfluss von Estradiol an Thr308 und Ser473 phosphoryliert bzw. aktiviert. Diese Phosphorylierung konnte durch Wortmannin, einen Hemmer der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), ein Protein upstream von PKB/AKT, gehemmt werden. Es stellte sich die Frage, ob PKB/AKT eine Rolle bei der Aktivierung des Estrogenrezeptors spielt. Dazu

wurden Zellen, welche mit aktiven bzw. inaktiven Mutanten von PKB/AKT stabil transfiziert waren mit Estradiol behandelt und die Estrogenrezeptor-Aktivierung anhand eines Luciferase-Reportergen Assays gemessen. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus dass die Aktivierung des Estrogenrezeptors nur bei normal reguliertem PKB/AKT geregelt verläuft. Veränderungen an PKB/AKT resultieren offensichtlich in einer Destabilisierung und als Konsequenz in einer verminderten Aktivität des Estrogenrezeptors. Weiterhin wurde eine andere Kinase unterhalb von PKB/AKT vermutet, durch die PKB/AKT reguliert wird. Ein plausibler Kandidat für diesen Regulationsmechanismus war die GSK3. Diese ist nicht nur als Substrat von PKB/AKT wohl bekannt, sondern auch als Regulator der Funktion zahlreicher Transkriptionsfaktoren.

Die Behandlung von MELN-Zellen mit Estradiol resultierte in der schnellen Phosphorylierung der GSK3.

Für die direkte Beteiligung der GSK3 an der Estrogenrezeptor-Aktivierung kann die partielle Hemmung der Estradiol-induzierten Estrogenrezeptor-Aktivierung durch den GSK3-Inhibitor SB415. Weiterhin wurde untersucht, ob GSK3 in MELN-Zellen mit dem Estrogenrezeptor einen Komplex bildet

Mit Hilfe der Immun-Kopräzipitation und die Kolokalisation wurde untersucht, ob GSK3 in MELN-Zellen mit dem Estrogenrezeptor einen Komplex bildet. Beide dieser Methoden ergaben eine Liganden-unabhängige sowie eine Liganden-abhängige

Liganden-abhängigen

Es konnte eine eindeutige Phosphorylierung des Estrogenrezeptors durch die GSK3β nachgewiesen werden.

Nach dem gezeigt war, dass GSK3 den Estrogenrezeptor phosphoryliert, stellte sich die Frage, in welcher Domäne und an welchen Aminosäureresten des Rezeptors die Phosphorylierung durch GSK3 stattfindet. Deletionsmutanten des Estrogenrezeptors wurden in Kombination mit GSK3 in COS-1 Zellen transfiziert und exprimiert. Durch Kopräzipitation der Proteine wurde die B-Domäne als die für die Interaktion mit GSK3 essentielle Region des Estrogenrezeptors identifiziert.

Um die genauen Phosphorylierungsstellen zu ermitteln, wurden rekombinante Proteine des Estrogenrezeptors hergestellt, welche die Sequenzen der B-Domäne mit den potentiellen Phosphorylierungsstellen für GSK3 enthielten. Die Mutation sämtlicher potentiellen Serin-Phosphorylierungsstellen zu Alanin erlaubte es, Ser102 und Ser104 sowie Ser118 als die tatsächlichen Phosphorylierungsstellen zu ermitteln, Ser118 wurde durch das sogenannte Upshift bestätigt.