

## **Abstract**

---

## 5 Abstract

In mammals estrogens play a crucial role in a wide range of physiological processes, such as reproduction and behaviour. They further contribute to protective procedures in so-called non-target tissues, like bone, cardiovascular, skeletal, and nervous system. In contrast, estrogens are also involved in the development and progression of diseases. Thus, they are considered as risk factors for tumourigenesis, especially in tissues that respond to sex steroids with receptor mediated proliferation, namely the breast epithelium and endometrium. In their capacity to regulate development and function of reproductive organs, estrogens are often committed to interactions with growth factors, especially EGF and IGF-1. Similar correlations have been suggested for TGF- $\beta$ . However, there exists only little information regarding this question. As TGF- $\beta$  exerts positive as well as negative influences on cancer cells, it is considered as both promoter and suppressor of tumour progression. The growth factor negatively regulates proliferation of normal and transformed epithelial cells, including those of the mammary gland, by arrest in the G1 phase of the cell cycle and by promoting apoptosis. During cancer development, the cells become less sensitive to the antiproliferative and proapoptotic effects of the chemokine. Concomitantly, the tumour promoting properties, like induction of EMT and cell migration, gain in importance. The migratory potency of cancer cells demonstrably increases in response to estrogens and growth factors and substantially accounts for metastatic dissemination of a tumour from its primary site. In this study the cross-communication between estrogens and TGF- $\beta$  has been investigated, particularly focussing on the impact on the migratory properties of TGF- $\beta$ .

Both, E2 and TGF- $\beta$ , induced migration of estrogen dependent MCF-7 breast cancer cells, and simultaneous treatment resulted in a synergistic effect of the migratory response. However, when these cells were preincubated with E2, the ability of TGF- $\beta$  to evoke chemotaxis was drastically diminished. In contrast, the migratory behaviour of hormone independent MDA-MB-231 cells remained unaffected. E2 seems to be a specific inhibitor of TGF- $\beta$  induced chemotaxis, since the non-specific migratory stimulus of FCS was not affected. Abrogation of Smad-signalling proved that this pathway is essential for TGF- $\beta$  mediated migration of MCF-7 cells. In agreement, pretreatment of MCF-7 cells with E2 resulted in a reduced phosphorylation of Smad2,

complexation of R- and Co-Smads, and a diminished Smad2 and Smad3 reporter gene activity in response to TGF- $\beta$ .

Experiments with E2, covalently linked to plasma membrane impermeable BSA, and PTX clearly proved the cross-talk between estrogens and the Smad signalling cascade to be mediated by a G<sub>i</sub>-protein coupled estrogen responsive receptor. In recent years, the orphan receptor GPR30 has repeatedly been identified as a possible mediator for rapid, non-genomic estrogenic effects initiated at the plasma membrane. PCR experiments proved the existence of GPR30-mRNA transcripts in MCF-7 cells, whereas MDA-MB-231 cells were GPR30 deficient. Comparable to E2, the pure antiestrogen ICI182,780, which has been proved to bind to GPR30 in an agonistic manner, impaired migration and Smad phosphorylation in response to TGF- $\beta$  through a PTX sensitive mechanism. Concrete evidence for GPR30 as a mediator of E2 induced interruption of TGF- $\beta$  signalling could successfully be provided by transfection experiments. Thus, migration and Smad2 phosphorylation of E2 sensitised MCF-7 cells could be restored after down-regulation of GPR30 expression by siRNA technique. These findings could be corroborated, as the inhibitory properties of the hormone on TGF- $\beta$  signalling could be established by transfection of MDA-MB-231 cells with a GPR30 expression vector.

Activation of ERK-MAPK is a critical event in signalling via GPR30. In MCF-7 cells, ERK1/2 was rapidly activated in response to E2 and ICI182,780, whereas in MDA-MB-231 cells activation of the enzyme could only be measured after over-expression of GPR30. Moreover, costimulation of MCF-7 cells with TGF- $\beta$  and E2 activated ERK1/2 in a synergistic manner. As ERK1/2 is known to interfere with the Smad signalling cascade, it was anticipated that it also contributes to the impairment of TGF- $\beta$  signalling pathways by E2. Application of the MAPK kinase inhibitor PD098,059 corroborated this assumption.

Estrogene spielen in Säugern eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie z.B. Fortpflanzung und Verhalten. Ferner vermitteln sie protektive Effekte in nicht-primären Zielorganen, wie Knochen sowie Skelett-, Nerven- und kardiovaskulärem System. Im Gegensatz dazu sind sie aber auch bei Entstehung und Fortschreiten pathologischer Prozesse beteiligt. So gelten sie z.B. als Risikofaktoren für die Entwicklung von Tumoren, insbesondere in Geweben, in denen Geschlechtshormone zu einer Rezeptor-abhängigen Proliferation führen, wie das Brustepithelium und das Endometrium. Die Fähigkeit von Estrogenen, die Entwicklung und Funktion von Reproduktionsorganen zu regulieren beruht zu einem großen Teil auf Wechselwirkungen mit Wachstumsfaktor-Signalwegen, besonders denen von EGF und IGF-1. Ein ähnlicher Zusammenhang wird auch für TGF- $\beta$  vermutet, jedoch ist dazu bisher nur sehr wenig bekannt.

TGF- $\beta$  vermittelt sowohl positive als auch negative Einflüsse auf Tumorzellen und wird deshalb sowohl als Tumorpromotor als auch -suppressor angesehen. Die antiproliferative Wirkung des Wachstumsfaktors auf normale, aber auch transformierte Epithelzellen beruht auf einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und auf Induktion von Apoptose in diesen Zellen. Mit fortschreitender Tumorentwicklung verlieren die Zellen ihre Empfindlichkeit gegenüber den antiproliferativen und proapoptotischen Effekten von TGF- $\beta$ , während seine Tumorfördernden Eigenschaften an Bedeutung gewinnen. Dazu gehören die Induktion von EMT und Zellmigration. Die migratorischen Eigenschaften von Krebszellen können durch Estrogene und Wachstumsfaktoren stimuliert werden und tragen wesentlich zu deren metastatischem Potential bei. In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen Estrogenen und TGF- $\beta$  untersucht, mit besonderem Schwerpunkt auf deren Einfluss auf die TGF- $\beta$  induzierte Migration.

Sowohl E2 als auch TGF- $\beta$  stimulierten die Migration von estrogen-abhängigen MCF-7-Zellen, gleichzeitige Gabe der Substanzen führte zu einem synergistischen Effekt. Wurden diese Zellen allerdings mit dem Estrogen vorinkubiert, sank deren Reaktion auf den migratorischen TGF- $\beta$ -Stimulus signifikant. Im Gegensatz dazu waren Hormon-unabhängige MDA-MB-231-Zellen auch nach Behandlung mit E2 in der Lage, auf TGF- $\beta$  zu migrieren. Der inhibitorische Einfluss von E2 auf die Zellmigration scheint spezifisch für TGF- $\beta$  zu sein, da das Steroid keine Wirkung auf den unspezifischen Stimulus von FCS zeigte. Der Smad-Signaltransduktionsweg ist

nachweislich an der Vermittlung des migratorischen Stimulus von TGF- $\beta$  beteiligt. Wie zu erwarten, führte E2 zu einer Hemmung dieses Signalweges. Dies zeigte sich in einer Verminderung der Phosphorylierung der Smad-Proteine, der Komplexbildung zwischen R- und Co-Smads sowie der Aktivierung von Smad2 und 3 -abhängigen Promotoren.

Experimente mit Membran-impermeablem BSA-E2 und PTX bewiesen, dass E2 seine inhibitorische Wirkung auf die TGF- $\beta$ -Signalkaskade über Membran-ständige, G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren entfaltet. Es wurde gezeigt, dass der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR30 in der Lage ist, schnelle Estrogenantworten an der Zellmembran zu initiieren. Die Existenz dieses Rezeptors in MCF-7-Zellen konnte durch RT-PCR nachgewiesen werden. MDA-MB-231-Zellen erwiesen sich, im Gegensatz dazu, als GPR30-negativ. Das reine Antiestrogen ICI182,780, welches agonistisch an GPR30 bindet, war ebenfalls in der Lage, PTX-abhängig die TGF- $\beta$ -induzierte Migration und Smad-Phosphorylierung zu hemmen. Konkrete Beweise für die Beteiligung von GPR30 an der Vermittlung der Interaktion von TGF- $\beta$  und Estrogenen lieferten Transfektionsexperimente. So konnte durch Hemmung der GPR30-Expression mittels siRNA der TGF- $\beta$ -Signalweg in E2-behandelten MCF-7-Zellen wiederhergestellt werden. Darüber hinaus führte eine Überexpression des Rezeptors in MDA-MB-231-Zellen zur Etablierung eines Estrogen-sensitiven Phänotyps.

Die Aktivierung der ERK-MAPK spielt eine zentrale Rolle in GPR30-vermittelten Signalwegen. E2 und ICI182,780 stimulierten ERK1/2 in MCF-7-Zellen, während eine Enzymaktivierung in MDA-MB-231-Zellen dagegen nur nach Transfektion mit GPR30 möglich war. Darüber hinaus hatte eine Kostimulation mit TGF- $\beta$  und E2 eine synergistische Wirkung auf die ERK1/2-Phosphorylierung. Da MAPKs die Smad-Signaltransduktion beeinträchtigen können, wurde vermutet, dass die Aktivierung des Enzyms zur Hemmung des TGF- $\beta$ -Signalweges durch E2 beiträgt. Dies konnte durch Einsatz des MAPK-Kinase-Inhibitors PD098,059 bestätigt werden.