

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Systematische Untersuchung des Einflusses von PGRMC1 und PHB2  
auf die Aktivierung und Lokalisation von ER $\alpha$  nach Stimulation mit  
dem Progestin NET in Brustkrebszelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Josephine Aimee Hasenkox

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans Neubauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Georg Pongratz

## Zusammenfassung

Das Auftreten von Brustkrebs ist während der Einnahme einer Hormonersatztherapie signifikant erhöht. Dabei treten insbesondere Östrogen-Rezeptor-positive Tumoren auf. Eine Aktivierung des Östrogen-Rezeptors  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) kann durch das multifunktionale Protein *Progesterone Receptor Membrane Component 1* (PGRMC1) beeinflusst werden, welches in  $ER\alpha$ -positiven Tumoren hochreguliert ist. Neueste Arbeiten konnten zeigen, dass das  $ER\alpha$ -regulierende Protein Prohibitin 2 (PHB2) mit PGRMC1 interagiert. PHB2 könnte daher als Mediator zwischen PGRMC1 und  $ER\alpha$  eine entscheidende Rolle in der Brustkrebspathologie spielen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion zwischen  $ER\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 sowie der Mechanismen, die zu einer  $ER\alpha$ -Aktivierung und erhöhten Zellproliferation führen. Die Bestimmung der Lokalisation der einzelnen Proteine sollte dabei mittels subzellulärer Fraktionierung durchgeführt werden, welche in dieser Arbeit zunächst in der  $ER\alpha$ -positiven Brustkrebszelllinie MCF-7 etabliert wurde. Die Lokalisation von PGRMC1 sowie  $ER\alpha$  wurde nachfolgend mittels Immunfluoreszenzfärbung verifiziert. Anschließend wurde die Lokalisation der Proteine in Folge der Stimulation mit dem Progestin Norethisteron (NET), welches das Brustkrebsrisiko erhöht, mittels subzellulärer Fraktionierung untersucht. Zur Analyse der  $ER\alpha$ -Aktivierung nach der Stimulation mit NET wurde die Phosphorylierung von  $ER\alpha$  an der Aminosäure Serin 118 (S118) mittels einer Zeitkinetik im Western Blot und in der Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Zur Untersuchung der Bedeutung von PGRMC1 für die Zellhomöostase wurden zwei PGRMC1-*Knockout*-Zelllinien verwendet. Die Bestätigung des *Knockouts* (KO) erfolgte dabei auf Protein-Ebene mittels Western Blot. Um funktionelle Auswirkungen des PGRMC1-Verlustes zu detektieren, wurden  $ER\alpha$ -Phosphorylierung und Aktivierung in PGRMC1-KO-Zellen bestimmt.

Die Methode der subzellulären Fraktionierung konnte in MCF-7 erfolgreich etabliert werden. Mittels dieser konnte eine quantifizierbare Analyse der Proteinlokalisierung durchgeführt werden. Die Lokalisation von  $ER\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 wurde sowohl vor als auch nach NET-Stimulation festgestellt. In der Zeitkinetik konnte eine dynamische Phosphorylierung von  $ER\alpha$  an S118 nach NET-Stimulation festgestellt werden, ebenso eine Translokation von  $ER\alpha$  in den Zellkern. Die Proteine PGRMC1 und PHB2 veränderten hingegen ihre Lokalisation nach NET-Stimulation nicht und verblieben extranukleär. Im Western Blot konnte die  $ER\alpha$ -Expression und Phosphorylierung auch in PGRMC1-KO-Zelllinien festgestellt werden. Der Verlust von PGRMC1 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Proliferation in PGRMC1-KO-Zellen im Vergleich zur parentalen MCF-7-Zelllinie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine funktionelle Interaktion zwischen  $ER\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 in Brustkrebszelllinien hin, was einen Einfluss auf die  $ER\alpha$ -Aktivierung hat. Die Stimulation mit dem Progestin NET scheint darüber hinaus einen PGRMC1-unabhängigen, proliferationsfördernden Einfluss zu entfalten. Dieser besteht auch bei einem *Knockout* von PGRMC1. Zum Verständnis und der Prävention von Therapieresistenzen sollten die zugrunde liegenden Signalwege weiter untersucht werden.

## Abstract

Women receiving hormone replacement therapy (HRT) are at higher risk for developing breast cancer, especially estrogen receptor positive tumors. The multifunctional protein progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) was shown to be upregulated in estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) positive tumor tissues and its overexpression in breast cancer cell lines results in increased ER $\alpha$  activation. Recent studies indicate that PGRMC1 interacts with the ER $\alpha$  regulatory protein prohibitin 2 (PHB2) and reduces its interference with the oncogenic signaling of ER $\alpha$  in breast cancer.

The aim of this study was to investigate the functional interplay between ER $\alpha$ , PGRMC1 and PHB2 and to further characterize the signaling pathways leading to ER $\alpha$  activation and increased cancer cell proliferation. For subsequent investigation of the localization of the proteins of interest, subcellular fractionation was established in the ER $\alpha$  positive breast cancer cell line MCF-7. The findings were validated via immunofluorescence staining. Subsequently, localization of PGRMC1, ER $\alpha$  and PHB2 was analyzed upon treatment of PGRMC1-overexpressing MCF-7 breast cancer cells with the progestin norethisterone (NET), which is reported to increase the risk for developing breast cancer. To analyze possible ER $\alpha$  activation upon progestin stimulation, the ER $\alpha$ -phosphorylation at serine 118 (S118) was detected via western blot and immunofluorescence staining after treatment with NET for different time periods. Since NET-metabolites may activate ER $\alpha$  in a ligand-dependent manner, two PGRMC1-deficient knockout cell lines were analyzed with respect to ER $\alpha$  phosphorylation and cell proliferation to dissect PGRMC1-specific from PGRMC1-unspecific effects.

Subcellular fractionation was successfully established in MCF-7, enabling a quantifiable analysis of protein localization. Consequently, localization of ER $\alpha$ , PGRMC1 and PHB2 could be determined upon stimulation with NET. Time kinetics showed a dynamic phosphorylation of ER $\alpha$  at S118 upon NET stimulation, leading to ER $\alpha$  translocation into the nucleus. For PGRMC1 and PHB2, no translocation could be observed upon progestin treatment. In PGRMC1-deficient cell lines the dynamics of ER $\alpha$  phosphorylation were similar to the parental cell line MCF-7, pointing towards a PGRMC1-independent NET-effect on ER $\alpha$ . Consequently, cell proliferation of PGRMC1-deficient cell lines increased in response to NET treatment to a similar extent as of MCF-7, while proliferation of the PGRMC1-overexpressing cells increased significantly stronger.

Findings of this study emphasize the dual effect of NET on ER $\alpha$  activation which is propagated via ER $\alpha$  phosphorylation and via indirect ER $\alpha$  activation through the PGRMC1-PHB-axis. Further investigation of signaling pathways needs to be performed to gain deeper insight into the mechanism underlying the increased breast cancer risk upon HRT.

## Abkürzungsverzeichnis

(m)A	(Milli-) Ampere
AF	Aktivierungsfunktion
Akt	Proteinkinase B
<i>(Et) al.</i>	<i>(Et) alii</i>
BIG3	<i>Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3</i>
° C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CEB	<i>Cytoplasmic extraction buffer</i>
CEE	Konjugierte equine Östrogene
CALR	Calreticulin
CK19	Cytokeratin 19
(k)Da	(Kilo-) Dalton
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E2	Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	<i>Epidermal growth factor (receptor)</i>
EpCAM	<i>Epithelial cellular adhesion molecule</i>
EPT	Östrogen-Progestin-Therapie
(p) ER ( $\alpha/\beta$ )	(phosphorylierter) Östrogen-Rezeptor ( $\alpha/\beta$ )
ERE	<i>Estrogen response elements</i>
ET	Östrogen-basierte Therapie
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
(n)g	(Nano-) Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H3	Histonprotein H3
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER-2	<i>Human epidermal growth factor 2</i>
HET	Hormonersatztherapie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IF	Immunfluoreszenzfärbung
KO	<i>Knockout</i>
( $\mu$ /m)l	(Mikro-/Milli-) Liter
LBD	Liganden-bindende Domäne

(m)M	(Milli-) Mol
( $\mu$ )m	(Mikro-) Meter
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MAPR	Membran-assoziiertes Progesteron Rezeptor
min	Minute(n)
MNase	<i>Micrococcal nuclease</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWS	<i>Million Women Study</i>
MEB	<i>Membrane extraction buffer</i>
n.s.	Nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NEB	<i>Nuclear extraction buffer</i>
NET	Norethisteron
NP-40	Nonidet P-40
P	Prolin
(D)PBS	<i>(Dulbecco's) Phosphate buffered saline</i>
PEB	<i>Pellet extraction buffer</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGRMC1	<i>Progesterone receptor membrane component 1</i>
PHB (1/2)	Prohibitin (1/2)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Kinase
PR	Progesteron-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REA	<i>Repressor of estrogen receptor activity</i>
RPM	<i>Revolutions per minute</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
(m/si) RNA	<i>(messenger/small interfering) Ribonucleic acid</i>
(p)S	(Phosphoryliertes) Serin
s	Sekunde
SERM	Selektiver Östrogen Rezeptor Modulator
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRT1	Sirtuin 1
SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>
T	Threonin
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USA	<i>United States of America</i>
V	Volt
WB	Western Blot
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
Y	Tyrosin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Brustkrebs</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie von Brustkrebs	1
1.1.2	Pathologie und Klassifizierung von malignen Tumoren der Brust	1
1.1.3	Hormonersatztherapie und Brustkrebs	2
<b>1.2</b>	<b>Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1)</b>	<b>6</b>
1.2.1	Struktur und Physiologie von PGRMC1	6
1.2.2	Bedeutung von PGRMC1 in Brustkrebs	7
<b>1.3</b>	<b>Östrogen-Rezeptor <math>\alpha</math> (ER<math>\alpha</math>)</b>	<b>8</b>
1.3.1	Struktur und Physiologie von ER $\alpha$	8
1.3.2	Bedeutung von ER $\alpha$ in Brustkrebs und Zusammenhang zu PGRMC1	10
<b>1.4</b>	<b>Prohibitin 1 und Prohibitin 2</b>	<b>11</b>
1.4.1	Physiologie der Prohibitine	11
1.4.2	Bedeutung der Prohibitine in Brustkrebs	12
<b>1.5</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methodik</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Zelllinien	14
2.1.3	Antikörper	15
2.1.4	Kits und kommerziell erhältliche Reagenzien	16
2.1.5	Verbrauchsgegenstände	16
2.1.6	Medien & Lösungen für Zellkulturen	17
2.1.7	Lösungen & Puffer	17
2.1.8	Geräte & Software	18
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methodik</b>	<b>19</b>
2.2.1	Kultivierung von Brustkrebszelllinien	19
2.2.2	Kryokonservierung von Zellen	19
2.2.3	Zellen ernten zur Analyse mittels Western Blot	19
2.2.4	Zellen ernten zur Anfertigung der subzellulären Fraktionierung und Untersuchung der Zeitkinetik von Phosphorylierungen	20
2.2.5	Zellen synchronisieren	20
2.2.6	Zellen stimulieren	20
<b>2.3</b>	<b>Protein-biochemische Methodik</b>	<b>20</b>
2.3.1	Subzelluläre Fraktionierung von kultivierten Brustkrebszelllinien	20
2.3.2	Lyse der Zellen für Western Blot	21
2.3.3	SDS-PAGE und Western Blot	21
2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung	22
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methodik</b>	<b>23</b>
2.4.1	MTT-Wachstums-Assay	23
<b>2.5</b>	<b>Grafische Darstellung</b>	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung der subzellulären Fraktionierung von MCF-7</b>	<b>24</b>
3.1.1	Auswahl geeigneter Markerproteine für subzelluläre Fraktionen	24
3.1.2	Integration der Markerproteine zu einem Antikörpergemisch	26
3.1.3	Fraktionen lassen sich zu Membran-, Zytoplasma- und Kern-Fraktionen zusammenfassen	28

3.1.4	Auswirkung des Ablösens mittels Zellschabern oder Trypsin-EDTA auf die Detektion von E-Cadherin im Western Blot.....	30
3.1.5	Intensivieren der Waschschritte in der Fraktionierung verringert Verunreinigung von Membran- und Kern-Fraktion mit Proteinen der zytoplasmatischen Fraktion.....	31
3.1.6	Zur Identifizierung der subzellulären Fraktionen in MCF-7 wurde ein Antikörpergemisch aus $\beta$ -Actin, E-Cadherin, CALR und H3 etabliert.....	33
<b>3.2</b>	<b>Lokalisation von PGRMC1 und PHB2 in MCF-7 .....</b>	<b>34</b>
3.2.1	PGRMC1 ist vor und nach NET-Stimulation perinukleär lokalisiert .....	34
3.2.2	PGRMC1 ist nach NET-Stimulation in der Membran-Fraktion von MCF-7/PGRMC1 lokalisiert ..	36
3.2.3	PHB2 ist in der Membran-Fraktion von MCF-7/PGRMC1 lokalisiert.....	37
<b>3.3</b>	<b>Phosphorylierung und Translokation von ER<math>\alpha</math> nach NET-Stimulation .....</b>	<b>38</b>
3.3.1	NET-induzierte ER $\alpha$ -Phosphorylierung erreicht nach 60 min ein Maximum .....	38
3.3.2	ER $\alpha$ transloziert nach NET-Stimulation aus der Membran-Fraktion in die Kern-Fraktion .....	44
<b>3.4</b>	<b>Heterogene Effekte nach PGRMC1-Knockout in MCF-7.....</b>	<b>46</b>
3.4.1	In MCF-7/PGRMC1-KO-Zellen wird ER $\alpha$ exprimiert.....	46
3.4.2	PGRMC1 ist nicht essenziell bei der NET-vermittelten ER $\alpha$ -Phosphorylierung in MCF-7 .....	47
3.4.3	Auswirkung des <i>Knockouts</i> von PGRMC1 auf die Zellproliferation nach NET-Stimulation in MCF-7.....	48
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung der subzellulären Fraktionierung erfolgte in MCF-7-Zellen .....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Subzelluläre Fraktionierung konnte erfolgreich in MCF-7 etabliert werden .....	50
4.1.2	Detektion von Markerproteinen ist essenziell zur Analyse der subzellulären Fraktionierung .....	51
4.1.3	Etablierung zusätzlicher Waschschritte sind notwendig zur Auftrennung der Proteine .....	53
4.1.4	Kein Nachweis von ER $\alpha$ -pS118 nach subzellulärer Fraktionierung möglich .....	54
<b>4.2</b>	<b>Lokalisation von PGRMC1 und PHB2 in MCF-7 ist konstant nach NET-Stimulation ....</b>	<b>54</b>
4.2.1	PGRMC1 ist in der Membran-Fraktion von MCF-7 lokalisiert.....	54
4.2.2	PHB2 ist in der Membran-Fraktion von MCF-7 lokalisiert .....	56
<b>4.3</b>	<b>ER<math>\alpha</math> wird nach NET-Stimulation unabhängig von PGRMC1 an S118 phosphoryliert und transloziert in den Zellkern .....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Bedeutung der Phosphorylierung von ER $\alpha$ an S118 .....	57
4.3.2	Tetrahydroderivate von NET haben eine Östrogen-ähnliche Wirkung auf ER $\alpha$ .....	58
4.3.3	ER $\alpha$ transloziert aus der Membran-Fraktion in die nukleäre Fraktion nach NET-Stimulation.....	59
4.3.4	Interaktion zwischen ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 vor und nach NET-Stimulation in MCF-7 .....	60
<b>4.4</b>	<b><i>Knockout</i> von PGRMC1 führt nicht zu veränderter Proliferation von MCF-7 nach NET-Stimulation .....</b>	<b>62</b>
4.4.1	ER $\alpha$ wird nach NET-Stimulation unabhängig von PGRMC1 phosphoryliert.....	62
4.4.2	Stimulation mit NET führt unabhängig von PGRMC1 zu einer gesteigerten Proliferation in MCF-7.....	62
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b><i>Anhang</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b><i>Danksagung</i>.....</b>	<b>76</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Einteilung des Mammakarzinoms gemäß der Rezeptorausprägung in der Immunhistochemie .....</b>	<b>2</b>
<b>Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien .....</b>	<b>14</b>
<b>Tabelle 3: Liste der verwendeten Zelllinien .....</b>	<b>14</b>
<b>Tabelle 4: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Western Blot (WB) .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabelle 5: Liste der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits und Reagenzien .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsgegenstände.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabelle 7: Liste der verwendeten Medien und Lösungen in der Zellkultur .....</b>	<b>17</b>
<b>Tabelle 8: Liste und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.....</b>	<b>17</b>
<b>Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte und Software .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabelle 10: Reagenzien zur subzellulären Fraktionierung .....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle 11: Auswahl von potenziellen Markerproteinen zur Verifizierung subzellulärer Fraktionen mittels Western Blot .....</b>	<b>25</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1: Strukturmodelle von Östradiol und Progesteron</b> .....	3
<b>Abb. 2: Geschätzte kumulative Inzidenz für Brustkrebs pro 1.000 Frauen</b> .....	5
<b>Abb. 3: Vereinfacht dargestellte Struktur von PGRMC1</b> .....	6
<b>Abb. 4: Vereinfachte Struktur von ER<math>\alpha</math></b> .....	9
<b>Abb. 5: Aktivierung und Signaltransduktion durch den Östrogen-Rezeptor</b> .....	10
<b>Abb. 6: Western Blot Analyse von MCF-7 Ganzzell-Lysaten zur Prüfung der Expression von potenziellen Markerproteinen</b> .....	26
<b>Abb. 7: Western Blot Analyse subzellulärer Fraktionen von MCF-7</b> .....	27
<b>Abb. 8: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1</b> .....	29
<b>Abb. 9: Western Blot Analyse von MCF-7-Ganzzell-Lysaten nach Ablösen der adhärenen Zellen mittels Trypsin-EDTA oder Zellschaber</b> .....	31
<b>Abb. 10: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1</b> .....	32
<b>Abb. 11: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1 mit dem etablierten Antikörpercocktail zur Verifizierung der Fraktionen</b> .....	33
<b>Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7/PGRMC1</b> .....	35
<b>Abb. 13: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1</b> .....	36
<b>Abb. 14: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1</b> .....	37
<b>Abb. 15: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten von MCF-7/PGRMC1</b> .....	39
<b>Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7/PGRMC1</b> .....	41
<b>Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7/PGRMC1</b> .....	43
<b>Abb. 18: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1</b> .....	45
<b>Abb. 19: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten von MCF-7, MCF-7/PGRMC1-KO5, MCF-7/PGRMC1-KO6</b> .....	46
<b>Abb. 20: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten von MCF-7/PGRMC1-KO6</b> .....	47
<b>Abb. 21: Quantitative Auswertung einer Wachstumsanalyse nach Stimulation mit NET und DMSO-Kontrolle für 72h mittels MTT-Assay</b> .....	49
<b>Abb. 22: Methodik der subzellulären Fraktionierung von MCF-7/PGRMC1</b> .....	51
<b>Abb. 23: Strukturmodelle von Östradiol und Norethisteron</b> .....	58
<b>Abb. 24: Möglicher Interaktionsmechanismus zwischen ER<math>\alpha</math>, PGRMC1 und PHB2 vor bzw. nach NET-Stimulation in Brustkrebszellen</b> .....	61
<b>Abb. 25: Negativkontrolle der Immunfluoreszenzfärbung</b> .....	75

# 1 Einleitung

## 1.1 Brustkrebs

### 1.1.1 Epidemiologie von Brustkrebs

Mit über zwei Millionen Neudiagnosen im Jahr 2020 stellt Brustkrebs weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau dar [1]. Aufgrund von stetiger Forschung und neuer Therapieansätze hat sich die Prognose in den letzten Jahren bereits deutlich verbessert. Betrug die 5-Jahres-Überlebensrate in den USA in den 1970ern noch circa 75 %, so beträgt sie heute bereits etwa 90 % [2]. Doch trotz der großen Behandlungsfortschritte bleibt Brustkrebs auch heute noch die häufigste Krebstodesursache der Frau [3]. Zur Verbesserung von Therapie und Diagnose ist es daher unerlässlich, Entstehung und Progression von Brustkrebs detailliert zu erforschen und zu verstehen.

### 1.1.2 Pathologie und Klassifizierung von malignen Tumoren der Brust

Maligne Tumoren der Brust können anhand diverser Kriterien klassifiziert werden. Die verschiedenen Tumoren unterscheiden sich in ihrem Ursprungsgewebe, ihrer Histopathologie und ihrem makroskopischem Erscheinungsbild. Klinische Bedeutung besitzen zum einen die Einteilung nach der Histopathologie sowie zum anderen nach der Expression der Hormonrezeptoren.

Histopathologisch lassen sich dabei zwei Hauptgruppen von Tumoren unterscheiden. Den Hauptanteil bildet das „invasive Karzinom ohne speziellen Typ“, was früher auch als „invasiv duktales Karzinom ohne speziellen Typ“ bezeichnet wurde. Diese Tumoren gehen meist vom Milchgang aus und umfassen circa 75 % der diagnostizierten Fälle [4]. Davon zu unterscheiden sind „invasive Karzinome mit speziellem Typ“, welche zu einem Großteil von den „invasiv lobulären Karzinomen“ ausgemacht werden, diese gehen vom Milchdrüsenläppchen aus [4].

Therapeutisch und prognostisch ist allerdings besonders die Einteilung nach der Immunhistochemie relevant. Dabei wird der Tumor auf die Expression der Hormonrezeptoren Östrogen-Rezeptor (ER), Progesteron-Rezeptor (PR) sowie auf die Expression des *Human epidermal growth factor receptor-2* (HER-2) untersucht. Zur Anpassung der Therapie auf den histopathologischen Subtyp sowie auf die Rezeptor-Expression sollte bei allen Frauen eine histologische Befundsicherung und immunhistochemische Untersuchung mittels minimalinvasiver Biopsie vor Therapiebeginn erfolgen [5].

**Tabelle 1: Einteilung des Mammakarzinoms gemäß der Rezeptorausprägung in der Immunhistochemie**

Subtyp	Östrogen-Rezeptor	Progesteron-Rezeptor	HER-2	Proliferationsindex (Ki-67)	
Luminal A	+	und/oder	+	–	niedrig
Luminal B	+	und/oder	+	– und +	hoch hoch/niedrig
HER-2 angereichert	–	–	–	+	/
Triple-Negativ	–	–	–	–	/

Tumoren der Brust können anhand ihrer Rezeptorausprägung in verschiedene Subtypen eingeteilt werden. Eine Rezeptorexpression gilt als „gering positiv“, wenn  $\geq 1\%$  aller Zellen den jeweiligen Rezeptor exprimieren und als „positiv“, sobald  $\geq 10\%$  der Zellen den jeweiligen Rezeptor exprimieren [5-8].

Ein Tumor gilt dabei als ER- bzw. PR-gering-positiv, wenn  $\geq 1\%$  bzw. als ER- bzw. PR-positiv, wenn  $\geq 10\%$  aller untersuchten Tumorzellen den jeweiligen Rezeptor exprimieren [9]. Etwa 75 % der untersuchten Tumoren sind Hormonrezeptor-positiv, nur ein geringer Teil von circa 25 % gehört zu den Triple-Negativen Tumoren, die keine Hormonrezeptoren und kein HER-2 exprimieren [10, 11].

Therapie und Prognose werden weiterhin beeinflusst von dem Differenzierungsgrad des Tumors (*Grading*), der Ausbreitung (*Staging*) und dem Proliferationsindex (nach Ki67-Ausprägung) [5, 12]. Neben der operativen und der zytostatischen Therapie hat in den letzten Jahrzehnten insbesondere die zielgerichtete Blockade der Hormonrezeptoren und von HER-2 an Bedeutung gewonnen. So wird in der adjuvanten Therapie des ER-positiven Mammakarzinoms unter anderem Tamoxifen, ein selektiver-Östrogenrezeptor-Modulator (SERM), sowie Fulvestrant, ein Östrogenrezeptor-Antagonist, eingesetzt [5]. Auch Aromatase-Inhibitoren, welche die Synthese von Östradiol (E2) hemmen, sowie spezifische Antagonisten von HER-2, wie Trastuzumab, sind in der (neo-)adjuvanten Therapie verbreitet [5, 13]. Für Triple-Negative Tumoren steht dieser Therapie-Ansatz nicht zur Verfügung, diese Tumoren haben daher eine deutlich schlechtere Prognose [14]. Doch trotz der Fülle an verfügbaren Therapiemöglichkeiten entstehen auch in Hormonrezeptor-positiven Tumoren Resistenzen, sowohl gegen die Chemo- als auch gegen die endokrine Therapie [15-17]. Die Entstehung von Resistenzen ist noch in großen Teilen unklar und Gegenstand aktueller Forschung.

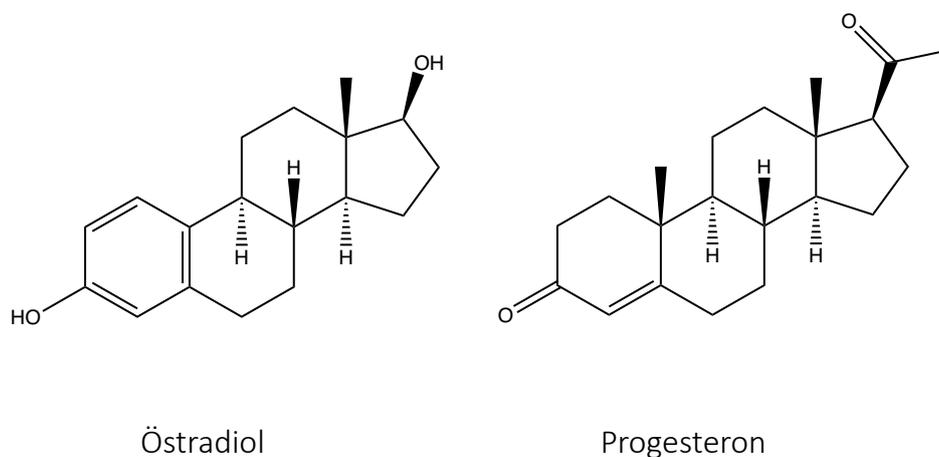
### 1.1.3 Hormonersatztherapie und Brustkrebs

In den letzten Jahren konnten einige Faktoren identifiziert werden, die das Risiko erhöhen an Brustkrebs zu erkranken. Neben einer familiären, genetischen Belastung wurde der Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone als wesentlicher Risikofaktor identifiziert. Dabei gehört insbesondere eine lange andauernde Einwirkung der weiblichen Sexualhormone zu den Risikofaktoren für Brustkrebs [18]. Dies tritt in Form einer frühen

Menarche, später Menopause, Nulliparität, später erster Schwangerschaft, sowie bei Adipositas auf [18, 19].

Aber auch die zusätzliche Einnahme medizinisch verordneter Hormonpräparate steht im Verdacht das Brustkrebsrisiko zu erhöhen [20-22]. Hormontherapie wird von Frauen in erster Linie im Rahmen der hormonellen Kontrazeption, sowie in der Menopause angewendet [23]. Eine Hormonersatztherapie (HET) wird in der Peri- und Postmenopause zur Reduktion klimakterischer Beschwerden verordnet [21]. Ziel ist dabei die Symptomkontrolle von Schweißausbrüchen und Hitzewellen, einen positiven Effekt hat die HET aber auch auf die Prophylaxe von Erkrankungen, welche durch niedrige Östrogen-Spiegel begünstigt werden, bspw. Osteoporose [21]. Klimakterische Symptome werden in erster Linie durch das Absinken des Östrogenspiegels verursacht, der Einsatz von exogenen Östrogenen ist daher am effizientesten zur Symptomkontrolle geeignet [24]. Nach der aktuellen Leitlinie zur HET in der Menopause sollte diese Therapieoption allen Frauen nach vorheriger Nutzen-Risiko-Abwägung angeboten werden [21, 25].

In der HET kommen dabei die physiologisch gebildeten Östrogen-derivate E2 und Östriol, sowie konjugierte equine Östrogene (CEE) und synthetische Östrogenester zum Einsatz [21]. Eine rein Östrogen-basierte Therapie (ET) führt jedoch zur Stimulation der Endometriumproliferation in der Gebärmutter und erhöht daher das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken [26]. Die Einnahme einer ET ist folglich nur bei bereits hysterektomierten Frauen indiziert. Für nicht-hysterektomierte Frauen empfiehlt die deutsche S3-Leitlinie eine Kombination aus einer Östrogen- und einer Gestagen-Therapie (EPT) [21]. Dafür werden als Gestagen-Komponente physiologisches Progesteron sowie Progestine, synthetische Progesteron- oder Nortestosteronderivate, verwendet. In der EPT eingenommen ist Progesteron den synthetischen Progestinen in der Risikoreduktion des Endometriumkarzinoms unterlegen, weshalb letztere bevorzugt verordnet werden [27].

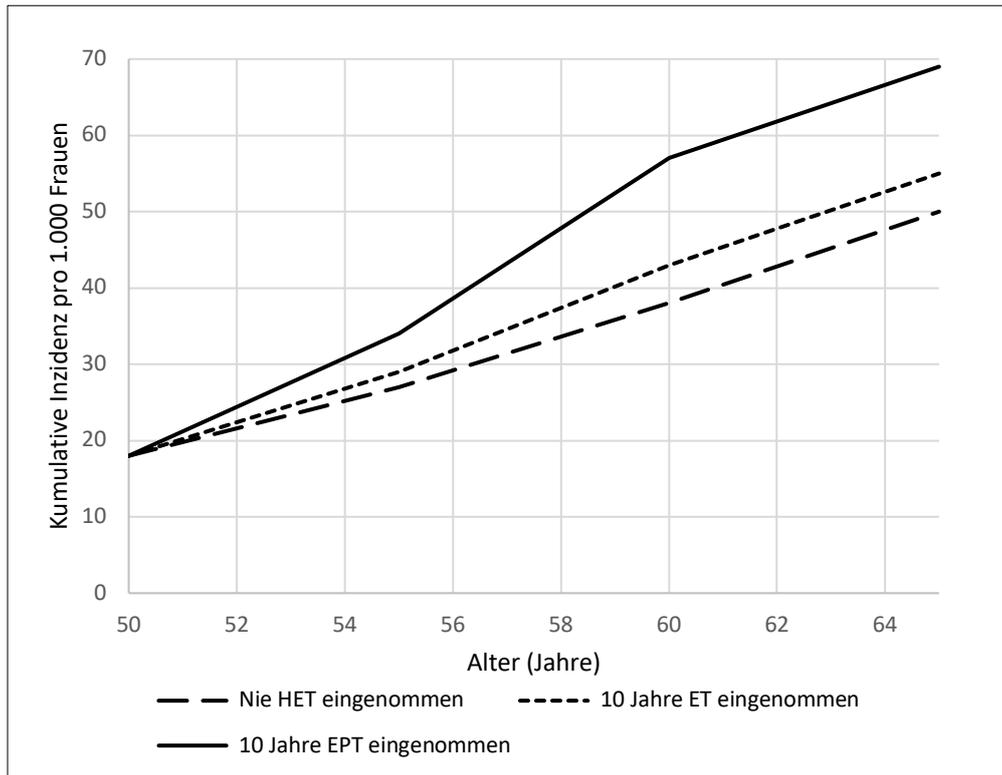


**Abb. 1: Strukturmodelle von Östradiol und Progesteron; erstellt nach Köhrle et al. [28].**

Da die HET unter dem Verdacht steht das Brustkrebsrisiko zu beeinflussen, untersuchten zahlreiche groß angelegte Studien, wie die *Women's Health Initiative* (WHI) oder die *Million Women Study* (MWS), den Zusammenhang zwischen der Einnahme einer HET und Brustkrebs [29-31]. Zwar waren Teile der Ergebnisse einzelner Studien nicht eindeutig oder zum Teil widersprüchlich [30]. Zusammengenommen führen sie aber zu der Annahme, dass eine HET das Brustkrebsrisiko beeinflussen kann [32].

Eine Therapie allein mit CEE bei hysterektomierten Frauen führte dabei in der WHI zu einer nicht signifikanten Senkung des Brustkrebsrisikos im Vergleich zu Placebo [30], dies konnte allerdings in anderen Beobachtungsstudien nicht bestätigt werden [31]. Mittlerweile haben Meta-Analysen jedoch gezeigt, dass die Einnahme jeder HET zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko führen kann [32]. Das Auftreten ER-positiver Tumoren ist stärker mit der Einnahme einer HET assoziiert als das Auftreten ER-negativer Tumoren [32]. Die Untersuchung der Risikobeeinflussung durch die verschiedenen Komponenten der HET führte zu dem eindeutigen Ergebnis, dass die Einnahme einer EPT zu einer höheren Steigerung des Brustkrebsrisikos führt als die Einnahme einer bloßen ET [32].

Die aktuelle Einnahme einer HET ging in der MWS nicht nur mit einem signifikant höheren Erkrankungsrisiko für Tumoren der Brust, sondern ebenfalls mit einer Erhöhung des Sterberisikos einher [31]. Je länger die HET, insbesondere die EPT, eingenommen wurde, desto höher war das Erkrankungsrisiko [20]. Im Falle eines kausalen Zusammenhangs wäre die EPT mit Progestin-Komponente in westlichen Ländern schätzungsweise für 1 Millionen von 20 Millionen Brustkrebserkrankungen in den Jahren 1990 bis 2019 verantwortlich [32]. Retrospektive Studien nehmen an, dass das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken 5 - 10 Jahre nach Ende der HET-Einnahme wieder absinkt [20].



**Abb. 2: Geschätzte kumulative Inzidenz für Brustkrebs pro 1.000 Frauen (in Industrienationen).** Vergleich der Inzidenz von Frauen, die niemals eine Hormonersatztherapie (HET), 10 Jahre eine Östrogen-basierte HET (ET) oder 10 Jahre eine Östrogen-Progestin-Therapie (EPT) eingenommen haben. Im Altersverlauf aufgetragen; erstellt nach Beral et al. [31].

Anfang der 2000er Jahre, nach Veröffentlichung der WHI und der MWS, gingen die hohen Verschreibungszahlen der HET zunächst stark zurück. Mittlerweile legen die europäischen Arzneimittelbehörden sehr strenge Indikationsstellungen zur Verschreibung der HET nahe [33]. Dennoch empfehlen auch heute viele internationale Leitlinien weiterhin einen eher großzügigen Einsatz, der kritisch hinterfragt werden sollte.

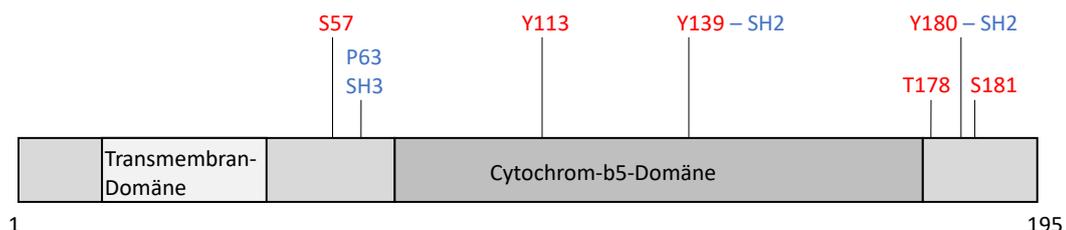
Auch bei der kombinierten oralen Kontrazeption werden Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparate, meist aus Ethinylestradiol und einem Gestagenderivat, verwendet. Eine Erhöhung des Mammakarzinom-Risikos durch die Einnahme kombinierter oraler Kontrazeptiva galt lange als unwahrscheinlich [34, 35]. Neuere Studien zeigen allerdings auch bei Frauen, welche eine gering dosierte kombinierte orale Kontrazeption einnahmen, ein gering erhöhtes Brustkrebsrisiko [22, 36].

## 1.2 Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1)

### 1.2.1 Struktur und Physiologie von PGRMC1

Zur Etablierung neuer Therapien und zur Erhöhung der Sicherheit von Frauen, die eine HET oder orale Kontrazeption einnehmen, ist es essenziell, die Mechanismen der Hormonwirkung auf zellulärer Ebene zu verstehen. Ein möglicher Ansatzpunkt ist dabei das multifunktionelle Protein *Progesterone Receptor Membrane Component 1* (PGRMC1). Das bereits 1996 in Ratten entdeckte Protein gehört zur Familie der Membran-assoziierten-Progesteron-Rezeptor (MAPR)-Proteine [37, 38]. Es wird physiologisch in einer Vielzahl von menschlichen Geweben exprimiert, unter anderem in der Niere, der Leber, dem Gehirn, der Lunge, der Brust und den Fortpflanzungsorganen [37, 39, 40]. PGRMC1 besteht aus 195 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 28 kDa, es wird unterteilt in eine N-terminale Transmembrandomäne, eine Cytochrom-b5-Domäne und zwei SH2- bzw. eine SH3-Zieldomäne [41].

Im Jahr 2015 konnte gezeigt werden, dass PGRMC1 mittels Bindung von Häm-Molekülen stabile Dimere bilden kann [41]. Die Dimerisierung von PGRMC1 führt dazu, dass PGRMC1 mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren kann [41, 42]. Aber auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, SUMOylierung und Ubiquitinierung regulieren die Aktivität und Lokalisation von PGRMC1 [38, 43-45]. Modifikationen und Interaktionen finden in erster Linie durch differenzielle Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin-181 (S181), Tyrosin-113 (Y113), Serin-57 (S57) und Tyrosin-180 (Y180) statt [43, 46].



**Abb. 3: Vereinfacht dargestellte Struktur von PGRMC1, rot hervorgehobene Aminosäuren stellen wichtige Phosphorylierungsstellen dar, blau hervorgehobene Aminosäuren SH2- bzw. SH3-Zieldomänen-Sequenzen. Erstellt nach Cahill et al. [43]. Serin (S), Tyrosin (Y), Prolin (P).**

PGRMC1 interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen nach Dimerisierung. So interagiert PGRMC1 nach Bindung von Häm und anschließender Dimerisierung mit Cytochrom-P450-Proteinen [47]. So kann PGRMC1 ebenfalls die Aktivität des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) beeinflussen [48]. PGRMC1 interagiert mit Proteinen des Mevalonat-Stoffwechsels und beeinflusst so die Synthese von Cholesterin [49]. Ebenso kann PGRMC1 über die Steuerung der Häm-Abgabe den mitochondrialen Eisenstoffwechsel regulieren [50].

Auch in Zellen der weiblichen Geschlechtsorgane wird PGRMC1 exprimiert, dort spielt es eine mutmaßliche Rolle in der Vermittlung der Hormonwirkung auf die Zelle [51]. So vermittelt PGRMC1 in Granulosa-Zellen die antiapoptotische Wirkung von Progesteron [51]. Allerdings konnte bisher keine direkte Bindung von Progesteron an PGRMC1 nachgewiesen werden [52, 53]. Vielmehr scheinen Interaktionen mit verschiedenen Proteinen vorzuliegen, die Effekte einer Progesteron-Einwirkung vermitteln [54-58].

Die Dimerisierung sowie einige posttranslationale Modifikationen scheinen auch einen Einfluss auf die Lokalisation von PGRMC1 zu haben. PGRMC1 wurde in der kultivierten Brustkrebszelllinie MCF-7 im endoplasmatischen Retikulum beschrieben [59]. In spontan immortalisierten Granulosa-Zellen konnten SUMOyliertes PGRMC1 und PGRMC1-Dimere im Kern nachgewiesen werden [44], auch in HEK293-Zellen konnte vermutlich höhermolekulares PGRMC1 im Kern gezeigt werden [60]. Ebenso wurde in den Nucleoli von bovinen Granulosa-Zellen sowie im Extrazellulärraum von Lungentumoren bereits PGRMC1 beschrieben [45, 61].

### 1.2.2 Bedeutung von PGRMC1 in Brustkrebs

Eine erhöhte PGRMC1-Expression wurde in diversen Tumoren festgestellt [17, 62, 63]. Dem Protein wird bei einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen in der Zelle eine regulatorische Funktion zugeschrieben. So nimmt es sowohl Einfluss auf die Tumorphathologie [17] als auch auf den Metabolismus diverser Medikamente wie Zytostatika in der (neo)-adjuvanten Chemotherapie [47]. Auch die Fähigkeit zur verankerungsfreien Proliferation auf Weich-Agar ist in der PGRMC1-überexprimierenden Zelllinie signifikant erhöht [64]. PGRMC1 scheint daher eine wesentliche Rolle in der Regulation maligner Zellen zu spielen. Unter anderem beeinflusst PGRMC1 die Steroidhormon- sowie die Cholesterolsynthese und den Cholesterinstoffwechsel in Tumorzellen [49]. Hohe Spiegel an Cholesterin wurden schon häufig mit der Entstehung und dem Progress von Tumoren assoziiert, auch Adipositas stellt daher einen Risikofaktor für die Entwicklung von Brustkrebs dar [19, 65]. Erhöhte Cholesterin-Level wirken sich auf die Membranstabilität und auf die Bildung von *Lipid Rafts* aus [66], was unter anderem die proliferationsfördernden, onkogenen Signalwege von HER-2 und EGFR beeinflussen kann [67, 68].

Eine Assoziation zwischen der Expression von PGRMC1 und Brustkrebs wurde bereits vielfach beschrieben. Tumoren der Brust und der weiblichen Reproduktionsorgane exprimieren vermehrt PGRMC1, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [17, 69]. Besonders in ER-positivem Tumorgewebe wurde eine stark erhöhte PGRMC1-Phosphorylierung, sowie Zusammenhänge zu einer stärkeren Tumorpheriferation festgestellt [49, 70]. Doch auch Hormonrezeptor-negative Tumoren exprimieren vermehrt PGRMC1, was einen neuen therapeutischen Angriffspunkt darstellen könnte [71, 72]. In der Triple-Negativen Zelllinie MDA-MB-468 führt der *Knockdown* von PGRMC1 zu einer

verminderten Proliferation [64]. Die Depletion von PGRMC1 in Triple-Negativen Tumoren führt außerdem zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zytostatika und zu verringerter Zellproliferation [73].

Verschiedene zelluläre Mechanismen scheinen im Zusammenhang mit der PGRMC1-vermittelten Steigerung der Proliferation zu stehen. PGRMC1 vermittelt eine antiapoptotische Wirkung in Brustkrebszellen, was zu einer verstärkten Proliferation beiträgt [51, 74]. Dies wird unter anderem über die Interaktion zwischen PGRMC1 und EGFR, einem wichtigen Protein der Pathophysiologie von Brustkrebs, vermittelt. Eine verringerte PGRMC1-Expression vermindert die Phosphorylierung von EGFR nach Stimulation durch seinen Liganden [41, 64]. Auch die Phosphorylierung von nachfolgenden Kinasen im EGFR-Signalweg korreliert positiv mit der PGRMC1-Expression [41].

Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen Einfluss von Progestinen wie Norethisteron (NET) auf die Aktivierung von PGRMC1 [75]. Die PGRMC1-überexprimierenden Brustkrebszelllinien MCF-7 und T-47D reagieren mit verstärktem Wachstum auf die Stimulation mit bestimmten Progestinen [76, 77]. Zur Entfaltung der proliferativen Wirkung von PGRMC1 scheint die Phosphorylierung des Proteins eine zentrale Rolle zu spielen. So führt die Stimulation der PGRMC1-überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7/PGRMC1 mit NET zu einer Phosphorylierung von PGRMC1 an S181 und zur erhöhten Proliferation der Zellen [43]. Im Gegensatz dazu reagieren PGRMC1-überexprimierende MCF-7, die ein phosphorylierungsdefizientes PGRMC1-Protein mit Aminosäure-Austausch von S181 zu Alanin exprimieren, nicht verstärkt auf die Stimulation mit NET [76].

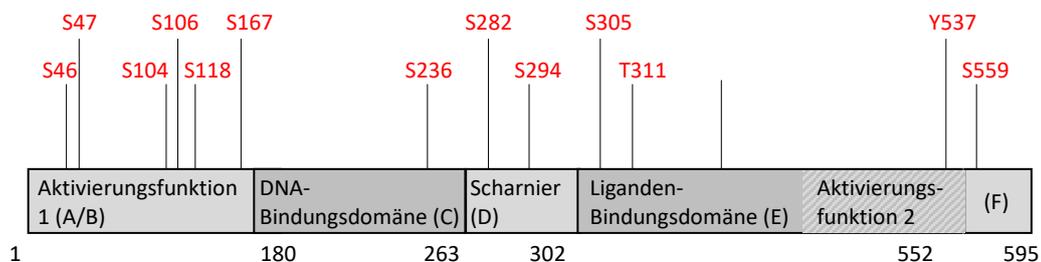
### 1.3 Östrogen-Rezeptor $\alpha$ (ER $\alpha$ )

#### 1.3.1 Struktur und Physiologie von ER $\alpha$

Östrogen-Rezeptoren gehören zur Gruppe der nukleären Hormonrezeptoren und sind Hormon-regulierte Transkriptionsfaktoren [78]. Die Gruppe der Östrogen-Rezeptoren lässt sich in zwei Untergruppen teilen: Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und Östrogen-Rezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) [79]. ER $\alpha$  liegt vorwiegend in den weiblichen Geschlechtsorganen wie Uterus und Brust vor, wird aber auch in weiteren Organen wie Prostata, Gehirn, Leber, Knochen und Fettgewebe beschrieben [79]. Dort ist er einer der wesentlichen Vermittler der Östrogen-Wirkung. Zu dessen Hauptwirkungen zählen die Ausbildung des weiblichen Phänotyps, die Regulation des Menstruationszyklus, die Mineralisierung der Knochen sowie eine Regulation des Fettgewebes. Lässt die Östrogenproduktion in der Menopause nach, folgen klimakterische Beschwerden [24]. ER $\beta$  greift regulierend in die ER $\alpha$ -Aktivität ein und ist in diversen Organen wie Ovarien, Prostata, Hoden, Lunge und Milz exprimiert [79, 80].

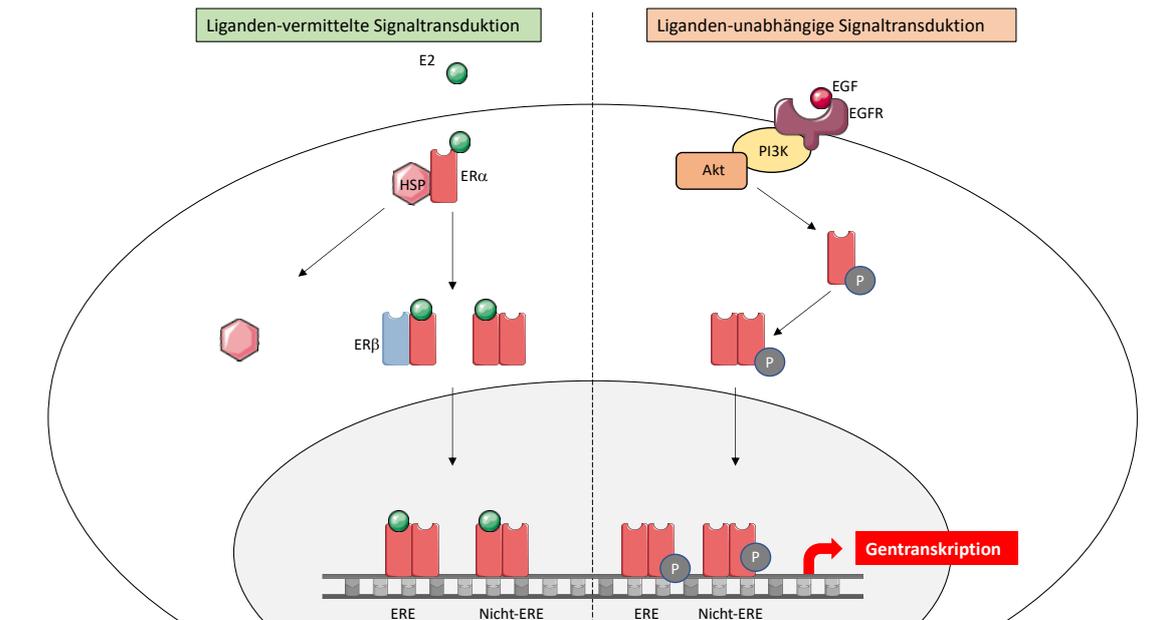
ER $\alpha$  liegt intrazellulär inaktiv gebunden an Hitzeschockproteine vor [81]. Der Rezeptor hat eine kurze Lebensdauer von 4 - 5 h und wird kontinuierlich nach Ubiquitinierung degradiert

[82]. ER $\alpha$  besteht aus 595 Aminosäuren, welche sich in sechs Domänen unterteilen lassen: die N-terminale Aktivierungsfunktion-1 (AF-1) führt zu einer Liganden-unabhängigen Rezeptoraktivierung und interagiert mit der Aktivierungsfunktion-2 (AF-2), an welche unter anderem Ko-Regulatoren von ER $\alpha$  binden [83-85]. Die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) hingegen führt zur Liganden-abhängigen Aktivierung. Neben den beiden AFs und der LBD hat auch die DNA-Bindungsdomäne (DBD) Relevanz bei der Rezeptor-Aktivierung und Funktion [84]. In der AF-1 befinden sich diverse Phosphorylierungsstellen wie auch die beiden sehr gut untersuchten Aminosäuren Serin-118 (S118) und Serin-167 (S167) [86]. Der Rezeptor unterliegt einer Reihe von posttranslationalen Modifikationen, die spezifische regulatorische Folgen haben. So wird die negative Rückkopplung durch E2, welche zur Degradierung von ER $\alpha$  führt, mittels Ubiquitinierung vermittelt [82]. Palmitoylierung beeinflusst die Dimerisierung des Rezeptors, das Interaktionsverhalten sowie die Phosphorylierung an S118 [87, 88].



**Abb. 4: Vereinfachte Struktur von ER $\alpha$** , rot hervorgehobene Aminosäuren stellen Phosphorylierungsstellen dar. Erstellt nach Kumar et al. [84]. Serin (S), Threonin (T), Tyrosin (Y), Deoxyribonucleic acid (DNA).

Zur Entfaltung seiner Wirkung muss ER $\alpha$  zunächst aktiviert werden, was über zwei verschiedene Wege erfolgen kann. Die klassische Aktivierung erfolgt durch intrazelluläre Bindung von Steroidhormonen an den Rezeptor. Der endogene Ligand E2 bindet an die LBD, aktiviert so ER $\alpha$ , welcher vom Hitzeschockprotein dissoziiert. Nachdem ER $\alpha$  mit einem weiteren ER ein Dimer gebildet hat, transloziert dieses in den Nukleus [89]. Dort bindet ER $\alpha$  mit seiner DBD an *Estrogen-Response-Elements* (EREs) bestimmter Östrogen-regulierter Gene und initiiert nach der Rekrutierung von Ko-Aktivatoren deren Transkription [89, 90]. Dieser Mechanismus wird auch als „klassischer Weg“ bezeichnet. Neben der Bindung an EREs kann ER $\alpha$  auch regulierend in andere genomische Prozesse eingreifen. Im Kern reguliert ER $\alpha$  zusätzlich Transkriptionsprozesse, indem er selbst als Ko-Aktivator fungiert und an andere Transkriptionsfaktoren bindet [91, 92].



**Abb. 5: Aktivierung und Signaltransduktion durch den Östrogen-Rezeptor.** Die Aktivierung des Östrogen-Rezeptors  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) erfolgt über die Bindung seines Liganden Östradiol ( $E2$ ), was zu Dimerisierung des Rezeptors führt. Alternativ kann  $ER\alpha$  auch von Kinasen des Epidermal Growth Factor (Rezeptor) ( $EGF(R)$ ) -Signalwegs phosphoryliert und konsekutiv aktiviert werden. Wenn  $ER\alpha$  aktiviert ist, transloziert er in den Zellkern, wo er an Estrogen Response Elements ( $EREs$ ) bindet, oder über Ko-Aktivatoren mit Nicht- $EREs$  interagiert. Im Zellkern vermittelt  $ER\alpha$  die Transkription bestimmter Gene und kann so proliferationsfördernd wirken. Erstellt nach Khan et al. und Yager et al. [93, 94]. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Kinase ( $PI3K$ ), Proteinkinase B ( $Akt$ ), Östrogen-Rezeptor  $\beta$  ( $ER\beta$ ), Phosphatgruppe ( $p$ ), Hitzeschockprotein ( $HSP$ ).

Neben der Liganden-abhängigen Aktivierung führt auch die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren zu einer konsekutiven Aktivierung von  $ER\alpha$  [95]. Diese wird durch aktivierende Signalwege induziert und von verschiedenen Kinasen wie der *mitogen-activated-protein*-Kinase ( $MAPK$ ) durchgeführt [79, 91, 96]. Die am besten untersuchte Phosphorylierungsstelle ist S118, welche nach Liganden-Bindung sowie unter anderem Liganden-unabhängig von der  $MAPK$  phosphoryliert wird [96]. Die Phosphorylierung von  $ER\alpha$  an S118 führt zu einer Aktivierung des Rezeptors und folglich unter anderem zu einer Zunahme der  $E2$ -induzierten Aktivität [97]. So kann  $ER\alpha$  sowohl über die klassische Bindung an  $EREs$  als auch über alternative Signalwege wie der Regulation von Nicht- $EREs$  aktiv sein [93].

### 1.3.2 Bedeutung von $ER\alpha$ in Brustkrebs und Zusammenhang zu $PGRMC1$

Ein großer Anteil von circa 70 % der malignen Tumoren der Brust exprimieren  $ER\alpha$  und proliferieren durch Hormonstimulation [98].  $ER\alpha$  ist für einen Großteil der östrogenen Wirkung in gesundem, aber auch in maligne verändertem Brustgewebe verantwortlich [99]. Eine langandauernde Östrogenwirkung stellt einen Risikofaktor für Brustkrebs dar, Ursache könnte unter anderem die Hochregulierung von bereitgestelltem  $ER\alpha$  nach lange andauernder  $E2$ -Stimulation darstellen [100]. Dabei erhöht  $E2$  über  $ER\alpha$  in Brustkrebszellen die Zellproliferation und senkt die Apoptoserate, was zu Gewebewachstum und

Tumorprogress führt [94]. Auch die Regulation der ER $\alpha$ -Aktivität selber kann gestört sein und zu einer erhöhten Proliferation führen [94].

Die Bedeutung von ER $\alpha$  wird besonders seit dem Einsatz von Anti-Östrogenen in Form von SERMs, Aromatase-Inhibitoren oder Östrogen-Rezeptor-Antagonisten bei Rezeptor-positivem Brustkrebs deutlich: hier senkt die endokrine Therapie mittels Blockade der ER $\alpha$ -Wirkung die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und des Versterbens [101, 102]. Ein positiver ER $\alpha$ -Status von Brusttumoren korreliert dementsprechend mit einem guten Therapieansprechen und einer guten Prognose [70]. Auch zeigen ER $\alpha$ -positive Tumoren ein geringeres Metastasierungspotential, ein günstigeres Metastasierungsmuster sowie eine geringere Invasivität [70, 103].

Da der phosphorylierte ER $\alpha$  auch ohne Liganden-Bindung aktiv ist, ist der Phosphorylierungsstatus von ER $\alpha$  in Brustkrebszellen von hoher Relevanz. Wird ER $\alpha$  vermehrt durch Kinasen des EGFR-Signalwegs phosphoryliert, kann dies eine verstärkte Proliferation und Resistenz gegen die anti-östrogene Therapie bedeuten [91]. In klinischen Studien wurde allerdings in Tumoren, die ein hohes Phosphorylierungsniveau von ER $\alpha$  an S118 zeigen, auch ein verbessertes Ansprechen auf eine Therapie mit dem SERM Tamoxifen beobachtet [104].

Auch PGRMC1 steht im Zusammenhang mit der ER $\alpha$ -Expression und -Aktivierung. In PGRMC1-überexprimierenden Brustkrebszellen wurde eine verstärkte ER $\alpha$ -Expression beobachtet, auch der Phosphorylierungsstatus von ER $\alpha$  an S118 war in diesen Zellen erhöht [49]. Der *Knockdown* von PGRMC1 führt so auch zu einer Verminderung der ER $\alpha$ -Expression bereits auf mRNA-Ebene [49]. Die zellulären Konsequenzen dieser direkten oder indirekten Interaktion sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht.

## 1.4 Prohibitin 1 und Prohibitin 2

### 1.4.1 Physiologie der Prohibitine

Zur genauen und angepassten Steuerung von Zellfunktionen sowie Zellwachstum sind regulatorische Proteine unverzichtbar. Die hochkonservierten Prohibitine sind eine Proteinfamilie, die einen stark regulierenden Einfluss auf die Zelle hat. Zu der Gruppe der Prohibitine gehören unter anderem Prohibitin 1 (PHB1) und Prohibitin 2 (PHB2) [105]. PHB1 wurde zunächst als Regulator der Zellproliferation beschrieben [106]. Das pleiotroph aktive PHB2 ist bereits bei seiner Entdeckung in Brustkrebszellen als Inhibitor der ER $\alpha$ -Aktivität beschrieben worden, so wird es auch als *Repressor of estrogen receptor activity* (REA) bezeichnet [78, 107].

Die Lokalisation der Prohibitine bedingt die möglichen Interaktionspartner und damit auch die Funktionen in der Zellregulation. PHB1 und PHB2 wurden in den Mitochondrien als Teil eines Proteinkomplexes beschrieben [107]. Dort nehmen Prohibitine eine Schlüsselrolle in der Regulation mitochondrialer Funktionen ein. So vermitteln sie antiapoptotische Effekte, regulieren die Seneszenz der Zelle und beeinflussen die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette [108, 109].

#### 1.4.2 Bedeutung der Prohibitine in Brustkrebs

In Brustkrebszellen ist die Regulation der ER $\alpha$ -Aktivierung im Vergleich zu normalem Brustgewebe verändert. Welche intrazellulären Signalwege dabei ablaufen ist allerdings noch nicht im Detail bekannt. Eine Vielzahl von Proteinen wie PGRMC1 scheint einen Einfluss auf die Regulation von ER $\alpha$  zu haben, obwohl diese Proteine häufig nicht direkt nachweisbar mit ER $\alpha$  interagieren.

Ein möglicher Ansatzpunkt ist die Regulation der ER $\alpha$ -Aktivität durch PHB2. Das regulatorische Protein PHB2 inhibiert nicht nur in normalen Brustzellen die ER $\alpha$ -Aktivität, es verstärkt in Brustkrebszellen auch den inhibitorischen Effekt von Anti-Östrogenen [78]. Dabei beeinflusst PHB2 insbesondere die Interaktion von ER $\alpha$  mit Ko-Aktivatoren, nicht jedoch die DNA-Bindung von ER $\alpha$  [78]. Doch auch PHB1 kann als Ko-Repressor die Aktivität von ER $\alpha$  regulieren [105]. Vorarbeiten lassen vermuten, dass PGRMC1 in Brustkrebszellen über die Interaktion mit PHB1 und PHB2 Einfluss auf die ER $\alpha$ -Aktivität nimmt [110-112]. PHBs und PGRMC1 interagieren dabei in Proteinkomplexen abhängig von der Phosphorylierung an S181 [112, 113]. Welche zellulären Signalwege diesem Einfluss zugrunde liegen, ist bisher noch weitestgehend unbekannt.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von PGRMC1 und PHB2 auf die ER $\alpha$ -Aktivierung nach NET-Stimulation und die folgenden zellulären Konsequenzen in Brustkrebszellen.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der proliferative Einfluss von PGRMC1 auf Brustkrebszellen in engem Zusammenhang zu der ER $\alpha$ -Expression der Zelle steht. Um das Zusammenspiel von PGRMC1 und ER $\alpha$  zu verstehen, soll daher die Lokalisation beider Proteine bestimmt werden. Dabei soll auch der Einfluss der Hormonstimulation mit dem Progestin NET bestimmt werden, welches im Verdacht steht, das Brustkrebsrisiko zu erhöhen. Um die Lokalisation der Proteine in der Zelle eingrenzen und eine quantitative Aussage zu einer möglichen Proteintranslokation treffen zu können, soll in dieser Arbeit zunächst die Methode der subzellulären Fraktionierung der ER $\alpha$ -positiven Brustkrebszelllinie MCF-7 etabliert werden. Dazu soll das Protokoll des Herstellers nach den Zwecken der Arbeit adaptiert und ein Antikörper-Gemisch zur Verifizierung der Kompartimente etabliert werden.

Da eine mögliche Interaktion der Proteine nur in räumlicher Nähe möglich ist, wird die Lokalisation der Proteine vor und nach NET-Stimulation mittels subzellulärer Fraktionierung und anschließendem Western Blot untersucht. Möglicher Interaktionspartner von PGRMC1 ist das regulatorische Protein PHB2. Es wird daher ebenfalls der Einfluss von PGRMC1 auf die Interaktion zwischen PHB2 und ER $\alpha$  anhand der Lokalisation untersucht. Anschließend soll der direkte Einfluss einer NET-Stimulation auf die Aktivierung von ER $\alpha$  anhand der Analyse der differentiellen Phosphorylierung der Aminosäure S118 im Zeitverlauf untersucht werden.

Vorarbeiten konnten zeigen, dass der transiente *Knockdown* von PGRMC1 einen hemmenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Brustkrebszelllinien hat. Um die Folgen eines dauerhaften PGRMC1-Verlustes zu verstehen, sollen zwei PGRMC1-defiziente *Knockout* (KO)-Zelllinien untersucht werden. Dabei soll erneut die ER $\alpha$ -Aktivierung analysiert werden, sowie das Wachstumsverhalten der Zellen nach Stimulation mit NET.

## 2 Material & Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Quelle</b>
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glycin	Merck KGaA
Isopropanol (2-Propranol)	Merck KGaA
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich
Norethisteron (NET)	Sigma-Aldrich
Östradiol (E2)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd 4 % (PFA)	Sigma-Aldrich
Thiazolyl-Blau-Tetrazolium-Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck KGaA
Triton X-100	Merck KGaA
Tween 20	Sigma-Aldrich

#### 2.1.2 Zelllinien

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>	<b>Quelle</b>
MCF-7	Mammakarzinom-Zelllinie, Luminal A-Subtyp	[114]	DSMZ
MCF-7/PGRMC1	Hämagglutinin (HA)-gebundene PGRMC1-überexprimierende MCF-7-Zellen (transfiziert mit pcDNA3.1 Vektor)	[49, 76, 115]	Generiert aus MCF-7 (Quelle s. o.)
MCF-7/PGRMC1-KO	PGRMC1-Knockout MCF-7-Zellen (transfiziert mit PGRMC1-CRISPR/Cas9-KO-Plasmid)	[112]	Generiert aus MCF-7 (Quelle s. o.)

### 2.1.3 Antikörper

**Tabelle 4: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Western Blot (WB)**

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verwendung/ Verdünnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Quelle</b>
<b>Primärantikörper</b>				
Anti- $\beta$ -Actin	Maus	WB 1:1000	sc-47778	Santa Cruz
Anti-CALR	Maus	WB 1:1000	sc-166837	Santa Cruz
Anti-CK19	Maus	WB 1:500	sc-6278	Santa Cruz
Anti-E-Cadherin	Maus	WB 1:500	Sc-21791	Santa Cruz
Anti-EGFR	Kaninchen	WB 1:1000	D38B1	Cell Signaling
Anti-EpCAM	Kaninchen	WB 1:1000	GTX61060	GeneTex
Anti-EpCAM Alexa Fluor™ 488	Maus	WB 1:1000	VU1D9	Cell Signaling
Anti-ER $\alpha$	Kaninchen	IF 1:400 WB 1:1000	D8H8	Cell Signaling
Anti-ER $\alpha$ -pS118	Maus	IF 1:800 WB 1:1000	16J4	Cell Signaling
Anti-GAPDH	Maus	WB 1:1000	sc-47724	Santa Cruz
Anti-H3	Kaninchen	WB 1:1000	D1H2	Cell Signaling
Anti-Ki67	Kaninchen	WB 1:1000	D3B5	Cell Signaling
Anti-PGRMC1	Kaninchen	IF WB	D6M5M	Cell Signaling
Anti-PGRMC1-pS181	Maus	IF 1:100	3G11A2 (nicht kommerziell erhältlich) [17]	EMBL, Monoclonal Antibody Core Facility
Anti-PHB2	Kaninchen	WB 1:1000	E1Z5A	Cell Signaling
Anti-SIRT1	Kaninchen	WB 1:400	ab-13749	Abcam
Isotyp IgG	Kaninchen	IF 1:100	DA1E (3900)	Cell Signaling
Normalserum	Maus	IF 1:800	sc-45051	Santa Cruz

<b>Sekundärantikörper</b>				
Anti-Mouse IgG HRP-linked	Pferd	WB 1:2000	7076	Cell Signaling
Anti-Rabbit IgG HRP-linked	Ziege	WB 1:2000	7074	Cell Signaling
Anti-Mouse Alexa Fluor™ 594	Esel	IF 1:200	A21203	Invitrogen
Anti-Rabbit Alexa Fluor™ 488	Esel	IF 1:200	A21206	Invitrogen

#### 2.1.4 Kits und kommerziell erhältliche Reagenzien

**Tabelle 5: Liste der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits und Reagenzien**

<b>Kit</b>	<b>Quelle</b>
Amersham ECL Western Blotting Detecting Reagent	GE Healthcare Life Sciences
cOmplete™ ULTRA tablets (Protease-Inhibitor)	Roche Diagnostics
DAKO® Antibody Diluent	Dako Corporation
DAKO® Fluorescence Mounting Medium	Dako Corporation
DAKO® Protein Block serumfree	Dako Corporation
Laemmli-Puffer 4 x	Bio-Rad
PhosSTOP™ (Phosphatase-Inhibitor)	Roche Diagnostics
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Precision Plus Protein All Blue Prestained Standard	Bio-Rad
Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells	Thermo Fisher Scientific

#### 2.1.5 Verbrauchsgegenstände

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsgegenstände**

<b>Gegenstand</b>	<b>Quelle</b>
Cellstar® Zellkulturplatten (6, 96)	Greiner Bio-One
Filter Top Zellkultur Flaschen (T-25, T-75, T-175)	Greiner Bio-One
Immun-Blot® Low Fluorescence PVDF Membrane	Bio-Rad
Immun-Blot® PVDF Membran	Bio-Rad
Kammerobjektträger, 8-Kammern	Sarstedt
Mini-PROTEAN® Precast Gels	Bio-Rad
Western Blotting Filter Papier	Bio-Rad
Zellschaber	Greiner Bio-One

## 2.1.6 Medien & Lösungen für Zellkulturen

**Tabelle 7: Liste der verwendeten Medien und Lösungen in der Zellkultur**

<b>Medium/Lösung</b>	<b>Quelle</b>
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälber Serum (FCS)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälber Serum (FCS), Aktivkohle behandelt	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
HEPES 1M Puffer Lösung	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640 Medium, L-Glutamin	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640 Medium, L-Glutamin, kein Phenol-rot	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA 0,5 %	Gibco™, Thermo Fisher Scientific

## 2.1.7 Lösungen & Puffer

**Tabelle 8: Liste und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen**

<b>Lösung/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Block-Lösung für Western Blot	5 % Magermilchpulver in TBS-T
Probenpuffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	4 x Laemmli-Puffer
RIPA-Puffer	10 % 2-Mercaptoethanol
	50mM TRIS
	150mM NaCl
	1 % NP-40
	0,5 % Sodium Deoxycholate
	0,1 % SDS
	pH 7.6
	(vor der Benutzung mit Protease-Inhibitor und Phosphatase-Inhibitor versetzt)
SDS-Laufpuffer	25mM TRIS
	192mM Glycin
	0,1 % SDS
	pH 8.3
TBS-T	20mM TRIS
	150mM NaCl
	0,1 % Tween20
	pH 7.6
Western-Blotting Puffer	25mM TRIS
	200mM Glycin
	20 % Methanol

## 2.1.8 Geräte & Software

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte und Software**

<b>Gerät/Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
Axiocam 503 Mono Kamera	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
ChemDraw	PerkinElmer	Waltham, USA
EndNote™	Clarivate Analytics	Philadelphia, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
GraphPad PRISM	GraphPad Software Inc.	San Diego, USA
HERACELL 150i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Scientific	Waltham, USA
HERAEUS Megafuge 16 R Zentrifuge	Thermo Scientific	Waltham, USA
Image J	Public domain	
Imaging System ChemiDoc™ MP	Bio-Rad	Hercules, USA
Kelvitron® t Inkubator	Heraeus	Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM IRB	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Power Pac 300 Elektrophorese	Bio-Rad	Hercules, USA
Spark® Tecan	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Sprout Biozym Tischzentrifuge	Heathrow Scientific	Illinois, USA
Thermoshaker	VWR International	Radnor, USA
VV3 Vortexer	VWR International	Radnor, USA
Zen	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland

## 2.2 Zellbiologische Methodik

### 2.2.1 Kultivierung von Brustkrebszelllinien

Die humane Brustkrebszelllinie MCF-7, die stabil transfizierte Zelllinie MCF-7/PGRMC1 [49, 115], sowie die PGRMC1-defizienten Zelllinien MCF-7/PGRMC1-KO5 und MCF-7/PGRMC1-KO6 [112] wurden in RPMI 1640 Medium mit 25 mMol HEPES Puffer, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (im Folgenden als „Kulturmedium“ bezeichnet) in Zellkulturflaschen kultiviert und in einem feuchten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei circa 80 % Konfluenz wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit 0,05 % Trypsin-EDTA 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und 5 min bei 1100 RPM zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und ein angemessener Anteil der Zellen in einer frischen Zellkulturflasche ausgesät.

### 2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zelllinien wurde nach Erreichen von 80 % Konfluenz das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin-EDTA 5 min bei 37 °C inkubiert, bis sie komplett abgelöst waren, in frischem Kulturmedium resuspendiert und 5 min bei 1100 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium mit 5 % DMSO als Gefrierschutz resuspendiert. Etwa  $2 \times 10^6$  Zellen/ml Einfriermedium wurden in ein Kryo-Gefäß überführt und in einer, mit Isopropanol gefüllten, Gefrierhilfe bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurde das Kryo-Gefäß zur Langzeitlagerung bei -152 °C in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen nach Lagerung in flüssigem Stickstoff rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden sie in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer frischen Zellkulturflasche ausgesät.

### 2.2.3 Zellen ernten zur Analyse mittels Western Blot

Zur weiteren Analyse wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 % zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,05 % Trypsin-EDTA 5 min bei 37 °C inkubiert, bis sie komplett abgelöst waren. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und 5 min bei 1100 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in PBS gewaschen und erneut 5 min bei 1100 RPM und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde im Anschluss zur weiteren Analyse zügig verwendet oder zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

#### 2.2.4 Zellen ernten zur Anfertigung der subzellulären Fraktionierung und Untersuchung der Zeitkinetik von Phosphorylierungen

Zur Analyse mittels subzellulärer Fraktionierung und zur Anfertigung von Analysen der Zeitkinetik wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 % zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit dem Zellschaber abgekratzt. Die Zellen wurden in eiskaltem PBS resuspendiert und 5 min bei 1100 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in eiskaltem PBS resuspendiert und 5 min bei 1100 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde entweder im Anschluss zur weiteren Analyse zügig verwendet oder zur Lagerung bei - 80 °C eingefroren.

#### 2.2.5 Zellen synchronisieren

Zur Synchronisierung der Wachstumsphasen der Zellen wurden die Zellen zunächst, wie in 2.2.1 beschrieben, kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch RPMI (ohne Phenol-Rot), 10 % Aktivkohle-behandeltes FCS, 25mMol HEPES Puffer und 1 % Penicillin/Streptomycin (im Folgenden als „hormonfreies Medium“ bezeichnet) ersetzt. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, durch Kulturmedium ersetzt und vor der weiteren Verwendung erneut 24 h inkubiert.

#### 2.2.6 Zellen stimulieren

Zur Stimulation wurden die Zellen zunächst in Kulturmedium ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit hormonfreiem Medium für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch das Stimulationsmedium ersetzt. Zur Stimulation wurden wie jeweils angegeben 10<sup>-6</sup> M NET oder 10<sup>-8</sup> M E2 in hormonfreiem Medium verdünnt, zur Kontrolle wurde dementsprechend 10<sup>-6</sup> M bzw. 10<sup>-8</sup> M DMSO in hormonfreiem Medium verwendet.

### 2.3 Protein-biochemische Methodik

#### 2.3.1 Subzelluläre Fraktionierung von kultivierten Brustkrebszelllinien

Um die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle eingrenzen zu können, wurde die subzelluläre Fraktionierung von kultivierten Brustkrebszelllinien etabliert. Dazu wurden die Zellen zunächst, wie in 2.2.1 beschrieben, für 24 h kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen für 48 h, wie in 2.2.5 beschrieben, synchronisiert und anschließend ggf., wie in 2.2.6 beschrieben, für einen definierten Zeitraum stimuliert. Zum Schutz der Oberflächenproteine wurden die Zellen, wie in 2.2.4 beschrieben, auf Eis mit dem Zellschaber abgekratzt und anschließend pelletiert.

Zur sukzessiven Lyse der zellulären Bestandteile wurde das Subcellular-Protein-Fractionation-Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Dazu wurde ein, an die Größe des Pellets angepasstes, Volumen der unten angegebenen Puffer mit Phosphatase- und Protease-Inhibitor (jeweils 1: 100) auf Eis vorbereitet.

**Tabelle 10: Reagenzien zur subzellulären Fraktionierung**

<b>Puffer</b>	CEB	MEB	NEB	NEB + CaCl <sub>2</sub> + MNase	PEB
<b>Volumen</b>	100 µl	100 µl	50 µl	50 µl + 2,5 µl + 1,5 µl	50 µl

*Für eine Menge von circa  $1 \times 10^6$  Zellen; CEB = Cytoplasmic extraction buffer; MEB = Membrane extraction buffer; NEB = Nuclear extraction buffer; CaCl<sub>2</sub> = Calciumchlorid; MNase = Micrococcal nuclease; PEB = Pellet extraction buffer. Mengenangaben entstammen den Informationen des Herstellers.*

Die subzelluläre Fraktionierung wurde anschließend zunächst nach den Angaben des Herstellers durchgeführt [116]. Dabei wurden fünf Fraktionen erzeugt, welche jeweils eines der folgenden zellulären Kompartimente enthielten: Zytoplasma, Membranen, Kern, Chromatin-gebundenes und Zytoskelett. Im Laufe der weiteren Etablierung der subzellulären Fraktionierung in dieser Arbeit wurden Änderungen zu dem Protokoll des Herstellers hinzugeführt. Diese sind nachfolgend im Unterkapitel 3.1 beschrieben.

Bis zur weiteren Analyse wurden alle Proben auf Eis gelagert. Zur Langzeitverwahrung wurden die Lysate bei - 80 °C eingefroren.

### 2.3.2 Lyse der Zellen für Western Blot

Zur Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot wurden die Zellen zunächst, wie in 2.2.3 beschrieben, geerntet und pelletiert. Zur Lyse der Zellen wurde das Zellpellet zunächst in einem adäquaten Volumen RIPA-Puffer resuspendiert und 20 min bei 4 °C und 750 RPM inkubiert. Um entstandenen Debris zu entfernen, wurde das Lysat bei 4 °C und 14.000 RPM für 20 min zentrifugiert. Der Überstand, entsprechend dem Proteinlysate, wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce™-BCA-Protein-Assay-Kit nach den Herstellerangaben verwendet. Zur anschließenden Analyse wurden 10 - 25 µg Protein mit 4 x Laemmli-Puffer und einem angemessenen Volumen RIPA-Puffer auf 95 °C erhitzt und auf ein SDS-Gel geladen.

### 2.3.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-PAGE wurde mit dem Mini-PROTEAN®-System von Bio-Rad durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine nach der Masse im elektrischen Feld wurden die Proteine in der Kammer auf ein Mini-PROTEAN®-Precast-Gel aufgetragen. Zur Kennzeichnung der Molekularmasse wurde ein Proteinstandard aufgetragen. Die Kammer wurde mit 1 x SDS-Puffer aufgefüllt, anschließend wurde für 1 h ein elektrisches Feld mit einer Spannung von

150 V angelegt. Zur Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf eine Immun-Blot®-PVDF-Membran wurde die Membran zunächst in Methanol aktiviert. Das Gel und die Membran wurden in Western Blotting-Puffer equilibriert und die Proteine 16 h bei 4 °C und einer Stromstärke von 20 mA auf die Membran übertragen. Nach dem Lauf wurde die Membran kurz in 1 x TBS-T gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurde die Membran 1 h in 1 x TBS-T mit 5 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3 x 10 min in 1 x TBS-T gewaschen. Zur Bindung des Primärantikörpers wurde dieser in der jeweils angegebenen Konzentration in 1 x TBS-T mit 5 % Magermilchpulver über Nacht bei 4 °C bei sanftem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min in 1 x TBS-T gewaschen und mit dem mit HRP-konjugierten Sekundärantikörper nach angegebener Verdünnung 1 h in 1 x TBS-T mit 1 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln inkubiert. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran erneut 3 x 10 min in 1 x TBS-T gewaschen und mit Amersham-ECL®-Western-Blotting-Detection-Reagenz im Chemi-Doc-Imaging-System detektiert.

#### 2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Zellen, wie in 2.2.3 beschrieben, geerntet und in Kulturmedium resuspendiert. Zum Zählen wurden 10 µl der Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl/ml bestimmt. Zur Analyse wurden 12.000 Zellen pro Kammer auf Glasobjektträgern ausgesät und, wie in 2.2.1 beschrieben, inkubiert und ggf. anschließend, wie in 2.2.6 beschrieben, stimuliert. Zur weiteren Analyse wurde das Medium vorsichtig abgenommen und der Objektträger in eiskaltem PBS auf Eis gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA inkubiert und anschließend 2 x 5 min in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Objektträger 10 min mit 0,1 % Triton-X in PBS inkubiert und 2 x 5 min in 1 x TBS-T gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Objektträger 1 h mit *Dako Protein Block* in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Primärantikörper wurde, wie jeweils in Tabelle 4 angegeben, in *Dako Antibody Diluent* verdünnt und über Nacht bei 4 °C in einer angefeuchteten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden 3 x 5 min in 1 x TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde, wie jeweils angegeben, in *Dako Antibody Diluent* mit 5 % DAPI verdünnt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Eindeckeln wurden die Objektträger 3 x 5 min in 1 x TBS-T und 1 x 30 s in destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und mit *Dako Mounting Medium* und einem Deckglas versehen. Bis zur weiteren Analyse wurden die Objektträger lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

## 2.4 Molekularbiologische Methodik

### 2.4.1 MTT-Wachstums-Assay

Zur Wachstumsanalyse wurde die Zunahme der Zellzahl nach DMSO- bzw. NET-Stimulation gemessen. Dazu wurden auf einer Platte mit 96 Kammern jeweils 10.000 Zellen pro Kammer in technischen Triplikaten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 48 h in hormonfreiem Medium synchronisiert. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit DMSO bzw. NET mit einer Verdünnung von  $10^{-6}$  M in hormonfreiem Medium für 72 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen 3 h bei 37 °C mit MTT mit einer Konzentration von 0,25 ng/ml in Kulturmedium inkubiert. Die MTT-Lösung wurde dann vorsichtig abgenommen und ein identisches Volumen DMSO pro Kammer hinzugegeben. Das gebildete Formazan wurde bei 37 °C für 1 h bei 450 RPM extrahiert. Nach der Inkubation wurde die Platte bei 1.000 RPM zentrifugiert und anschließend die Lichtabsorption bei 450 nm mit dem *Spark<sup>®</sup> Tecan* gemessen.

### 2.5 Grafische Darstellung

Die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint erstellt, die Strukturformeln der Proteine mittels ChemDraw. Für die Erstellung der Abbildungen wurden Grafikteile von Servier Medical Art verwendet [117]. Die Bildauswertung der Immunfluoreszenzfärbung, sowie die Quantifizierung der Western Blot-Bilder wurden mit ImageJ durchgeführt.

### 2.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Microsoft Excel und GraphPad Prism. Signifikanz wurde mit studentischem t-Test sowie bei MTT-Assay mittels zweifacher Varianzanalyse und Bonferroni PostHoc-Test überprüft, dabei gilt ein  $p < 0,05$  als statistisch signifikant. Der statistische Test sowie der ermittelte p-Wert sind unter der jeweiligen Versuchsauswertung angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mit \* gekennzeichnet, dabei gilt \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ .

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der subzellulären Fraktionierung von MCF-7

#### 3.1.1 Auswahl geeigneter Markerproteine für subzelluläre Fraktionen

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Zusammenspiels zwischen ER $\alpha$  und den Proteinen PGRMC1 und PHB2 in Brustkrebszelllinien. Der Hormonrezeptor ER $\alpha$  nimmt nach Stimulation mit seinem endogenen Liganden E2 aktiv Einfluss auf die Zellproliferation [89, 90]. Um die Rolle der Proteine PGRMC1 und PHB2 bei der Aktivierung von ER $\alpha$  zu untersuchen, sollte zunächst die Lokalisation der Proteine auf subzellulärer Ebene bestimmt werden. Die Brustkrebszelllinie MCF-7 entstammt einem Mamma-Tumor des Luminal-A-Typs. Da diese Zelllinie ER $\alpha$ -positiv ist, kann sie als Modell-Zelllinie für ER $\alpha$ -positive Tumoren der Brust verwendet werden. MCF-7-Zellen exprimieren ebenso PGRMC1 und PHB2, daher wurden die Untersuchung der Lokalisation und alle weiteren Versuche in dieser Zelllinie, sowie stabil transfizierten Klonen durchgeführt.

Da neben der Untersuchung mittels Immunfluoreszenzfärbung eine quantifizierbare Methode zur Bestimmung der Proteinmengen in speziellen Kompartimenten genutzt werden sollte, wurde in dieser Arbeit zunächst die Methode der subzellulären Fraktionierung von MCF-7 etabliert. Im Laufe der subzellulären Fraktionierung wurden die Zellen lysiert und in subzelluläre Fraktionen unterteilt. Dies erfolgte mittels spezieller Detergenzien. Dabei wurden schrittweise die Proteine verschiedener Kompartimente isoliert und in Fraktionen aufgeteilt. Die erzeugten Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE prozessiert und mittels Western Blot analysiert.

Zur Bestätigung der vollständigen Auftrennung der Proteine sollte durch Detektion spezifischer Proteine mittels Western Blot eine Verifizierung der erzeugten Fraktionen durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass zusätzlich zu den zu untersuchenden Proteinen auch Antikörper gegen Markerproteine detektiert wurden, die möglichst ausschließlich oder vorwiegend in spezifischen Organellen beschrieben wurden. Diese Proteine können dann einer bestimmten Fraktion zugeordnet werden. Zur Entwicklung einer Antikörpermischung, welche alle erzeugten Fraktionen identifizieren kann, wurde zunächst eine Vorauswahl an Proteinen getroffen, welche als Markerproteine verwendet werden könnten (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Auswahl von potenziellen Markerproteinen zur Verifizierung subzellulärer Fraktionen mittels Western Blot**

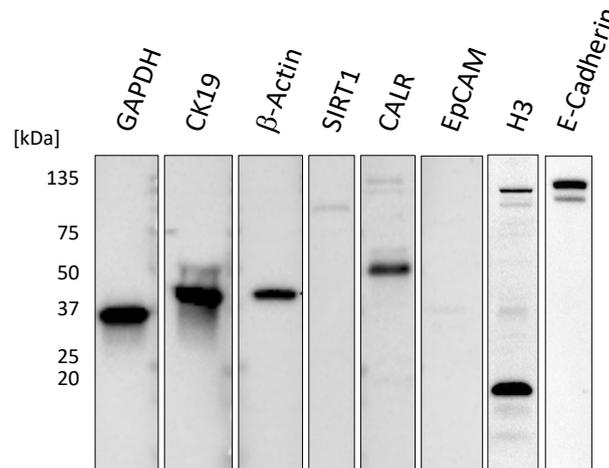
Fraktion	Markerprotein	Quelle
Zytoplasmatische Fraktion	- Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	[118]
	- $\beta$ -Actin	[119]
Membran-Fraktion:		
- Plasmamembran	- <i>Epithelial cell adhesion molecule</i> (EpCAM)	[120]
	- E-Cadherin	[121]
- Intrazelluläre Membranen	- Calreticulin (CALR)	[122]
Fraktion löslicher Kernproteine	- Sirtuin 1 (SIRT1)	[123]
Fraktion Chromatin-gebundener Proteine	- Histonprotein H3 (H3)	[124]
Zytoskelettale Fraktion	- Cytokeratin 19 (CK19)	[125]
	- $\beta$ -Actin	

Zu jedem aufgeführten Kompartiment wurde mindestens ein Protein aufgeführt, welches spezifisch in diesem Bereich beschrieben wurde.

Da in dieser Arbeit die Proteine ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 untersucht werden sollten, wurde deren Lokalisation im Voraus bereits durch eine Literaturrecherche eingegrenzt. Im *Human Protein Atlas* wurde die Lokalisation von ER $\alpha$  im Kernplasma, sowie in Vesikeln im Zytoplasma beschrieben [126]. Die Lokalisation von PGRMC1 wurde dort im endoplasmatischen Retikulum und in den Nukleoli innerhalb des Kerns benannt [127]. Die Lokalisation von PHB2 wurde im *Human Protein Atlas* in den Mitochondrien beschrieben [128]. Ein besonderer Fokus lag daher auf der Untersuchung der vorausgesagten Lokalisationsorte. Dies waren zum einen Organellen wie Mitochondrien, Vesikel und endoplasmatischem Retikulum, zum anderen der Zellkern und das Zytoplasma.

Die Kriterien, die in dieser Arbeit zur Auswahl eines geeigneten Fraktionsmarkers herangezogen wurden, sind nachfolgend beschrieben: Das Protein muss in MCF-7 deutlich exprimiert werden, damit eine ausreichende Signalstärke in der Analyse im Western Blot erreicht werden kann. Der gewählte Antikörper darf keine unspezifischen Bindungen aufweisen. Weiterhin soll das gewählte Markerprotein eine möglichst geringe Expression in anderen Fraktionen aufweisen – also spezifisch für die jeweilige Fraktion sein, um eine zweifelsfreie Identifikation der Fraktion zu gewährleisten. Dies gewährleistet auch die Möglichkeit einer Normalisierung der ermittelten Expression auf den Fraktionsmarker im Rahmen der quantitativen Auswertung.

Zunächst wurden die Proteine, die als Markerproteine in Betracht gezogen wurden, auf ihre Expression in MCF-7 untersucht. Dazu wurden Ganzzell-Lysate von MCF-7 mittels SDS-PAGE prozessiert und im Western Blot analysiert.



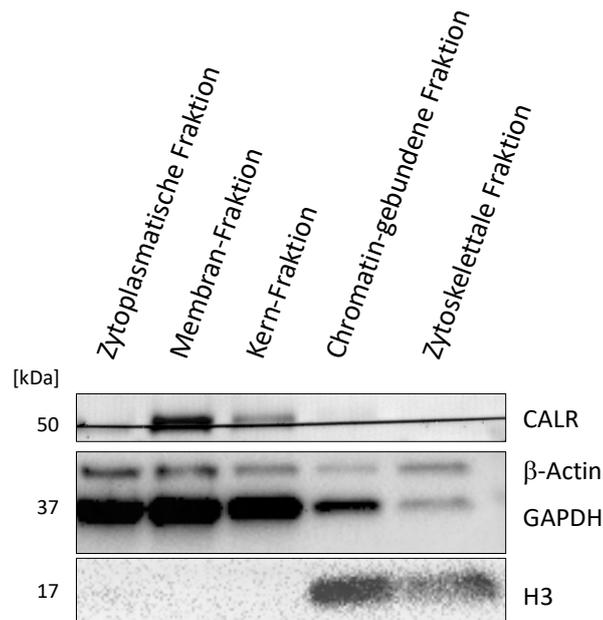
**Abb. 6: Western Blot Analyse von MCF-7 Ganzzell-Lysaten zur Prüfung der Expression von potenziellen Markerproteinen.** Detektion von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Cytokeratin 19 (CK19),  $\beta$ -Actin, Sirtuin 1 (SIRT1), Calreticulin (CALR), Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), Histonprotein H3 (H3) und E-Cadherin; Größenmarker. Molekulargewicht in kDa.

Die Analyse des Western Blots der untersuchten Markerproteine ließ erkennen, dass die Proteine GAPDH, CK19,  $\beta$ -Actin, CALR, E-Cadherin und H3 Banden von hoher Intensität zeigten. Die Proteine GAPDH,  $\beta$ -Actin, CALR, E-Cadherin, EpCAM und H3 wurden als potenzielle Markerproteine bestätigt und anschließend weiterer Prüfung unterzogen.

Der Western Blot ließ aber auch erkennen, dass die Proteine SIRT1 und EpCAM nur äußerst schwach detektierbare Banden aufwiesen. Aufgrund der geringen Intensität im Western Blot wurde SIRT1 als Markerprotein ausgeschlossen, EpCAM wurde mittels einem alternativen Antikörper weiter untersucht. Bei der Analyse der CK19-Bande fiel sowohl eine unscharfe Bande als auch eine zweite, höhermolekulare Bande bei etwa 50 kDa auf. In dem Bereich von 50 kDa befindet sich ebenfalls  $ER\alpha$ , daher wäre eine Unterscheidung der beiden Proteine nicht möglich. Folglich wurde CK19 als Markerprotein nicht weiter in Betracht gezogen.

### 3.1.2 Integration der Markerproteine zu einem Antikörpergemisch

Anschließend sollte die Expression und Darstellbarkeit der Markerproteine in den Fraktionen überprüft werden. Dazu sollten die in 3.1.1 bestätigten potenziellen Markerproteine nach einer subzellulären Fraktionierung von MCF-7 überprüft werden. Dazu wurde zunächst eine subzelluläre Fraktionierung von MCF-7, wie in 2.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot prozessiert und analysiert (Abb. 7).



**Abb. 7: Western Blot Analyse subzellulärer Fraktionen von MCF-7.** Darstellung der erzeugten Fraktionen in der Reihenfolge der Isolierung von links nach rechts. Detektion von Calreticulin (CALR),  $\beta$ -Actin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Histonprotein H3 (H3). Molekulargewicht in kDa.

Im dargestellten Western Blot wurden die fünf erzeugten Fraktionen in der Reihenfolge ihrer Isolierung von links nach rechts dargestellt. Detektiert wurden die potenziellen Markerproteine CALR,  $\beta$ -Actin, GAPDH und H3, alle Proteine zeigten eine deutliche Expression. Durch die Analyse des Western Blots ließen sich Rückschlüsse auf die Vollständigkeit der Fraktionierung und den Proteingehalt in den erzeugten Fraktionen ziehen.

Da die Proteine  $\beta$ -Actin und GAPDH, welche in erster Linie im Zytoplasma sowie im Zytoskelett beschrieben waren, sowohl in der zytoplasmatischen- und Zytoskelett-Fraktion als auch in der Membran- und Kern-Fraktion detektierbar waren, war eine unvollständige Isolierung der Proteine anzunehmen. Dies führte zu einer Verunreinigung der Fraktionen, die nachfolgend isoliert wurden. Auch die Detektion von H3 in der Zytoskelett-Fraktion deutete auf eine unvollständige Auftrennung der Proteine hin. Es war daher notwendig zunächst Waschschritte zur Verbesserung der Isolation einzuführen, bevor das Markerprotein für das Zytoplasma festgelegt werden konnte. Ebenso sollte die Lyse der Proteine intensiviert werden, da die geringe Signalstärke von H3 eine im Verlauf der Fraktionsisolierung abnehmende Proteinkonzentration vermuten ließ.

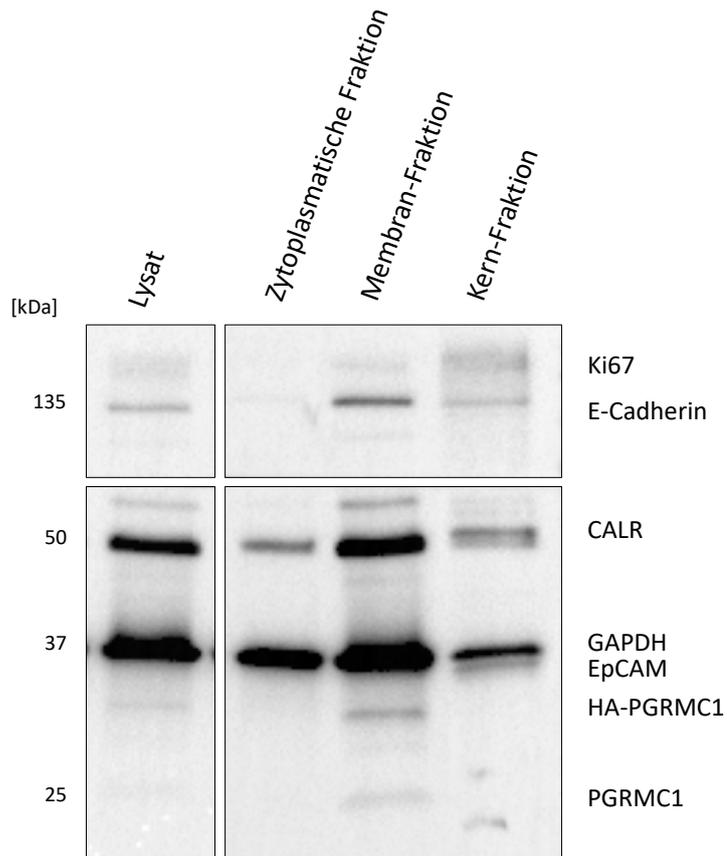
### 3.1.3 Fraktionen lassen sich zu Membran-, Zytoplasma- und Kern-Fraktionen zusammenfassen

Wie in 2.3.1 beschrieben, ermöglichte das verwendete Kit zur Fraktionierung kultivierter Zellen die Herstellung von fünf Fraktionen. Zur Untersuchung der Signalwege von ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 war jedoch die Erzeugung von fünf Fraktionen nicht notwendig. Um das Protokoll übersichtlicher zu gestalten und die Proteinmenge pro Fraktion zu optimieren, wurde im Folgenden daher nicht mehr zwischen Chromatin-gebundenen und löslichen Kernproteinen unterschieden. Die erzeugten Fraktionen „Kern“ und „Chromatin-gebundene Proteine“ wurden folglich zu einer Fraktion zusammengefasst und die erzeugten Lysate gemeinsam prozessiert. Da keine Betrachtung der zytoskelettalen Proteine erfolgte, wurde die erzeugte Fraktion verworfen.

Dementsprechend wurde die Methode der subzellulären Fraktionierung von MCF-7 adaptiert. Fortan beinhaltete die Methode die Isolierung einer zytoplasmatischen Fraktion, einer Membran-Fraktion, einschließlich intrazellulärer Membranen und Plasmamembran, sowie einer Kern-Fraktion, einschließlich löslicher und Chromatin-gebundener Proteine.

Dazu wurden folgende Änderungen an der Methode 2.3.1 vorgenommen. Die Inkubationszeit mit eiskaltem CEB wurde von 10 min auf 15 min bei 4°C erhöht. Dies sollte eine verstärkte Lyse und konsekutiv einen Anstieg der Proteinkonzentration in allen erzeugten Fraktionen zur Folge haben. Zur Reduktion der Verunreinigung der Membran-Fraktion und Kern-Fraktion wurden zwei Waschschrte mit eiskaltem PBS (mit Protease-/Phosphatase-Inhibitor) nach der Zentrifugation eingeführt. Zur gemeinsamen Prozessierung der Proteine des Kerns wurde die erzeugte Chromatin-gebundene Fraktion zu der löslichen Kern-Fraktion hinzugegeben.

Nach der Fraktionierung, welche die o. g. Adaptionen enthielt, wurden die hergestellten Fraktionen im Western Blot analysiert. Da erstmalig das Protein PGRMC1 detektiert werden sollte, wurde die PGRMC1-überexprimierende Zelllinie MCF-7/PGRMC1 verwendet.



**Abb. 8: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1.** Detektion von Ki67, E-Cadherin, Calreticulin (CALR) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) sowie (Hämagglutinin-) Progesterone Receptor Membrane Component 1 ((HA-) PGRMC1). Molekulargewicht in kDa.

Die Zusammenführung der Fraktionen führte zu einer übersichtlicheren Darstellung der Fraktionen im Western Blot. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Ergänzung zusätzlicher Waschschritte zwischen den einzelnen Schritten der Isolierung zu einer besseren Aufteilung der Proteine und einer geringeren Verunreinigung nachfolgender Fraktionen führte. Dennoch war GAPDH sowohl intensiv in der Membran-Fraktion als auch in der Kern-Fraktion zu detektieren. Aufgrund dessen wurde GAPDH als Markerprotein für das Zytoplasma ausgeschlossen.

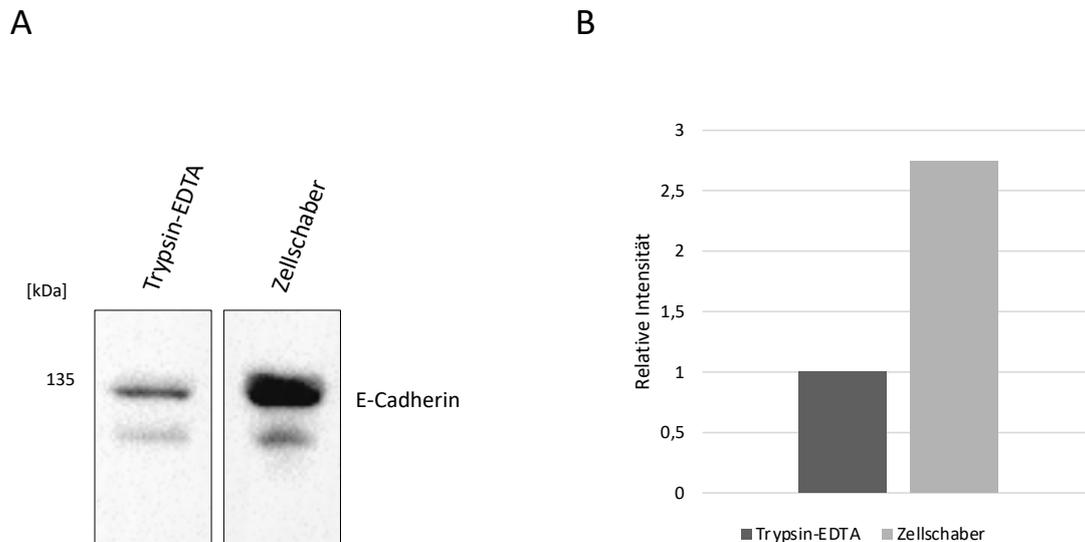
Die Detektion von CALR erfolgte zum Großteil in der Membran-Fraktion, mit einem geringen Nachweis in der Kern-Fraktion. In der Literatur wurde CALR fast ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum beschrieben. Da die Membran-Fraktion neben der Plasmamembran auch die intrazelluläre Membran des endoplasmatischen Retikulums beinhaltet, wurde die Detektion von CALR in der Kern-Fraktion am ehesten im Rahmen einer Verunreinigung der Kern-Fraktion durch Proteine der Membran-Fraktion betrachtet. Daher wurde CALR als Markerprotein bestätigt und für weitere Fraktionierungen verwendet.

Zusätzlich zu GAPDH und CALR wurden in diesem Schritt weitere Proteine als potenzielle Markerproteine analysiert. Als mögliches Markerprotein für den Kernbereich wurde das Kernprotein Ki67 detektiert. Im Western Blot zeigte sich allerdings lediglich eine unscharfe Bande im Bereich > 135 kDa. Dies ließ annehmen, dass Ki67 aufgrund seines Molekulargewichts von 350 kDa nicht für die gewählten experimentellen Bedingungen der SDS-PAGE und des Western Blots geeignet war [129]. Daher stellte Ki67 kein geeignetes Markerprotein dar und wurde nicht weiter in Betrachtung gezogen.

Die Proteine der Plasmamembran EpCAM und E-Cadherin, beides potenzielle Markerproteine für die Membran-Fraktion, ließen sich nur schwach darstellen. Da die detektierte EpCAM-Bande auch mit einem alternativen Antikörper nicht ausreichend sichtbar war, wurde auch EpCAM als Markerprotein nicht weiter in Erwägung gezogen. Das Oberflächenprotein E-Cadherin ließ sich sauber in der Membran-Fraktion detektieren. Aufgrund der geringen Signalintensität in der Fraktionierung sollte dennoch die Darstellbarkeit von E-Cadherin weiter evaluiert werden.

#### 3.1.4 Auswirkung des Ablösens mittels Zellschabern oder Trypsin-EDTA auf die Detektion von E-Cadherin im Western Blot

Das Ablösen der Zellen erfolgte bisher, wie in 2.2.3 beschrieben, mittels Inkubation mit Trypsin-EDTA. Bei dieser Methode führt die Inkubation mit Trypsin-EDTA regelhaft zu einer Degradierung der Proteine der Plasmamembran [130]. Es wurde daher vermutet, dass auch die Proteine, die als Marker für die Plasmamembran in Betracht gezogen wurden, teilweise degradiert wurden. Dies könnte zu einer verringerten Intensität der E-Cadherin-Bande und EpCAM-Bande geführt haben. Zur optimalen Darstellung des Oberflächenmarkers sollte daher eine Degradierung der Oberflächenproteine möglichst minimiert werden. Um zu überprüfen, ob ein Ablösen mittels Trypsin-EDTA eine höhere Degradierung zur Folge hat als das Ablösen mittels Zellschaber, sollte die Intensität der E-Cadherin-Bande nach Anwendung der beiden Verfahren analysiert werden.



**Abb. 9: Western Blot Analyse von MCF-7-Ganzzell-Lysaten nach Ablösen der adhärenen Zellen mittels Trypsin-EDTA oder Zellschaber.** A: Detektion von E-Cadherin. Molekulargewicht in kDa. B: Relative Intensität der detektierten E-Cadherin Bande, dabei entspricht die Intensität 1 nach Ablösen mittels Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-EDTA). Der Versuch wurde mit  $n = 1$  durchgeführt.

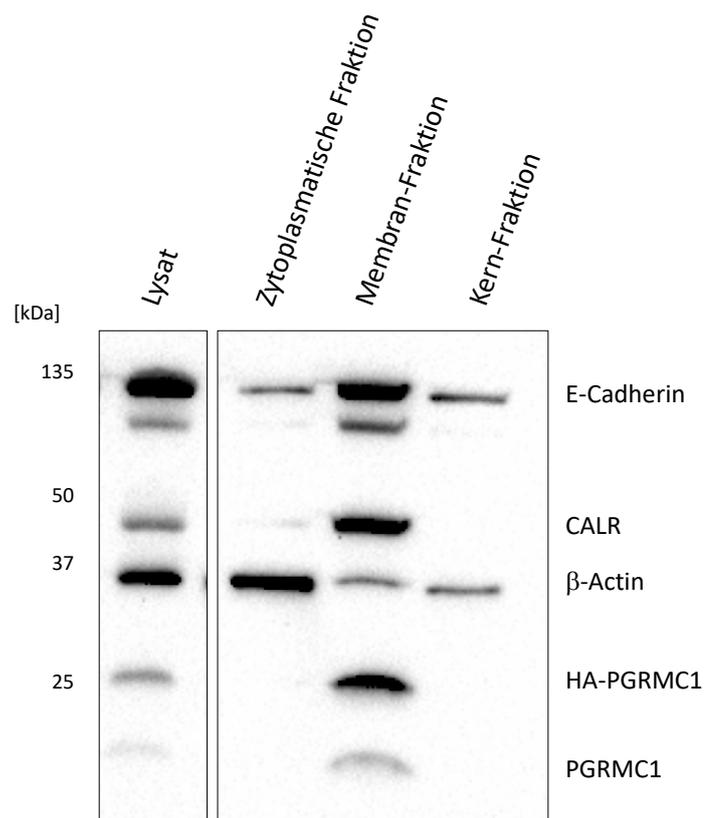
Die Analyse des Western Blot (Abb. 9) ließ schließen, dass das mechanische Ablösen der adhärenen MCF-7-Zellen mittels Zellschaber zu einer deutlich höheren Signalstärke der detektierten E-Cadherin-Bande im Western Blot führte als das Ablösen der Zellen mittels Trypsin-EDTA.

Die Analyse des Western Blots zeigte dabei zwei Banden nach der Detektion von Anti-E-Cadherin. Bei einem Molekulargewicht von 135 kDa wurde das *Precursor*-Protein sowie mit einem geringeren Molekulargewicht von 80-120 kDa E-Cadherin mit unterschiedlichen Glykosylierungszustände detektiert [131]. Da jedoch keine der beiden Banden mit der Darstellung anderer Proteine von Interesse interferierte, wurde E-Cadherin als Markerprotein für die Plasmamembran etabliert.

### 3.1.5 Intensivieren der Waschschrte in der Fraktionierung verringert Verunreinigung von Membran- und Kern-Fraktion mit Proteinen der zytoplasmatischen Fraktion

Da eine unvollständige Proteinisolation zu Analysefehlern der Proteinlokalisierung führen könnte, sollte die Reinheit der erzeugten Fraktionen gesteigert werden. Aus Abb. 8 kann entnommen werden, dass trotz zusätzlicher Waschschrte mit PBS eine Verunreinigung durch Proteine der Membran und des Zytoplasmas in die Kern-Fraktion bestand. Daher wurden die im Folgenden beschriebenen intensivierten Waschschrte in das Protokoll etabliert.

Nachdem MCF-7/PGRMC1, wie in 2.2.4 beschrieben, geerntet und pelletiert wurden, wurde die subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Um den Reinheitsgrad der Fraktionen zu erhöhen, wurden zusätzliche Waschschriffe zu den bereits erfolgten Adaptionen von 2.3.1 hinzugefügt. Nach der Isolierung der zytoplasmatischen Fraktion wie auch der Membran-Fraktion wurde das verbliebene Pellet zunächst mit dem jeweiligen Isolationspuffer und anschließend mit PBS, jeweils mit Phosphatase- und Protease-Inhibitor, gewaschen. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Diese Adaption des Protokolls aus 2.3.1 wurde auf alle nachfolgenden subzellulären Fraktionierungen angewandt.



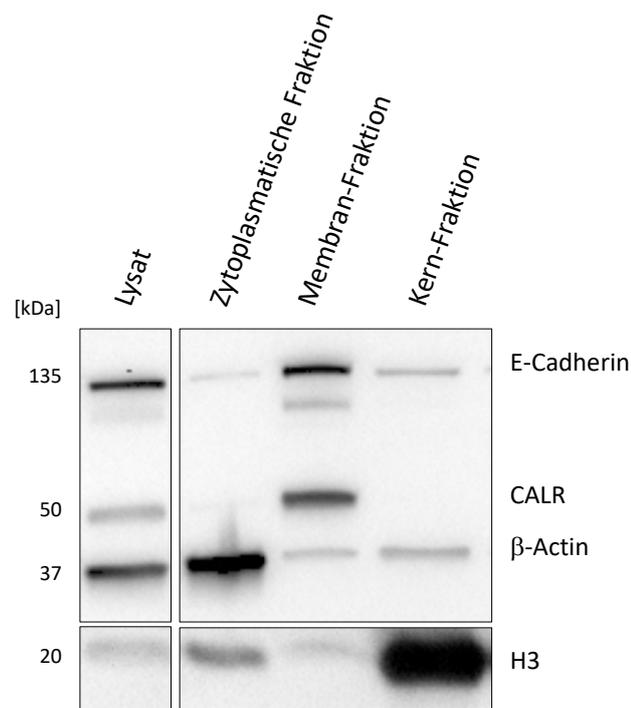
**Abb. 10: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1.** Detektion von E-Cadherin, Calreticulin (CALR),  $\beta$ -Actin sowie (Hämagglutinin-) Progesterone Receptor Membrane Component 1 ((HA-) PGRMC1). Molekulargewicht in kDa.

Der Western Blot einer subzellulären Fraktionierung mit Detektion der bereits etablierten Markerproteine E-Cadherin, CALR und  $\beta$ -Actin ist in Abb. 10 beispielhaft dargestellt. Dabei wurden E-Cadherin und CALR als Markerproteine für die Membran-Fraktion und  $\beta$ -Actin als zytoplasmatischer Marker detektiert. Im Vergleich zu der in Abb. 8 analysierten Fraktionierung war in der erneuten Western Blot Analyse von Abb. 10 eine deutlich geringere Kontamination der Kern- und der Membran-Fraktion mit Proteinen aus der zytoplasmatischen Fraktion ( $\beta$ -Actin) zu erkennen, ebenso eine geringere Kontamination der Kern-Fraktion mit Proteinen aus der Membran-Fraktion (E-Cadherin und CALR).

Der Western Blot bestätigte, dass  $\beta$ -Actin einen geeigneten Marker für die zytoplasmatische Fraktion darstellt, da eine eindeutige Zuordnung des Proteins in die zytoplasmatische Fraktion erfolgt. Daher wurde  $\beta$ -Actin für alle weiteren Fraktionierungen als Markerprotein für die zytoplasmatische Fraktion verwendet.

3.1.6 Zur Identifizierung der subzellulären Fraktionen in MCF-7 wurde ein Antikörpergemisch aus  $\beta$ -Actin, E-Cadherin, CALR und H3 etabliert

Ziel dieser Arbeit war die subzelluläre Fraktionierung am Beispiel der luminalen Zelllinie MCF-7 zu etablieren, um die Lokalisation der Proteine ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 mittels Western Blot analysieren zu können. Es wurde gezeigt, dass die Verlängerung der Inkubationszeit mit dem initialen Lysepuffer sowie mehrmalige Waschschrte zwischen den einzelnen Schritten der Proteinisolation zu einer höheren Proteinkonzentration führten und die Verunreinigung der Fraktionen durch Proteinmaterial aus anderen Fraktionen verringerte.



**Abb. 11: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1 mit dem etablierten Antikörpercocktail zur Verifizierung der Fraktionen.** Detektion von E-Cadherin, Calreticulin (CALR),  $\beta$ -Actin und Histonprotein H3 (H3). Molekulargewicht in kDa.

Zur Identifizierung der erzeugten Fraktionen wurde ein Antikörpergemisch etabliert, welches dazu dient, Proteine zu detektieren, die ausschließlich oder vorrangig in festgelegten Zellkompartimenten beschrieben wurden (s. Abb. 11). Dieses Antikörpergemisch besteht aus Antikörpern gegen die Proteine E-Cadherin in der Plasmamembran und CALR in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, das Protein  $\beta$ -Actin im Zytoplasma und das Protein H3 im Chromatinkomplex. In dieser Arbeit

konnte mit den Antikörpern gegen  $\beta$ -Actin die zytoplasmatische Fraktion, mit Antikörpern gegen E-Cadherin und CALR die Membran-Fraktion und mit Antikörpern gegen H3 die Kern-Fraktion identifiziert werden. Alle Antikörper, mit Ausnahme des Antikörpers gegen H3, konnten simultan aufgetragen und inkubiert, sowie belichtet werden. Da der Antikörper gegen H3 höhermolekulare unspezifische Bindungen aufwies und die Detektion von H3 eine längere Belichtungszeit benötigte (s. Abb. 6), sollte dieser Antikörper einzeln aufgetragen, inkubiert und detektiert werden.

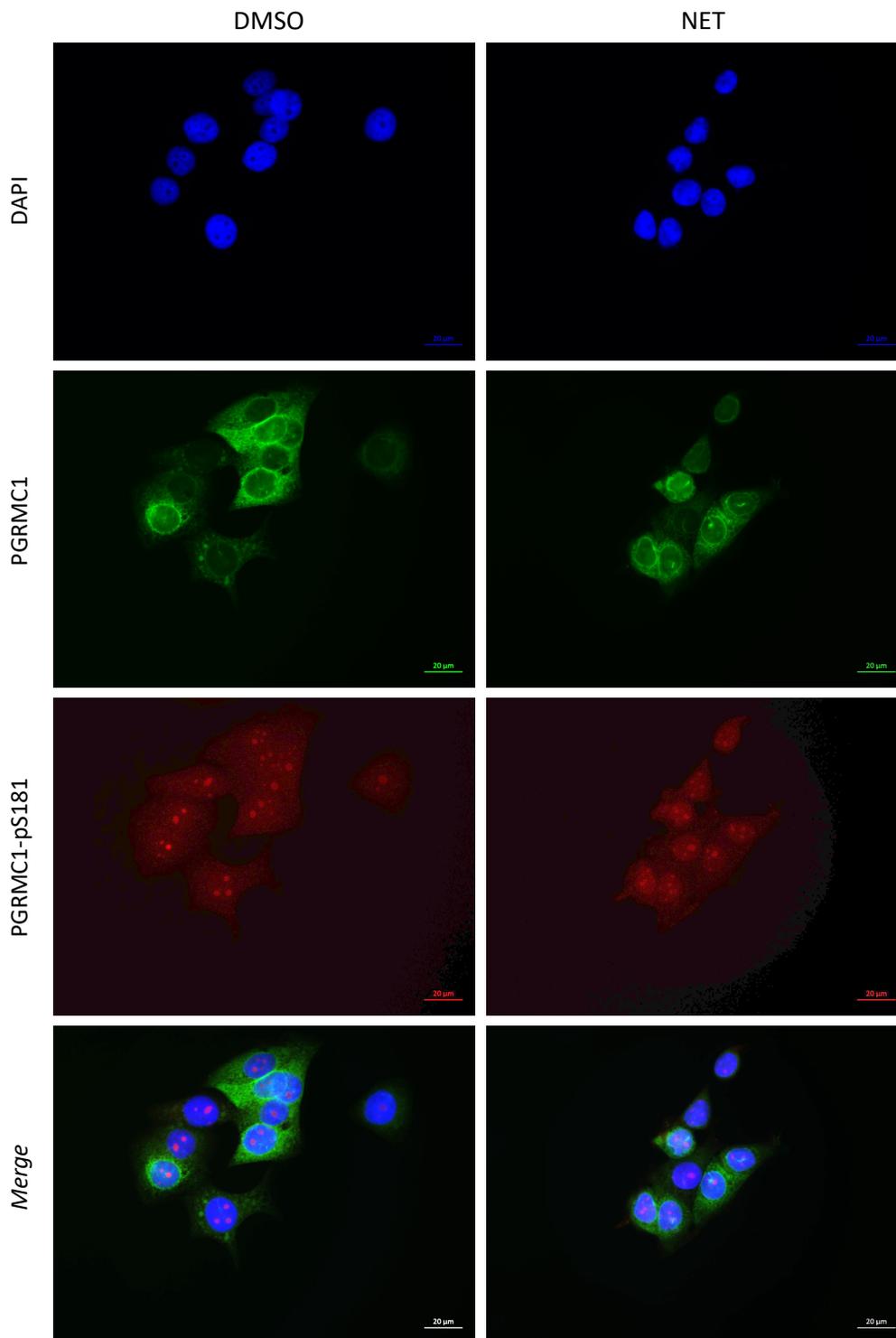
## 3.2 Lokalisation von PGRMC1 und PHB2 in MCF-7

### 3.2.1 PGRMC1 ist vor und nach NET-Stimulation perinukleär lokalisiert

Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Signalwege zwischen PGRMC1 und  $ER\alpha$ . Dazu wurde zunächst die Lokalisation von PGRMC1 in MCF-7 untersucht. Es wurden zahlreiche Korrelationen zwischen PGRMC1-Expression und  $ER\alpha$ -Wirkung in Brustkrebszellen beschrieben, der Interaktionsmechanismus ist bisher aber unklar [70].

Die Stimulation mit NET führt bei einer Überexpression von PGRMC1 zu einer signifikant erhöhten Proliferation im Vergleich zu der Leervektorkontrolle [76]. Um die Lokalisation von PGRMC1 und an S181-phosphoryliertem-PGRMC1 (PGRMC1-pS181) vor und nach Stimulation mit NET zu beschreiben, wurden MCF-7/PGRMC1 nach einer Stimulation über 60 min mit NET und einer Negativkontrolle mit DMSO mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

## MCF-7/PGRMC1

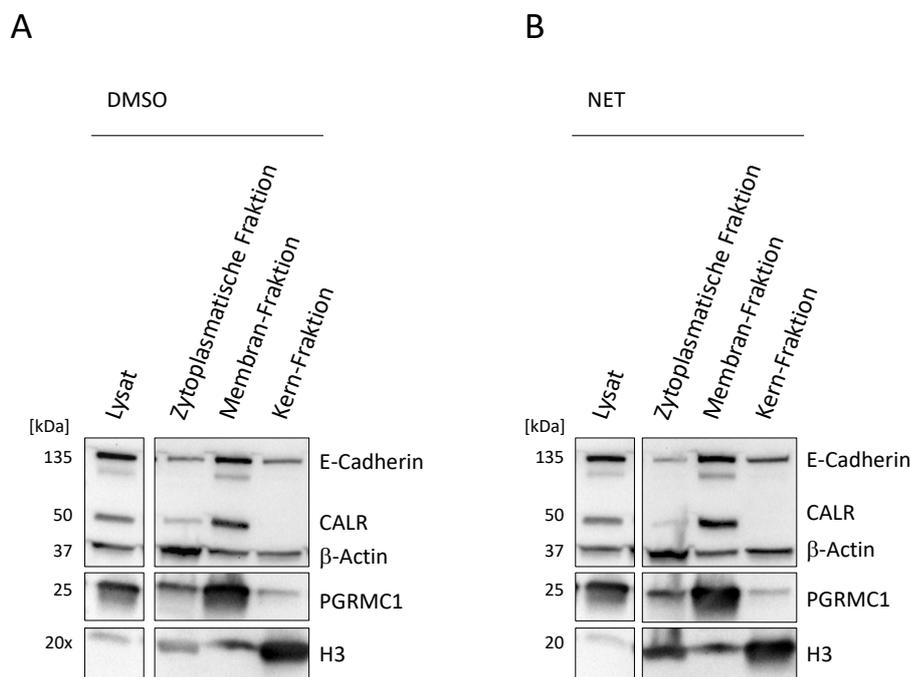


**Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7/PGRMC1.** MCF-7/PGRMC1-Zellen wurden 60 min mit (links) Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-6}$  M) oder (rechts) Norethisteron (NET) ( $10^{-6}$  M) behandelt. Detektion von PGRMC1 und PGRMC1-pS181. 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Kernfärbung. Vergrößerung 63x. Maßstab 20 µm. Progesterone Receptor Membrane Component 1 (- an Serin-181 phosphoryliert) (PGRMC1(-pS181)).

In der DMSO-Kontrolle war PGRMC1 retikulär im Zytoplasma darstellbar (Abb. 12). Die Signalintensität war zirkulär um den Zellkern herum angehoben und flachte in die Peripherie hin ab. Die Detektion von PGRMC1-pS181 erfolgte hingegen verstärkt im Bereich des Zellkerns, mit punktförmiger Konfiguration. Die Intensität der PGRMC1-pS181-Färbung war im Zytoplasma nur sehr reduziert vorhanden. Nach Stimulation mit NET (Abb. 12) schien in einigen Zellen perinukleär im Zytoplasma eine geringere Menge an PGRMC1 darstellbar zu sein, zugunsten einer höheren Dichte an PGRMC1-pS181. Diese Veränderung ließ sich allerdings nicht in allen Zellen beobachten. Die Lokalisation von PGRMC1 vor und nach NET-Stimulation wurde daher weiterführend mittels subzellulärer Fraktionierung untersucht.

### 3.2.2 PGRMC1 ist nach NET-Stimulation in der Membran-Fraktion von MCF-7/PGRMC1 lokalisiert

Zur Untersuchung der Lokalisation von PGRMC1 in Fraktionen wurden im nächsten Schritt MCF-7/PGRMC1 mittels subzellulärer Fraktionierung analysiert. Dazu wurden MCF-7/PGRMC1 für 60 min mit NET stimuliert, eine Negativkontrolle wurde mit DMSO angefertigt. Anschließend wurden die Zellen fraktioniert, via SDS-PAGE und Western Blot prozessiert und analysiert.



**Abb. 13: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1.** MCF-7/PGRMC1-Zellen wurden 60 min mit (A) Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-6}$  M) oder (B) Norethisteron (NET) ( $10^{-6}$  M) behandelt. Detektion von E-Cadherin, Calreticulin (CALR),  $\beta$ -Actin, Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) und Histonprotein H3 (H3). Molekulargewicht in kDa.

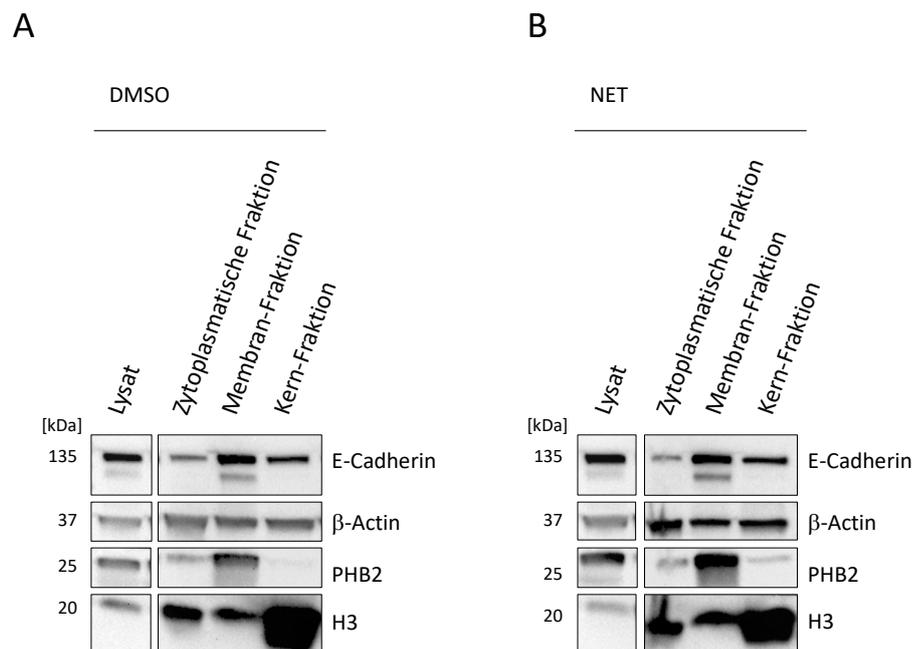
In der DMSO-Negativkontrolle konnte PGRMC1 hauptsächlich in der Membran-Fraktion detektiert werden. Diese beinhaltet, wie in 2.3.1 erläutert, nicht ausschließlich die Plasmamembran. Vielmehr wurden neben dieser auch die Proteine aller intrazellulären

Membranen in der Membran-Fraktion isoliert. Weitere Banden geringerer Intensität ließen sich zusätzlich in der zytoplasmatischen Fraktion sowie in der Kern-Fraktion detektieren. Nach der Stimulation mit NET ließ sich ein nahezu identisches Bild detektieren. Auch hier war der Großteil des detektierten PGRMC1 in der Membran-Fraktion, während ein geringer Teil in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert werden konnte. Sowohl nach NET-Stimulation als auch in der DMSO-Kontrolle war eine Bande geringer Intensität in der Kern-Fraktion detektierbar. Eine Zunahme der Intensität in zytoplasmatischer- oder Kern-Fraktion war nicht nachzuweisen.

### 3.2.3 PHB2 ist in der Membran-Fraktion von MCF-7/PGRMC1 lokalisiert

Um die funktionelle Interaktion zwischen PGRMC1, ER $\alpha$  und PHB2 genauer zu beleuchten, wurde in dieser Arbeit auch die Lokalisation von PHB2 mittels subzellulärer Fraktionierung untersucht.

Dazu wurden MCF-7/PGRMC1 für 60 min mit NET stimuliert, eine Negativkontrolle wurde mit DMSO angefertigt. Anschließend wurden die Zellen fraktioniert, via SDS-PAGE und Western Blot prozessiert und analysiert.



**Abb. 14: Western Blot Analyse eines Ganzzell-Lysats und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1.** MCF-7/PGRMC1-Zellen wurden 60 min mit (A) Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-6}$  M) oder (B) Norethisteron (NET) ( $10^{-6}$  M) behandelt. Detektion von E-Cadherin,  $\beta$ -Actin, Prohibitin 2 (PHB2) und Histonprotein H3 (H3). Molekulargewicht in kDa.

In der Western Blot Analyse ließ sich PHB2 sowohl nach NET-Stimulation als auch in der DMSO-Kontrolle in der Membran-Fraktion detektieren, in der zytoplasmatischen Fraktion war eine geringe Menge PHB2 zu detektieren, in der Kern-Fraktion konnte hingegen keine PHB2-Expression nachgewiesen werden.

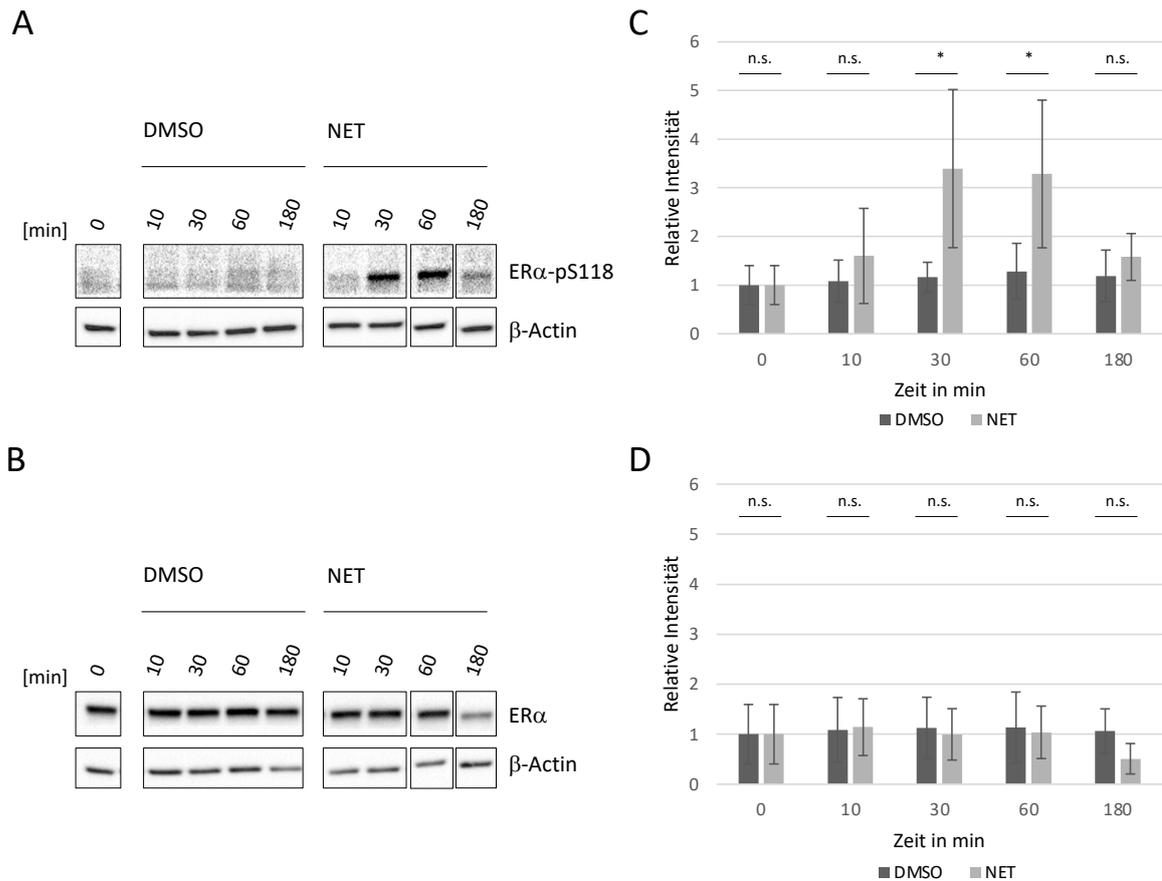
Es konnte keine Translokation in eine andere Fraktion durch die Stimulation mit NET nachgewiesen werden. PHB2 scheint in der Membran-Fraktion, also der Plasmamembran oder intrazellulärer Membranen, zu verbleiben.

### 3.3 Phosphorylierung und Translokation von ER $\alpha$ nach NET-Stimulation

#### 3.3.1 NET-induzierte ER $\alpha$ -Phosphorylierung erreicht nach 60 min ein Maximum

Ziel dieser Arbeit war die zellulären Mechanismen der NET-abhängigen ER $\alpha$ -Phosphorylierung und konsekutiven Aktivierung in MCF-7 zu untersuchen. Brustkrebszellen, die ER $\alpha$  exprimieren, reagieren verstärkt proliferativ auf eine Stimulation mit Progestinen wie NET [77]. Unklar ist bisher, welche intrazellulären Signalwege der ER $\alpha$ -Aktivierung nach der Stimulation mit NET zugrunde liegen. Ein häufig in anderen Zusammenhängen beschriebener Aktivierungsmechanismus von ER $\alpha$  ist die Phosphorylierung an S118 [96].

Zunächst sollte untersucht werden, ob und gegebenenfalls in welchem Zeitraum die Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 nach Stimulation mit NET stattfindet. Dazu sollte mittels Western Blot Analyse die Menge von an S118-phosphoryliertem-ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -pS118) nach Stimulation mit NET untersucht werden. Dazu wurden MCF-7/PGRMC1 für einen Zeitraum von 10 - 180 min mit NET stimuliert, zum Vergleich wurde eine Kontrolle mit DMSO angefertigt. Anschließend wurde die Expression von ER $\alpha$ , sowie ER $\alpha$ -pS118 mittels Western Blot analysiert. Der Versuch wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt.



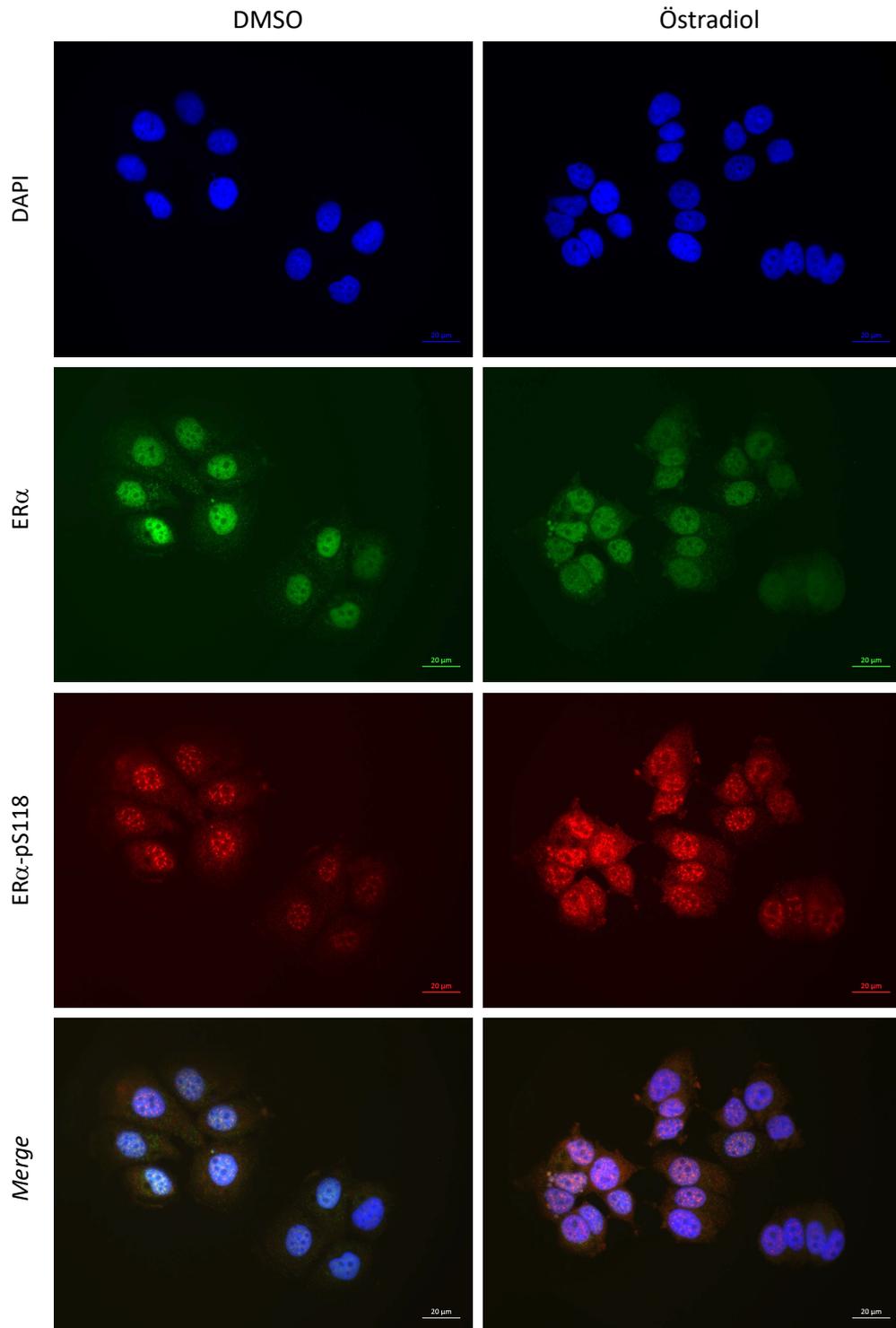
**Abb. 15: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten von MCF-7/PGRMC1.** MCF-7/PGRMC1-Zellen wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-6}$  M) oder Norethisteron (NET) ( $10^{-6}$  M) für einen Zeitraum von 10 - 180 min behandelt. Detektion von (A) Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ , phosphoryliert an Serin-118 (ER $\alpha$ -pS118) und (B) Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin. Zeit in min C: Relative Intensität der detektierten ER $\alpha$ -pS118-Bande, normalisiert jeweils auf die detektierte  $\beta$ -Actin-Bande. Darstellung in Verhältnis zum Zeitpunkt 0 min (Intensität zum Zeitpunkt 0 min  $\pm$  1). D: Relative Intensität der detektierten ER $\alpha$ -Bande, normalisiert jeweils auf die detektierte  $\beta$ -Actin-Bande. Darstellung im Verhältnis zum Zeitpunkt 0 min (Intensität zum Zeitpunkt 0 min  $\pm$  1). Durchführung erfolgte in drei biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mittels zweifacher Varianzanalyse und Post-Hoc-Test nach Bonferroni überprüft, dabei entspricht jeweils: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant/  $p > 0,05$ .

In der Western Blot Analyse ließ sich eine Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 nach der Stimulation mit NET zeigen, welche nach 30 min bzw. 60 min am stärksten ausgeprägt war. In der quantitativen Analyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ER $\alpha$ -pS118-Menge im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle nach 30 min sowie 60 min. Nach einer Stimulationszeit von 180 min war die ER $\alpha$ -pS118-Bande mit geringerer Signalintensität detektierbar. In der DMSO-Kontrolle konnte kein ER $\alpha$ -pS118 nachgewiesen werden. Die Analyse der Gesamtmenge von ER $\alpha$  zeigte bereits zum Zeitpunkt von 0 min sowie in allen Zeitpunkten der NET-Stimulation und DMSO-Kontrolle eine deutliche Bande, welche nach 180 min Stimulation mit NET bzw. DMSO deutlich an Intensität verlor. Eine signifikante Änderung der ER $\alpha$ -Menge konnte nicht festgestellt werden.

In 3.3.1 wurde gezeigt, dass nach NET-Stimulation ein Anstieg der Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 erfolgte. Es wurde beschrieben, dass die Bindung des endogenen Liganden E2 an ER $\alpha$  zu einer intrazellulären Dimerisierung von ER $\alpha$  und zur Kerntranslokation des

Dimers führt [89]. Um zu bestätigen, dass die Stimulation mit E2 ebenfalls zu einer Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 führt, wurden MCF-7/PGRMC1 mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Dazu wurden die Zellen zunächst, wie in 2.3.4 beschrieben, auf Glasobjektträgern kultiviert und anschließend mit E2 für 60 min stimuliert.

MCF-7/PGRMC1



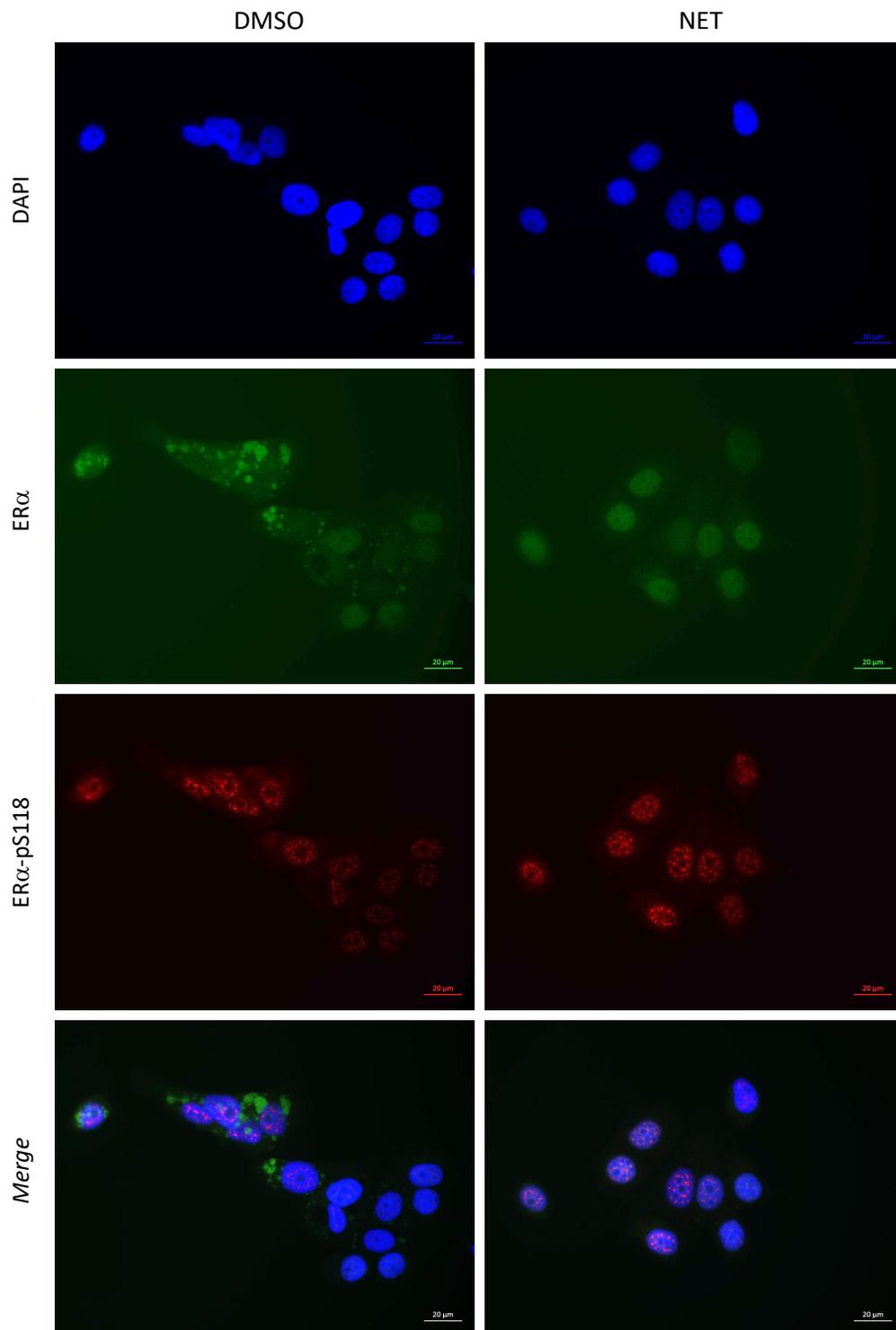
**Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7/PGRMC1.** MCF-7/PGRMC1-Zellen wurden 60 min mit (links) Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-8}$  M) oder (rechts) Östradiol (E2) ( $10^{-8}$  M) behandelt. Detektion von Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (-phosphoryliert an Serin-118) (ER $\alpha$  (-pS118)), 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Kernfärbung. Vergrößerung 63x. Maßstab 20  $\mu$ m.

In der Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7/PGRMC1 ließ sich eine Zunahme der Intensität der ER $\alpha$ -pS118-Färbung nach Stimulation mit NET detektieren. Durch Identifizierung des Zellkerns mittels DAPI-Kernfärbung war es möglich das Verteilungsmuster von ER $\alpha$ -pS118 im Bereich des Kerns zu lokalisieren. In der Zellperipherie konnte hingegen kein ER $\alpha$ -pS118 detektiert werden. Die Verteilung von ER $\alpha$  ließ sich in der DMSO-Kontrolle im Bereich des Zellkerns beschreiben. Auch nach Stimulation mit E2 war ER $\alpha$  hauptsächlich im Bereich des Zellkerns lokalisiert.

In 3.3.1 wurde bereits gezeigt, dass ER $\alpha$  an S118 nach NET-Stimulation phosphoryliert vorlag. Um zu untersuchen welchen Effekt die Stimulation mit NET auf die Lokalisation und die Phosphorylierung von ER $\alpha$  hat, sollte die Lokalisation von ER $\alpha$  und ER $\alpha$ -pS118 ebenfalls nach Stimulation mit NET mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht werden.

Da die Zeitkinetik einen Höhepunkt der Phosphorylierung von ER $\alpha$  nach einem Stimulationszeitraum von 30 min und 60 min erkennen ließ, wurden MCF-7/PGRMC1 auf Glasobjektträgern jeweils für 60 min mit NET bzw. DMSO stimuliert. Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Expression von ER $\alpha$  und ER $\alpha$ -pS118 analysiert.

MCF-7/PGRMC1



**Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7/PGRMC1.** MCF-7/PGRMC1-Zellen wurden 60 min mit (links) Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-6}$  M) oder (rechts) Norethisteron (NET) ( $10^{-6}$  M) behandelt. Detektion von Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (-phosphoryliert an Serin-118) (ER $\alpha$  (-pS118)), 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Kernfärbung. Vergrößerung 63x. Maßstab 20  $\mu$ m.

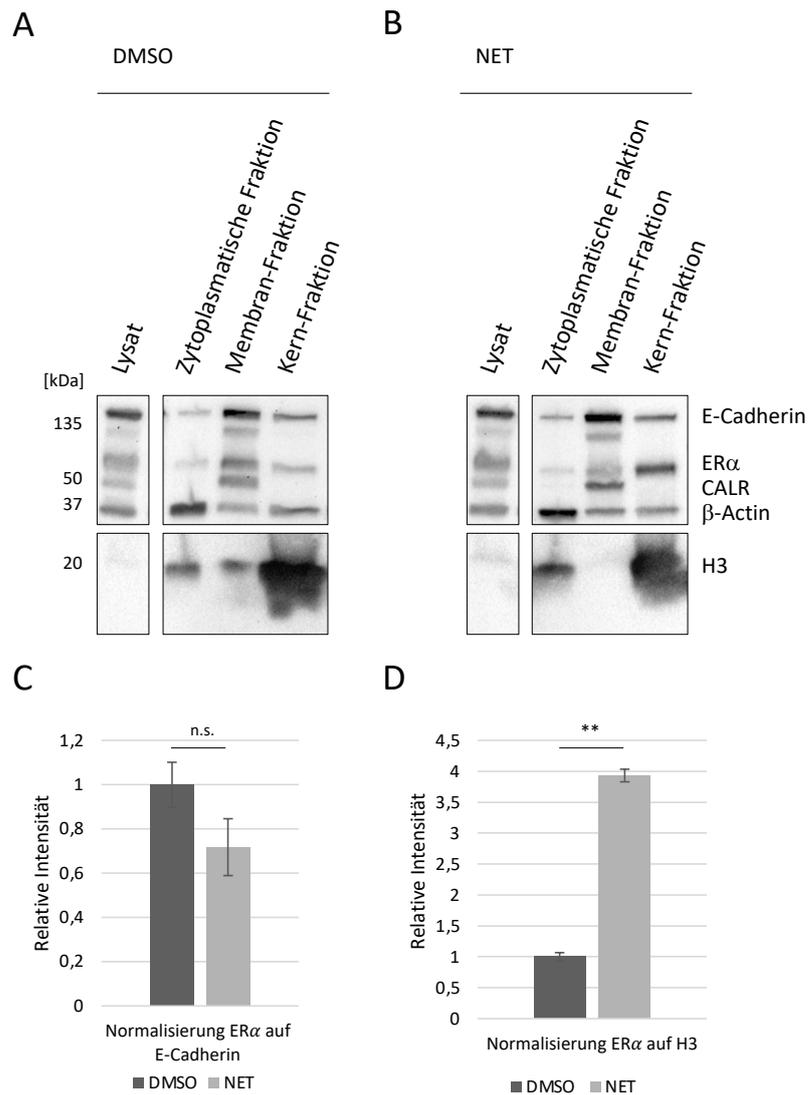
Die Immunfluoreszenzfärbung von ER $\alpha$  und ER $\alpha$ -pS118 ließ in der DMSO-Kontrolle nach 60 min eine inhomogene Verteilung von ER $\alpha$ -pS118 erkennen. Dabei ließ sich beobachten, dass die Konzentration von ER $\alpha$ -pS118 in einigen Zellen deutlich höher war als in einigen anderen. Nach 60 min NET-Stimulation hingegen war ein deutlich homogeneres Verteilungsmuster der pER $\alpha$ -Verteilung über die Zellen zu erkennen. So ließ sich in allen beobachteten Zellen eine hohe ER $\alpha$ -pS118-Menge beobachten. Die Intensität der Gesamt-ER $\alpha$ -Färbung war nach 60 min in der DMSO-Kontrolle gleichmäßig hoch. Nach NET-Stimulation über 60 min konnte eine verringerte Intensität der ER $\alpha$ -Färbung beobachtet werden.

Es lässt sich festhalten, dass die Stimulation von MCF-7/PGRMC1 mit NET für 60 min zu einer gleichmäßigen Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 in den Zellen und einer Verringerung der Gesamt-ER $\alpha$ -Detektion führte.

### 3.3.2 ER $\alpha$ transloziert nach NET-Stimulation aus der Membran-Fraktion in die Kern-Fraktion

Um eine genauere und quantitative Aussage über eine mögliche Translokation von ER $\alpha$  treffen zu können, wurde die Lokalisation von ER $\alpha$  in MCF-7/PGRMC1 nach subzellulärer Fraktionierung im Western Blot untersucht. Dazu wurden MCF-7/PGRMC1 in Zellkulturflaschen für 60 min mit NET, wie in 2.2.6 beschrieben, stimuliert und anschließend fraktioniert.

Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot prozessiert und die Gesamtmenge von ER $\alpha$  sowie die Markerproteine der subzellulären Fraktionen detektiert. Der Versuch wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt.



**Abb. 18: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten und subzellulärer Fraktionen von MCF-7/PGRMC1.** MCF-7/PGRMC1-Zellen wurden 60 min mit (A) Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-6}$  M) oder (B) Norethisteron (NET) ( $10^{-6}$  M) behandelt. A & B: Detektion von E-Cadherin, Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), Calreticulin (CALR),  $\beta$ -Actin und Histoneprotein H3 (H3). Molekulargewicht in kDa. C: Relative Intensität der detektierten ER $\alpha$ -Banden der Membran-Fraktion, normalisiert jeweils auf E-Cadherin, Intensität der DMSO-Kontrolle entspricht 1. D: Relative Intensität der detektierten ER $\alpha$ -Banden der Kern-Fraktion, normalisiert jeweils auf H3, Intensität der DMSO-Kontrolle entspricht 1. Signifikanz mit studentischem t-Test bestimmt;  $p < 0,05$  gilt als signifikant. n.s. = nicht signifikant/  $p > 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

In der Western Blot Analyse war nach 60 min Stimulation mit DMSO erkennbar, dass ER $\alpha$  in der Membran-Fraktion lokalisiert war. Nur geringe Mengen ER $\alpha$  konnten in der zytoplasmatischen- bzw. der Kern-Fraktion detektiert werden. Nach der Stimulation mit NET für 60 min konnte hingegen eine deutliche ER $\alpha$ -Bande in der Kern-Fraktion detektiert werden. Ein reduzierter Anteil ER $\alpha$  ließ sich auch hier in der Membran-Fraktion detektieren. In der zytoplasmatischen Fraktion konnte erneut nur eine sehr geringe Menge ER $\alpha$  detektiert werden.

Zur Quantifizierung der ER $\alpha$ -Expression wurde in Teil B und C der Abb. 18 die relative Intensität der ER $\alpha$ -Detektion im Vergleich zu den jeweiligen Fraktionsmarkern dargestellt.

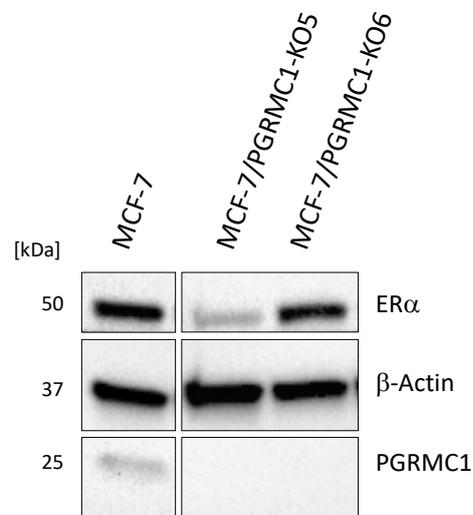
Die statistische Auswertung zeigte, dass die ER $\alpha$ -Expression in der Membran-Fraktion nach NET-Stimulation nicht signifikant geringer war als nach DMSO-Stimulation. Allerdings konnte gezeigt werden, dass in der Kern-Fraktion die ER $\alpha$ -Expression nach NET-Stimulation signifikant höher war als in der DMSO-Kontrolle.

### 3.4 Heterogene Effekte nach PGRMC1-Knockout in MCF-7

#### 3.4.1 In MCF-7/PGRMC1-KO-Zellen wird ER $\alpha$ exprimiert

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Einflüsse der PGRMC1-Expression auf die Zellhomöostase, der Proliferation sowie der ER $\alpha$ -Aktivierung in MCF-7. Asperger *et al.* beschrieben bereits, dass der transiente *Knockdown* von PGRMC1 mittels siRNA zu einem verringerten Zellwachstum führt [49]. Um langfristige Effekte eines PGRMC1-Knockouts zu analysieren, wurden in dieser Arbeit zwei stabile MCF-7/PGRMC1-KO Zelllinien untersucht, die im Vorfeld der Arbeit mittels CRISPR/Cas9 erzeugt wurden.

Die Vollständigkeit des PGRMC1-Knockouts wurde für diese Arbeit erneut auf Proteinebene mittels Western Blot validiert.



**Abb. 19: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten von MCF-7, MCF-7/PGRMC1-KO5, MCF-7/PGRMC1-KO6.** Detektion von Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) und Östrogen Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin. Molekulargewicht in kDa. Knockout-5/6 (KO-5/6).

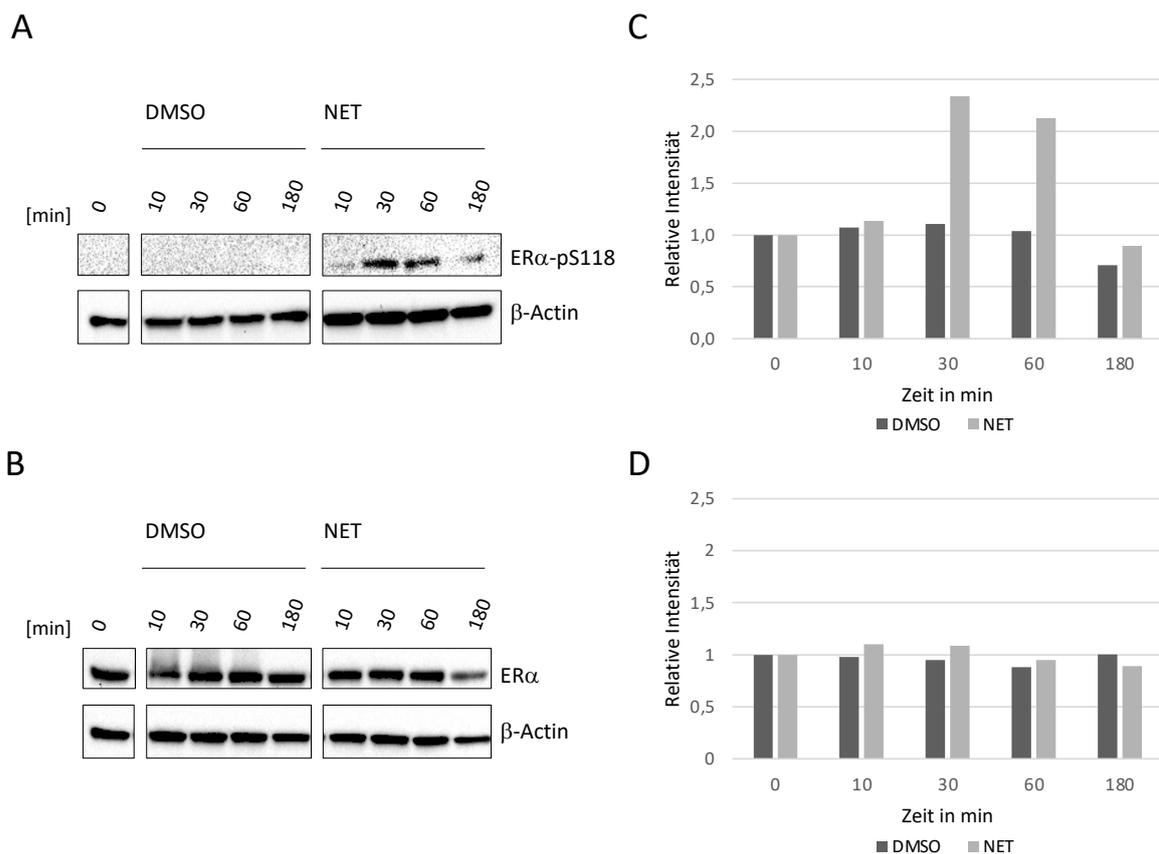
In der Western Blot Analyse der Zelllinien MCF-7/PGRMC1-KO5 und MCF-7/PGRMC1-KO6 war kein PGRMC1 zu detektieren. Damit wurde der vollständige *Knockout* von PGRMC1 in den beiden Zelllinien auf Proteinebene bestätigt.

Neben der Bestätigung des Knockouts von PGRMC1 sollte auch die ER $\alpha$ -Expression nach PGRMC1-Knockout im Vergleich zu MCF-7 untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass in MCF-7 eine deutliche Expression von ER $\alpha$  detektiert werden konnte. In

MCF-7/PGRMC1-KO6 konnte ebenfalls ER $\alpha$  sehr deutlich detektiert werden. Dagegen ließ sich in MCF-7/PGRMC1-KO5 nur eine deutlich schwächere Menge an ER $\alpha$  darstellen. Daher kann angenommen werden, dass MCF-7/PGRMC1-KO5 nur eine geringe Menge ER $\alpha$  exprimieren, während die ER $\alpha$ -Expression in MCF-7/PGRMC1-KO6 der von MCF-7 annähernd gleicht.

### 3.4.2 PGRMC1 ist nicht essenziell bei der NET-vermittelten ER $\alpha$ -Phosphorylierung in MCF-7

Um zu überprüfen, ob PGRMC1 bei der NET-vermittelten ER $\alpha$ -Aktivierung eine Rolle spielt, wurde die Stimulation der Zellen und anschließende Detektion von ER $\alpha$ -pS118 am Beispiel von MCF-7/PGRMC1-KO6 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen, wie in 3.3.1 beschrieben, mit NET bzw. DMSO für einen Zeitraum von 10 - 180 min stimuliert. Anschließend wurde die Menge von ER $\alpha$  und ER $\alpha$ -pS118 mittels Western Blot analysiert. Der Versuch wurde in zwei biologischen Replikaten durchgeführt.



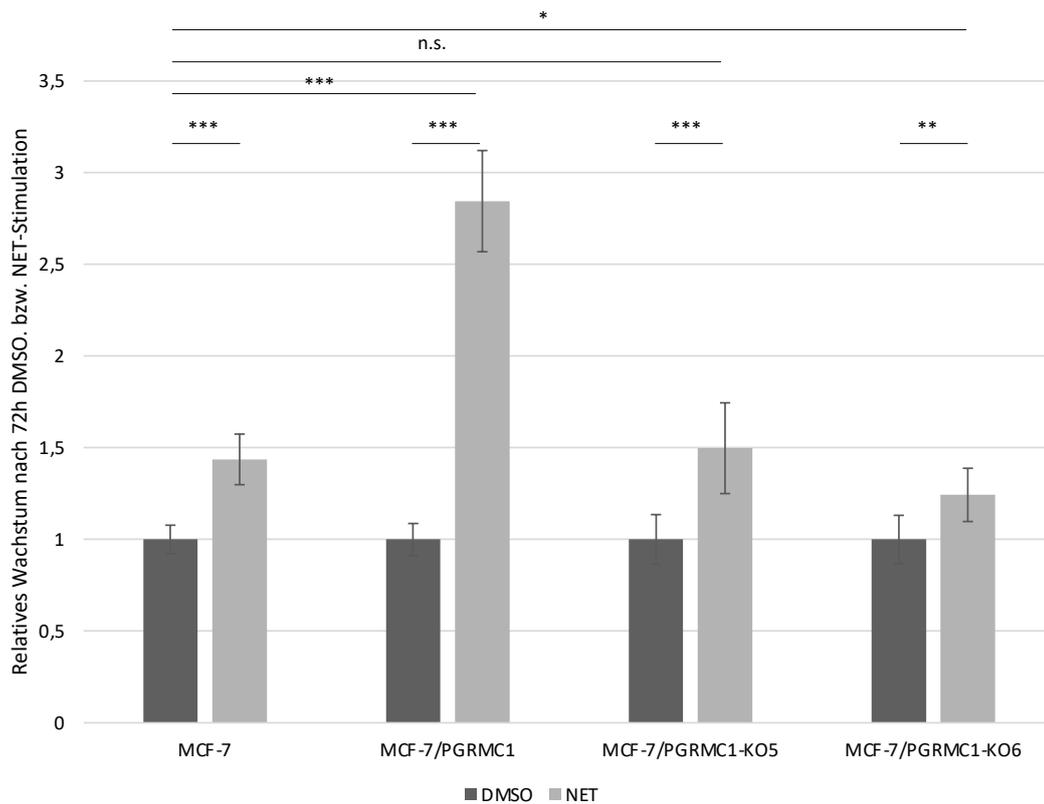
**Abb. 20: Western Blot Analyse von Ganzzell-Lysaten von MCF-7/PGRMC1-KO6.** MCF-7/PGRMC1-KO6-Zellen wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $10^{-6}$  M) oder Norethisteron (NET) ( $10^{-6}$  M) für einen Zeitraum von 10 - 180 min behandelt. Detektion von (A) Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ , phosphoryliert an Serin-118 (ER $\alpha$ -pS118) und (B) Gesamt-Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin. Zeit in min. C: Relative Intensität der detektierten ER $\alpha$ -pS118-Bande, normalisiert jeweils auf die detektierte  $\beta$ -Actin-Bande. Darstellung in Verhältnis zum Zeitpunkt 0 min (Intensität zum Zeitpunkt 0 min  $\pm$  1). D: Relative Intensität der detektierten ER $\alpha$ -Bande, normalisiert jeweils auf die detektierte  $\beta$ -Actin-Bande. Darstellung im Verhältnis zum Zeitpunkt 0 min (Intensität zum Zeitpunkt 0 min  $\pm$  1). Durchführung erfolgte in zwei biologischen Replikaten.

Eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erhöhte ER $\alpha$ -S118-Phosphorylierung konnte zwischen 10 min und 180 min NET-Stimulation detektiert werden, mit einem Maximum bei 30 min und 60 min. Nach DMSO-Stimulation war kein pER $\alpha$  detektierbar. Die detektierte Menge Gesamt-ER $\alpha$  blieb in der DMSO-Kontrolle sowie in der NET-Stimulation von 0 - 60 min konstant und zeigte dann eine geringere Ausprägung nach 180 min.

Die Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 durch Stimulation mit NET auch unabhängig von der PGRMC1-Expresion erfolgt. Dabei zeigte sich die größte Menge an ER $\alpha$ -pS118 nach einem Stimulationszeitraum von 30 - 60 min, während die Gesamtmenge von ER $\alpha$  nach 180 min abfiel. Folglich ließ sich der gleiche Verlauf der Phosphorylierung in MCF-7/PGRMC1-KO6 beobachten wie in MCF-7/PGRMC1.

#### 3.4.3 Auswirkung des *Knockouts* von PGRMC1 auf die Zellproliferation nach NET-Stimulation in MCF-7

Vorarbeiten konnten zeigen, dass MCF-7/PGRMC1 auf Stimulation mit NET mit einem deutlichen stärkeren Wachstum reagieren als die Leervektorkontrolle [76]. In folgendem Experiment wurde die Auswirkungen des *Knockouts* von PGRMC1 in MCF-7 auf die Proliferation nach der Stimulation mit NET untersucht. Zu diesem Zweck wurde die mitochondriale Redoxaktivität als Surrogat für Zellproliferation von MCF-7, MCF-7/PGRMC1, MCF-7/PGRMC1-KO5 und MCF-7/PGRMC1-KO6 nach Stimulation mit NET bzw. DMSO-Kontrolle mittels MTT-Assay analysiert. Der Versuch wurde in zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Triplikaten durchgeführt.



**Abb. 21: Quantitative Auswertung einer Wachstumsanalyse nach Stimulation mit NET und DMSO-Kontrolle für 72h mittels MTT-Assay.** Die Messung wurde in zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Triplikaten durchgeführt. Messung des Wachstumsverhaltens nach Stimulation mit NET von MCF-7, MCF-7/PGRMC1, MCF-7/PGRMC-KO5 und MCF-7/PGRMC1-KO6. Relativer Vergleich zwischen jeweiliger Norethisteron (NET)-Stimulation und Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kontrolle, die gemessene Intensität der DMSO-Kontrolle entspricht 1. Signifikanz wurde mittels zweifacher Varianzanalyse und Post-Hoc-Test nach Bonferroni überprüft, dabei entspricht jeweils: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ ; n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant/  $p > 0,05$ .

Die Analyse des MTT-Assays bestätigte, dass MCF-7 und MCF-7/PGRMC1 eine signifikant erhöhte Proliferation nach der Stimulation mit NET im Vergleich zu der Kontrolle mit DMSO zeigten. Eine signifikant gesteigerte Proliferation nach Stimulation mit NET konnte auch in MCF-7/PGRMC1-KO5 sowie in MCF-7/PGRMC1-KO6 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet werden. In MCF-7/PGRMC1 zeigte sich allerdings eine etwa 2,5fache Steigerung der Proliferation, während in MCF-7/PGRMC1-KO5, MCF-7/PGRMC1-KO6 und in der parentalen Zelllinie MCF-7 nur eine geringe Steigerung von etwa 50 % bzw. 25 % zu beobachten war.

Im MTT-Assay konnte bestätigt werden, dass die Überexpression von PGRMC1 in MCF-7 zu einem erhöhten proliferativen Ansprechen auf NET-Stimulation führte. Der *Knockout* von PGRMC1 scheint jedoch keinen messbaren Einfluss auf das Ansprechen von MCF-7 auf die Stimulation mit NET zu haben.

## 4 Diskussion

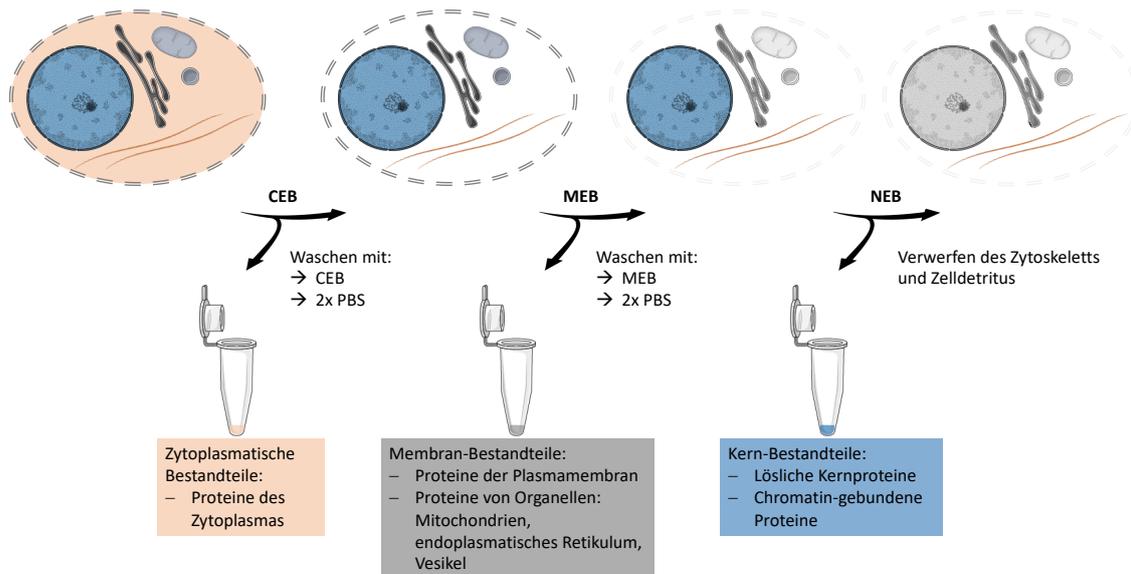
### 4.1 Etablierung der subzellulären Fraktionierung erfolgte in MCF-7-Zellen

#### 4.1.1 Subzelluläre Fraktionierung konnte erfolgreich in MCF-7 etabliert werden

Um die Lokalisation von ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 in Brustkrebszellen bestimmen zu können, sollte in dieser Arbeit zunächst die subzelluläre Fraktionierung der kultivierten Brustkrebszelllinie MCF-7 etabliert werden. Zur Fraktionierung kultivierter Zellen gibt es eine Reihe verfügbarer Methoden und kommerziell erhältlicher Kits. In dieser Arbeit wurde das Kit von Thermo Fisher Scientific für die Fraktionierung der Zelllinie MCF-7 angepasst und ein Antikörpergemisch zur Verifizierung der Fraktionen etabliert.

Die Isolierung subzellulärer Kompartimente stellt einen wichtigen Schritt in der Untersuchung von Proteinlokalisationen und Protein-Protein-Interaktionen dar. Dazu werden unterschiedliche Eigenschaften der Zellkompartimente, wie Größe, Dichte und Membranzusammensetzung genutzt, um eine schrittweise Auftrennung zu erreichen. Typischerweise werden dazu verschiedene Detergenzien und Zentrifugationsschritte verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete Kit ist dazu vorgesehen fünf Fraktionen herzustellen: zunächst erfolgt die Isolierung des Zytoplasmas, dann der Plasmamembran und der intrazellulären Membranen. Anschließend können dann Kernproteine und Chromatin-gebundene Proteine sowie schlussendlich zytoskelettale Proteine isoliert werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Kompartimente Zytoplasma, Membranbestandteile und Kern gelegt. Daher wurde die Fraktionierung an die Isolation ausschließlich dieser Kompartimente adaptiert (3.1.3). Zunächst wurden nach dem Protokoll des Herstellers die zytoplasmatische Fraktion sowie die Membran-Fraktion isoliert. Anschließend wurden die löslichen Kernproteine mit den Chromatin-gebundenen Kernproteinen in einer Fraktion vereint, während die zytoskelettalen Proteine verworfen wurden.



**Abb. 22: Methodik der subzellulären Fraktionierung von MCF-7/PGRMC1.** Das Hinzugeben von Cytoplasmic extraction buffer (CEB) führt zur Permeabilisierung der Plasmamembran, durch Zentrifugation können freie Proteine des Zytoplasmas abgenommen werden, diese bilden die zytoplasmatische Fraktion. Nach Hinzugeben von Membrane extraction buffer (MEB) werden durch Zentrifugation die Proteine der Plasmamembran, sowie der intrazellulären Membranen, wie endoplasmatischem Retikulum, Vesikeln und Mitochondrien abgetrennt. Sie bilden die Membran-Fraktion. Im letzten Schritt werden nach Hinzugeben von Nuclear extraction buffer (NEB), Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) und Micrococcal nuclease (MNase) und Zentrifugation die löslichen Kernproteine sowie die Proteine des Chromatins zur Kern-Fraktion zusammengefügt. Der Rest des Zellpellets wurde verworfen. Waschschrte erfolge mit den jeweiligen Puffern und Phosphate buffered saline (PBS). Alle Puffer sowie PBS wurden zuvor mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor versetzt. Abbildung erstellt nach den Angaben des Herstellers [116].

Nach der Erhöhung der Reinheit der Fraktionen mittels zusätzlicher Waschschrte (4.1.3) und der Auswahl geeigneter Markerproteine (4.1.2) für die Verifizierung der erzeugten Fraktionen, konnte die subzelluläre Fraktionierung für MCF-7 und stabil transfizierte MCF-7 Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Lokalisation von  $\text{ER}\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 erfolgreich verwendet werden.

Das verwendete Kit unterliegt allerdings auch Einschränkungen. So ist es nicht möglich, eine weitere Unterteilung der Fraktionen in die einzelnen Organellen, mit Ausnahme des Kerns, vorzunehmen. Folglich ist eine genaue Zuordnung von Proteinen zu Organellen nicht möglich. Auch können intrazelluläre Membranen nicht von der Plasmamembran unterschieden werden, was relevant sein kann, um Signalwege nachvollziehen zu können. Zur ergänzenden Einschätzung der Lokalisation wurden daher in dieser Arbeit zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt.

#### 4.1.2 Detektion von Markerproteinen ist essenziell zur Analyse der subzellulären Fraktionierung

Um die Proteinexpression der Organellen nach der subzellulären Fraktionierung zu analysieren, werden die erzeugten Fraktionen mittels SDS-PAGE prozessiert und die Proteine mittels Western Blot dargestellt. Die üblichen Fraktionierungsverfahren, inklusive des in dieser Arbeit verwendeten Kits, können eine vollständige Aufteilung der zellulären Bestandteile in die angegebenen Fraktionen nicht garantieren. Daher ist es notwendig, die

erzeugten Fraktionen mittels Markerproteinen zu verifizieren [132]. Zu diesem Zweck werden üblicherweise Antikörper gegen Proteine verwendet, die eine charakteristische und gut untersuchte Lokalisation in der entsprechenden Zelllinie aufweisen. In dieser Arbeit sollten Proteine, die in MCF-7 dementsprechenden beschrieben sind, identifiziert werden. Diese Antikörper sollten möglichst simultan als Gemisch angewendet werden können.

In der Literatur wird häufig das Stoffwechsellenzym GAPDH als idealer Marker für das Zytoplasma beschrieben. In dieser Arbeit konnte allerdings keine zufriedenstellende Konzentrierung der GAPDH-Detektion in der zytoplasmatischen Fraktion erreicht werden. Zur Identifizierung der zytoplasmatischen Fraktion werden in der Literatur ebenso häufig Actin-Proteine verwendet. Sie werden als Teil des Zytoskeletts exprimiert [125] und sind an der Bildung von Actin-Filamenten beteiligt, daher werden sie nahezu ubiquitär exprimiert [119]. In dieser Arbeit wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin als Marker für die zytoplasmatische Fraktion etabliert (3.1.6).

Zur Identifizierung der Plasmamembran wurde E-Cadherin untersucht. E-Cadherin ist ein Oberflächenprotein, das einen notwendigen Bestandteil epithelialer Zellverbände darstellt [121]. MCF-7 wurden aus der Pleuraeffusion eines metastasierten Mamma-Karzinoms gewonnen [114]. Metastasierte Zellen haben häufig ihre epitheliale Integrität weitestgehend verloren, so können sie unter anderem durch eine Suppression der E-Cadherin Expression losgelöst aus ihrem epitheliale Umfeld proliferieren [133, 134]. Dem steht entgegen, dass MCF-7 in der Zellkulturflasche im Zellverband adhärent wachsen. Da zunächst nur eine niedrige E-Cadherin-Expression detektiert werden konnte, war anzunehmen, dass MCF-7 E-Cadherin supprimiert exprimieren. Im direkten Vergleich konnte jedoch herausgestellt werden, dass die Detektion von E-Cadherin besonders nach Ablösen der Zellen mittels Trypsin-EDTA deutlich geschwächt war. Dies lässt sich auf eine Degradierung der Oberflächenproteine durch die Aktivität von Trypsin zurückführen. Im Gegenteil dazu war die Detektion nach Ablösen mittels Zellschaber deutlich intensiviert möglich. Nach Etablierung des Ablöses mittels Zellschaber in das Protokoll der subzellulären Fraktionierung konnte E-Cadherin erfolgreich als Markerprotein für die Plasmamembran etabliert werden.

Zur vollständigen Verifizierung der Fraktionen sollte auch ein Markerproteine für intrazelluläre Organellen außerhalb des Zellkerns identifiziert werden. Häufig wird in der Literatur CALR detektiert, um das endoplasmatische Retikulum abzubilden. CALR ist ein hochkonserviertes Protein, welches in nahezu allen Zellen vorkommt [135]. CALR wurde sowohl in diversen Arbeiten als auch im *Human Protein Atlas* in MCF-7 ausschließlich im endoplasmatische Retikulum beschrieben und ist für dieses ein häufig genutzter Marker [122, 136]. CALR wurde daher in dieser Arbeit als Markerprotein für das endoplasmatische Retikulum identifiziert (3.1.1). Da der Fokus der nachfolgenden Untersuchungen in erster Linie auf der Differenzierung zwischen Plasmamembran, extranukleärem und

intranukleärem Raum bestand, war es nicht notwendig, sicherzugehen, dass auch andere Organellen sicher in der Membran-Fraktion enthalten sind. Daher wurde kein zusätzliches Markerprotein identifiziert. Je nach Fragestellung kann es aber notwendig werden, zu prüfen, ob das Organell von Interesse tatsächlich in der Membran-Fraktion enthalten ist. In diesem Falle wäre die Etablierung eines geeigneten Markerproteins notwendig.

Zur Verifizierung der Kern-Fraktion wurde in dieser Arbeit H3 als Markerprotein identifiziert (3.1.1). H3 ist ein Teil der Gruppe der Histonproteine. Diese ebenfalls hochkonservierten Proteine sind als Histonoktamer Teil des Chromatins und dienen zur Verpackung der DNA sowie zur Regulation der Epigenetik [124]. Dementsprechend ist die Lokalisation von H3 im Kern als gesichert anzunehmen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass auch H3 zunächst im Zytoplasma synthetisiert wird, zur Translokation in den Kern werden anschließend die Kernporen genutzt [137]. Da die Proteine bereits vollständig gefaltet sein können, ist auch eine geringe Detektion von H3 außerhalb des Kerns unmittelbar nach der Synthese denkbar.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit erfolgreich vier Antikörper gegen charakteristische Markerproteine in MCF-7 zu Verifizierung der erzeugten Fraktionen identifizieren:  $\beta$ -Actin für die zytoplasmatische Fraktion, E-Cadherin und CALR für die Membran-Fraktion und H3 für die Kern-Fraktion (3.1.6). Ein Teil der identifizierten Antikörper kann als Gemisch aufgetragen werden, was es ermöglicht, Prozesse wie Schneiden der Membran und sequenzielles Belichten, einzusparen. Lediglich H3 sollte aufgrund unspezifischer Bindungen in Bereichen über 20 kDa isoliert inkubiert werden, um Fehlinterpretationen zu vermeiden (Abb. 6).

Um vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können, sollten Untersuchungen verschiedener Zelllinien mit derselben Methodik durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollte die subzelluläre Fraktionierung auf andere Zelllinien angewandt werden können. Wie oben bereits diskutiert, ist eine genaue Identifizierung der Fraktionen mittels Markerproteine unverzichtbar, um eine verlässliche und reproduzierbare Aussage über die Lokalisation von Proteinen zu treffen. Obwohl die Methodik der Fraktionierung selbst auf jede kultivierte Zelllinie übertragen werden kann, wurde in dieser Arbeit die Antikörpermischung speziell für die Anwendung in MCF-7 entwickelt.

#### 4.1.3 Etablierung zusätzlicher Waschschrte sind notwendig zur Auftrennung der Proteine

In dieser Arbeit sollten möglichst zuverlässige und reproduzierbare Aussagen zu der Lokalisation von Proteinen mittels subzellulärer Fraktionierung getroffen werden. Um dies zu ermöglichen, ist es essenziell, dass bei der Fraktionierung eine korrekte und möglichst vollständige Auftrennung der Organellen erfolgt. Der Hersteller des verwendeten Kits gibt an, dass produzierte Extrakte eine Kontamination von etwa 15 % aufweisen [116].

Allerdings wiesen die zunächst im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Extrakte eine sehr hohe Kontamination auf (3.1.2). Dies ließ sich insbesondere in der Darstellung der Proteine der zytoplasmatischen und Membran-Fraktion erkennen, welche auch in den folgenden Fraktionen detektierbar waren. Um die Aussagekraft der Fraktionierung zu erhöhen, musste die Kontamination folglich minimiert werden.

Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Waschschriffe eingeführt, um die Kontamination der Extrakte zu minimieren und die Aussagekraft zu erhöhen (3.1.5). Dadurch konnte der Reinheitsgrad der Fraktionen deutlich erhöht werden. Dies wurde in dieser Arbeit an der Western Blot Analyse der Markerproteine festgemacht. Da die Proteinkonzentration der extrahierten Lysate allerdings ohnehin niedrig war, konnte eine weitere Intensivierung der Waschschriffe nicht durchgeführt werden, ohne die nachfolgenden Analyseschritte aufgrund unzureichender Proteinmenge negativ zu beeinflussen.

#### 4.1.4 Kein Nachweis von ER $\alpha$ -pS118 nach subzellulärer Fraktionierung möglich

Zur Analyse der enthaltenen Proteine in den Fraktionen sollten die erzeugten Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot prozessiert werden. Dazu wird zunächst die Proteinkonzentration bestimmt. Die Messung der Proteinkonzentration der Extrakte führte regelmäßig zu einer sehr geringen Proteinkonzentration (Daten nicht gezeigt). Denkbare Ursachen für den Verlust der Proteine wäre zum einen eine Degradierung der Proteinstruktur, sowie ein mechanischer Verlust beim Abnehmen der Überstände. Trotz Normalisierung auf jeweils einen Fraktionsmarker wäre es denkbar, dass Proteine nicht nachweisbar waren aufgrund des Proteinverlusts in den verschiedenen Schritten der Fraktionierung, was Einschränkungen für die Analyse zu Folge haben kann.

Um eine Untersuchung phosphorylierter Proteine zu ermöglichen, wurde allen Detergenzien und Waschlösungen Phosphatase-Inhibitor hinzugefügt. Dennoch war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, ER $\alpha$ -pS118 nach subzellulärer Fraktionierung im Western Blot zu detektieren. Möglichkeiten zur besseren Darstellbarkeit von geringen Proteinmengen und posttranslationalen Modifizierungen, wie Phosphoproteinen, sollten zur fortgeschrittenen Analyse in fortführenden Arbeiten evaluiert werden.

## 4.2 Lokalisation von PGRMC1 und PHB2 in MCF-7 ist konstant nach NET-Stimulation

### 4.2.1 PGRMC1 ist in der Membran-Fraktion von MCF-7 lokalisiert

Im Anschluss an die Etablierung der subzellulären Fraktionierung sollte in dieser Arbeit die Lokalisation von PGRMC1 in MCF-7 untersucht werden. Zur deutlicheren Darstellung des

Proteins im Western Blot wurden die Versuche in MCF-7/PGRMC1 durchgeführt. Der *Human Protein Atlas* lokalisierte PGRMC1 im endoplasmatischen Retikulum in diversen Zelllinien und zusätzlich in Glioblastomzellen, Osteosarkomzellen und epidermoiden Karzinomzellen in den Nucleoli [127]. Hand *et al.* beschrieben PGRMC1 in MCF-7 im endoplasmatischen Retikulum, wo es apoptotische Effekte vermittelt [59], während Wu *et al.* PGRMC1 in humanen Endometriumzellen in der Kernmembran, dem Zytoplasma und im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten [138].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PGRMC1 in MCF-7 in der subzellulären Fraktionierung in der Membran-Fraktion lokalisiert ist (3.2.2). Die Ergebnisse der Fraktionierung wurden untermauert von der Immunfluoreszenzfärbung. Dort war PGRMC1 perinukleär am prominentesten zu sehen, mit Ausläufern in die Zellperipherie. Dies ist mit einer Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum, welches sich zum Großteil perinukleär befindet, vereinbar [139].

In der Immunfluoreszenzfärbung konnte zusätzlich phosphoryliertes PGRMC1 in den Signalausparungen der DAPI-Färbung im Zellkern detektiert werden. Diese Signalausparungen lassen sich mit der Lokalisation der Nucleoli vereinbaren, welche aufgrund einer geringen DNA-Dichte reduziert von DAPI angefärbt werden können [140-142]. Beausoleil *et al.* detektierten phosphoryliertes PGRMC1 in Kernextrakten von HeLa-Zellen [143], Sabbir beschrieb nach nicht-reduzierender Gelelektrophorese PGRMC1 mit einer Proteinmasse von 70 kDa und 100 kDa im Kern von HEK-293-Zellen [60].

Im Gegensatz dazu steht, dass nicht-phosphoryliertes PGRMC1 nicht im Kern nachgewiesen werden konnte. Dies wurde sowohl in der Immunfluoreszenzfärbung als auch in der subzellulären Fraktionierung beobachtet. Ob PGRMC1 bei der Phosphorylierung eine Konformitätsänderung durchlaufen hat, welche zu einem falsch negativen Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung durch den Antikörper gegen PGRMC1 führte oder ob es sich um eine unspezifische Bindung des Antikörpers gegen Anti-PGRMC1-pS181 handelte, konnte bisher nicht eruiert werden. Ob PGRMC1-pS181 auch in der Kern-Fraktion in der subzellulären Fraktionierung im Western Blot detektierbar ist und aus welchem Grund das phosphorylierte Protein nicht von dem verwendeten Antikörper gegen PGRMC1 detektiert wird, sollte in nachfolgenden Studien untersucht werden. Quantitativ analysiert werden sollte ebenfalls die Ausprägung der PGRMC1-Phosphorylierung an S181 nach Stimulation mit NET mittels durchflusszytometrischer Messungen.

In dieser Arbeit sollte auch die Lokalisation von PGRMC1 in MCF-7 nach NET-Stimulation untersucht werden. Der Einfluss von Steroidhormonen auf die Expression von PGRMC1 wurde bereits vielfach beschrieben, so wird unter anderem die Transkription von PGRMC1 im Hypothalamus durch Aktivierung des PRs unterdrückt [52]. Zudem ist die PGRMC1-Expression im Hypothalamus von PR-KO Mäusen erhöht [144]. Die Lokalisation von PGRMC1 wurde bereits mehrfach untersucht. Min *et al.* vermuteten bereits 2004, dass

PGRMC1 die Lokalisation innerhalb der Zelle wechseln und damit auch seine Funktion und Interaktionspartner beeinflussen kann [145]. Auch Peluso *et al.* beschrieben die Translokation von PGRMC1 in Granulosa-Zelllinien [57]. Ursache und Regulation der subzellulären Lokalisation von PGRMC1 sind bisher kaum bekannt. In dieser Arbeit konnte keine Translokation von PGRMC1 in eine andere Fraktion nach NET-Stimulation beobachtet werden. Dieses Ergebnis lässt sich sowohl aus der Analyse der subzellulären Fraktionierung als auch der Immunfluoreszenzfärbung schließen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Einfluss von PGRMC1 auf die erhöhte Viabilität und die verstärkte Proliferation von PGRMC1-überexprimierenden MCF-7 auf Interaktionen beruht, die außerhalb des Kerns stattfinden (4.3.4) [76].

#### 4.2.2 PHB2 ist in der Membran-Fraktion von MCF-7 lokalisiert

Neueste Vorarbeiten stellten eine vermehrte Interaktion von PGRMC1 und PHB1 bzw. PHB2 nach Stimulation mit NET in MCF-7 fest [110, 112]. Um die zugrunde liegenden Interaktionen und Signalwege genauer zu beleuchten, wurde in dieser Arbeit neben der Lokalisation von PGRMC1 auch die von PHB2 in MCF-7 untersucht. Prohibitine wirken als Ko-Repressoren an der AF-2-Domäne auf die ER $\alpha$ -Aktivität [78]. Dabei wird die Aktivierung von ER $\alpha$  als Transkriptionsfaktor unterdrückt, PHB1 und PHB2 wirken dabei gegensätzlich zu der Aktivität der Ko-Aktivatoren [105]. Dazu korrelierend wurde eine signifikante Erhöhung der E2-regulierten Genexpression in MCF-7 nach transientem *Knockdown* von PHB2 beschrieben [105]. He *et al.* zeigten allerdings auch eine direkte, Hormon-unabhängige Interaktion zwischen ER $\alpha$  und PHB2 in 293T-Zellen [105].

Mittels subzellulärer Fraktionierung konnte PHB2 in dieser Arbeit in MCF-7/PGRMC1 in der Membran-Fraktion detektiert werden. Dieses Ergebnis korreliert mit einigen anderen Untersuchungen. So konnten Kasashima *et al.* Prohibitine in den Mitochondrien von HeLa-Zellen [107], Coates *et al.* in den Mitochondrien von Fibroblasten nachweisen [146]. Auch der *Human Protein Atlas* beschrieb PHB2 in den Mitochondrien [128]. Die Membran-Fraktion schließt auch intrazelluläre Membranen und damit auch mitochondriale Proteine ein. Da in dieser Arbeit die Mitochondrien nicht isoliert wurden, konnte die Lokalisation von PHB2 in MCF-7 nicht eindeutig auf Mitochondrien eingegrenzt werden. Des Weiteren wurde in der Versuchsanordnung, in der PHB2 in der subzellulären Fraktionierung detektiert wurde, das Markerprotein CALR nicht detektiert. Die Ergebnisse stehen aber im Einklang mit einer möglichen Lokalisation von PHB2 in den Mitochondrien.

Da Bai *et al.* vor kurzer Zeit beschrieben, dass die Interaktion zwischen PGRMC1 und PHB2 nach NET-Stimulation signifikant gesteigert war [112], sollte in dieser Arbeit anschließend die Lokalisation von PHB2 nach Stimulation mit NET untersucht werden. In der subzellulären Fraktionierung konnte nach Stimulation mit NET keine signifikante Translokation von PHB2 in eine andere Fraktion beobachtet werden. Diese Beobachtung lässt annehmen, dass in MCF-7/PGRMC1 unter diesen Bedingungen PHB2 nicht nach NET-

Stimulation in den Zellkern transloziert. Dies widerspricht in Teilen den Ergebnissen von Kasashima *et al.*, die PHB2 sowohl in den Mitochondrien als auch im Kern von MCF-7 lokalisieren konnten [107]. Kasashima *et al.* zeigten auch, dass PHB2 in HeLa-Zellen nach ER $\alpha$ -Transfektion und E2-Stimulation in den Kern transloziert [107]. Ob die Stimulation von MCF-7 mit E2 zu einer Translokation von PHB2 in der subzellulären Fraktionierung in die Kern-Fraktion führt, sollte in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden.

### 4.3 ER $\alpha$ wird nach NET-Stimulation unabhängig von PGRMC1 an S118 phosphoryliert und transloziert in den Zellkern

#### 4.3.1 Bedeutung der Phosphorylierung von ER $\alpha$ an S118

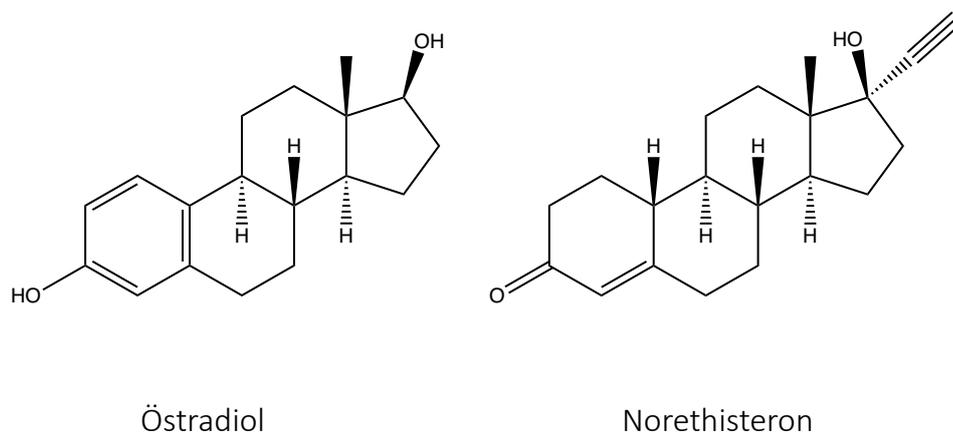
Der Phosphorylierungsstatus von ER $\alpha$  an S118 beeinflusst die Prognose und gibt Hinweise auf das Outcome von Brustkrebserkrankungen [147]. So konnten Murphy *et al.* in retrospektiven Studien zeigen, dass ER $\alpha$ -pS118 häufiger in Tumorzellen mit intaktem ER $\alpha$ -Signalwegen, also differenzierteren Tumoren, detektiert wurde [148]. Ebenfalls konnten sie einen Zusammenhang zwischen einer Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 und besserem Outcome bei Tamoxifen-Therapie in Brustkrebspatientinnen zeigen [148]. Kok *et al.* stellten in einer randomisierten kontrollierten Studie darüber hinaus fest, dass verlängertes rezidivfreies Überleben nach Tamoxifen-Therapie nur bei Tumoren mit hohem ER $\alpha$ -pS118-Expressionsniveau gelang [104]. Ein Zusammenhang zwischen der ER $\alpha$ -pS118-Expression und Tumorprogress bzw. rezidivfreiem Überleben konnte hingegen bei Patientinnen ohne Tamoxifen-Therapie nicht festgestellt werden [104]. Die Phosphorylierung an S118 erhöht unter anderem die Sensibilität gegenüber E2 [149] und führt zur Bindung von ER $\alpha$  an verschiedene Ko-Aktivatoren [150]. Diese Arbeit untersuchte die Zeitkinetik der Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 in MCF-7 nach der Stimulation mit dem Progestin NET und beleuchtete die funktionelle Konsequenz *in vitro*.

Es konnte gezeigt werden, dass in MCF-7/PGRMC1 nach Stimulation mit NET ER $\alpha$  an S118 phosphoryliert wird (3.3.1). Ein im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikanter Anstieg der Intensität der ER $\alpha$ -pS118-Bande konnte nach 30 min sowie 60 min detektiert werden, danach fiel das Phosphorylierungslevel wieder ab. Nach DMSO-Stimulation war an keinem Zeitpunkt eine vermehrte Phosphorylierung an S118 detektierbar. In der Immunfluoreszenzfärbung ist auch nach DMSO-Stimulation eine gewissen Grunddichte an ER $\alpha$ -pS118 detektierbar, die deutlich zunimmt nach NET-Stimulation. Dieses Ergebnis ließ sich allerdings im Western Blot nicht reproduzieren. In nachfolgenden Studien sollte untersucht werden, ob unter anderen Bedingungen im Western Blot ER $\alpha$ -pS118 nach subzellulärer Fraktionierung, sowie in der Zeitkinetik nach DMSO-Stimulation detektierbar ist.

Es ist bekannt, dass ER $\alpha$  durch eine längere Stimulation mit E2 herabreguliert wird [151]. In dieser Arbeit wurde analysiert, welche Auswirkung die Stimulation mit NET für 0 - 180 min auf die ER $\alpha$ -Expression hat. Die Analyse führte zu dem Ergebnis, dass die ER $\alpha$ -Menge zwischen 0 min und 60 min nahezu konstant auf hohem Niveau liegt. Nach 180 min ist eine nicht signifikante Reduktion der ER $\alpha$ -Expression zu beobachten. Dies korreliert mit der bisherigen Forschung zur Herabregulation von ER $\alpha$  nach E2-Stimulation. So beschrieben bereits Borrás *et al.* für ER $\alpha$  eine Halbwertszeit von circa 180 min in MCF-7 nach der Stimulation mit E2. Dieser Effekt wurde auch beschrieben, wenn E2 nach einer Stimulationszeit von 60 min entfernt wurde; eine einmalige Aktivierung des Rezeptors scheint also für eine konsekutive Herabregulation ausreichend zu sein [151]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass auch nach Stimulation mit NET die ER $\alpha$ -Expression nach 180 min herabreguliert wird. Dieser Effekt sollte in weiteren Studien unter anderem auf mRNA-Ebene bestätigt werden.

#### 4.3.2 Tetrahydroderivate von NET haben eine Östrogen-ähnliche Wirkung auf ER $\alpha$

Die extra- und intrazellulären Mechanismen der ER $\alpha$ -Aktivierung durch Bindung des endogenen Liganden E2 sind bereits sehr detailliert analysiert worden. Wenig untersucht wurde bisher die Phosphorylierung von ER $\alpha$  nach Stimulation mit NET und die funktionelle Konsequenz für die Zelle. Diese Arbeit konnte eine vermehrte Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 nach NET-Stimulation in MCF-7 beobachten. NET ist als Progestin strukturverwandt zu den physiologischen humanen Steroidhormonen. Daher muss diskutiert werden, ob die beobachteten Effekte direkt durch eine Aktivierung von Proteinen wie PGRMC1 durch NET verursacht werden oder ob zunächst eine Umwandlung von NET in einen aktiven Metaboliten erfolgt.



**Abb. 23: Strukturmodelle von Östradiol und Norethisteron;** erstellt nach Köhrlé *et al.* [28] und Birkhäuser *et al.* [152].

Chávez *et al.* beschrieben bereits 1985 die Stereospezifität von NET. Dabei stellten sie fest, dass NET nicht direkt mit dem zytosolischen Östrogen-Rezeptor interagiert [153]. Gual *et*

*al.* konnten allerdings im Jahr 1962 auch keine enzymvermittelte Aromatisierung und folglich keine Umwandlung von NET in Östrogen feststellen [154]. Allerdings konnte eine Umwandlung von 19-Nor-Progestinen in A-Ring-reduzierte Tetrahydroderivate gezeigt werden, welche eine Östrogen-ähnliche Wirkung haben [155-157]. Lemus *et al.* konnten in Osteoblasten eine Umwandlung von NET in  $3\alpha,5\alpha$ -NET und  $3\beta,5\alpha$ -NET zeigen, welche eine ähnlich hohe Affinität zu Östrogen-Rezeptoren aufwiesen wie E2 [158]. Auch Larrea *et al.* konnten in HeLa-Zellen eine Aktivierung von ER $\alpha$  durch  $3\beta,5\alpha$ -NET zeigen [159].

Auch die Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 könnte Teil dieses Mechanismus sein. Lemus *et al.* Beobachtungen der Umwandlung von NET belegten die Notwendigkeit einer  $5\alpha$ -Reduktion von NET [158]. Auch in MCF-7 konnte das Vorkommen der  $5\alpha$ -Reduktase nachgewiesen werden [160, 161]. Daher vermuteten bereits Vilchis *et al.* 1986, dass der Östrogen-ähnliche Effekt von NET in MCF-7 durch die Umwandlung in  $3\beta,5\alpha$ -NET teilweise erklärt werden kann [157]. Es wurde bereits gezeigt, dass in der ebenfalls ER $\alpha$ -positiven Brustkrebszelllinie T-47D eine Umwandlung von NET zu  $3\beta,5\alpha$ -NET erfolgt, was eine direkte ER $\alpha$ -Aktivierung zur Folge haben könnte [162]. Dies könnte den proliferativen Effekt von NET auch auf andere ER $\alpha$ -positive Brustkrebszellen wie MCF-7 teilweise erklären. Auch könnte die Kerntranslokation von ER $\alpha$  nach NET-Stimulation, welche in dieser Arbeit in der subzellulären Fraktionierung gezeigt wurde, durch eine Östrogen-artige, direkte Wirkung von  $3\beta,5\alpha$ -NET auf ER $\alpha$  erklärt werden.

Viele Ergebnisse deuten also darauf hin, dass der stimulierende Effekt von NET auf MCF-7 unter anderem durch eine Östrogen-ähnliche Wirkung nach Umwandlung in aktive Metaboliten begründet liegt. Allerdings scheint dies nicht der einzige stimulierende Mechanismus zu sein. So beschrieben Willibald *et al.* ein verstärktes Ansprechen von MCF-7/PGRMC1 auf Stimulation mit NET im Vergleich zu der Leervektorkontrolle [76]. Die Aktivierung von Interaktionspartnern von ER $\alpha$  stellt daher dennoch einen relevanten Aktivierungsmechanismus von ER $\alpha$  und damit einen proliferationsfördernden Faktor dar.

#### 4.3.3 ER $\alpha$ transloziert aus der Membran-Fraktion in die nukleäre Fraktion nach NET-Stimulation

Da die Lokalisation von Rezeptoren unmittelbar die Funktion beeinflusst, sollte in dieser Arbeit die Lokalisation des Hormonrezeptors ER $\alpha$  untersucht werden. ER $\alpha$  gehört zu den nukleären Hormonrezeptoren und liegt damit, wie alle Steroidhormonrezeptoren, intrazellulär vor [163]. In verschiedenen Zelllinien, unter anderem in MCF-7, beschrieb der *Human Protein Atlas* ein Vorkommen von ER $\alpha$  in Vesikeln [126, 164, 165]. Eine geringe Menge des ER $\alpha$  assoziiert nach Palmitoylierung an die Plasmamembran und reagiert dort auf E2-Stimulation [166]. Mittels subzellulärer Fraktionierung konnte diese Arbeit bestätigen, dass ER $\alpha$  nach DMSO-Stimulation in der Membran-Fraktion vorliegt. Die oben genannten Lokalisationen werden in der Membran-Fraktion miterfasst. Obwohl ER $\alpha$  auch

sehr häufig im Zytoplasma beschrieben wurde [167, 168], konnte in der subzellulären Fraktionierung nur sehr wenig ER $\alpha$  in der zytoplasmatischen Fraktion abbildet werden. Die Bindung des endogenen Liganden E2 führt zu einer Dissoziation von ER $\alpha$  und dem stabilisierenden Hitzeschockprotein, konsekutiv zu einer Translokation von ER $\alpha$  in den Zellkern [169, 170]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil von ER $\alpha$  auch nach der Stimulation mit NET in die nukleäre Fraktion transloziert. Dort kann der Rezeptor seine Effekte auf die Transkription von Zielgenen entfalten. Ein Teil von ER $\alpha$  ließ sich weiterhin in der Membran-Fraktion detektieren (3.3.2).

In der Immunfluoreszenzfärbung ließ sich im Gegensatz zu der subzellulären Fraktionierung in Ruhe ein Großteil von ER $\alpha$  im Kern detektieren. Nach Stimulation mit NET keine verstärkte Expression von ER $\alpha$  im Nukleus beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde für die Detektion von ER $\alpha$  in der Immunfluoreszenzfärbung jedoch derselbe Antikörper verwendet wie für die Detektion im Western Blot nach der subzellulären Fraktionierung. Eine mögliche Erklärung wäre dabei, dass ein großer extranukleärer Anteil von ER $\alpha$  in der Immunfluoreszenzfärbung nicht detektiert werden kann, da das Epitop durch Protein-Protein-Interaktionen blockiert wird. Diese Interaktion werden durch die Prozessierung der Proteine im Vorlauf des Western Blots aufgetrennt.

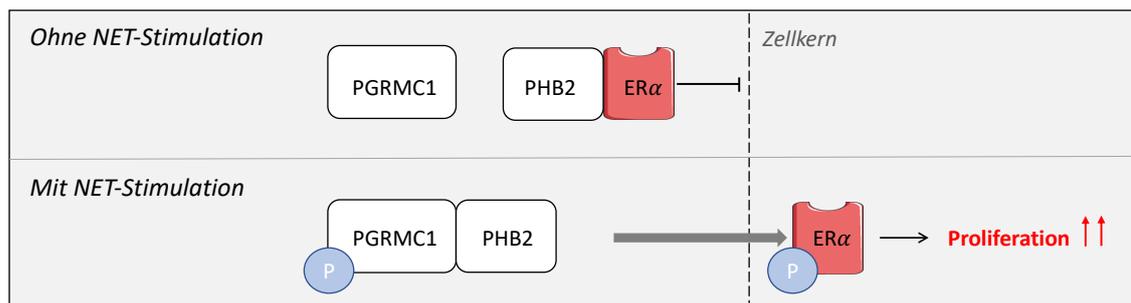
#### 4.3.4 Interaktion zwischen ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 vor und nach NET-Stimulation in MCF-7

Es wird vermutet, dass die Expression von PGRMC1 eine wichtige Rolle in der Regulation von ER $\alpha$ -positiven Tumoren spielt. Nach der Untersuchung der Lokalisation von PGRMC1, PHB2 und ER $\alpha$  sollte in dieser Arbeit mögliche Interaktionsmechanismen analysiert werden. Neubauer *et al.* beschrieben eine deutlich stärkere PGRMC1-Expression in ER $\alpha$ -negativen Tumorproben als in ER $\alpha$ -positiven Proben. Allerdings war das Phosphorylierungsniveau von PGRMC1 in ER $\alpha$ -positiven Tumoren deutlich höher als in ER $\alpha$ -negativen Tumoren [70]. Die ER $\alpha$ -positiven Brustkrebszelllinien MCF-7 und T-47D reagieren bei einer Überexpression von PGRMC1 deutlich stärker auf eine Stimulation mit NET verglichen zur jeweiligen Leervektorkontrolle als die Triple-Negative Zelllinie MDA-MB-231 [76].

Es spricht also viel für eine regulatorische Verbindung zwischen ER $\alpha$  und PGRMC1. Thomas *et al.* beschrieben deutlich Hinweise dafür, dass PGRMC1 als Verbindungsprotein zwischen Steroidrezeptoren und deren Signalwegen fungiert [54]. Ob allerdings eine direkte Interaktion besteht, ist bisher unklar. Eine Regulation kann auch über andere, ER $\alpha$ -aktivierende Signalwege erfolgen. Ahmed *et al.* beschrieben die Interaktion zwischen PGRMC1 und EGFR an der Zelloberfläche [171]. EGFR ist eine Tyrosinkinase und könnte für die Phosphorylierung von PGRMC1 verantwortlich sein. Auch ER $\alpha$  interagiert mit Kinasen des EGFR-Signalwegs. So beschrieben Kato *et al.* die Aktivierung von ER $\alpha$  mittels

Phosphorylierung durch MAPK, Teil des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs, welcher durch den *Epidermal Growth Factor* (EGF) aktiviert werden kann [83]. Da PGRMC1 in dieser Arbeit nicht im Kern lokalisiert werden konnte, während ER $\alpha$  nach NET-Stimulation in den Kern transloziert, ist anzunehmen, dass eine direkte Interaktion der beiden Proteine nicht im Zellkern stattfindet.

In dieser Arbeit konnte auch PHB2 in der Membran-Fraktion von MCF-7 detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen annehmen, dass ER $\alpha$  nach NET-Stimulation in den Zellkern transloziert (4.3.3). PHB2 und PGRMC1 verbleiben nach NET-Stimulation hingegen in der Membran-Fraktion. Auch Kim *et al.* beschrieben die Funktion von PHB2 als Inhibitor der Kerntranslokation von ER $\alpha$  [172]. Sie beschrieben die Interaktion zwischen dem Protein *Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3* (BIG3) und PHB2 nach Stimulation, was eine Interaktion zwischen PHB2 und ER $\alpha$  verhindert und so die Aktivierung von ER $\alpha$  ermöglicht [172-174]. Dieser Mechanismus kann auch für die Interaktion zwischen PGRMC1 und PHB2 angenommen werden, da Vorarbeiten eine erhöhte Interaktion zwischen PGRMC1 und PHB1 bzw. PHB2 nach NET-Stimulation zeigten [112].



**Abb. 24: Möglicher Interaktionsmechanismus zwischen ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 vor bzw. nach NET-Stimulation in Brustkrebszellen.** Nach Norethisteron (NET)-Stimulation wird das Protein Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) phosphoryliert, was zur Bindung an Prohibitin 2 (PHB2) führt. Daraufhin ist die Interaktion von PHB2 und Östrogen Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) unterbrochen. Folglich transloziert ER $\alpha$  in den Zellkern und kann dort proliferative Effekte entfalten. Phosphatgruppe (p).

Es scheint also, dass PHB2 in Abwesenheit stimulierender Hormone wie E2 und NET die Kerntranslokation von ER $\alpha$  inhibiert. Dies stellt die Hormon-abhängige Genexpression von E2-gesteuerten Genabschnitten sicher. Ein möglicher Mechanismus der NET-vermittelten, proliferationsfördernden Wirkung ist eine Phosphorylierung von PGRMC1, was zu einer Interaktion zwischen PGRMC1 und PHB2 führt. Folglich verliert PHB2 seine Bindung zu ER $\alpha$  und kann eine Kerntranslokation nicht mehr verhindern. Der Komplex aus PGRMC1 und PHB2 verbleibt extranukleär, während ER $\alpha$  in den Kern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann.

#### 4.4 *Knockout* von PGRMC1 führt nicht zu veränderter Proliferation von MCF-7 nach NET-Stimulation

##### 4.4.1 ER $\alpha$ wird nach NET-Stimulation unabhängig von PGRMC1 phosphoryliert

Die Überexpression von PGRMC1 hat einen starken Einfluss auf die Zellproliferation, besonders nach der Stimulation mit NET. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass dies mit einer Beeinflussung der ER $\alpha$ -Aktivierung in Zusammenhang steht [49]. Diese Arbeit sollte die funktionellen Konsequenzen des Verlustes von PGRMC1 untersuchen. Dazu wurde die Aktivierung von ER $\alpha$  anhand der Phosphorylierung an S118 in MCF-7 nach stabilem PGRMC1-*Knockout* untersucht. Diese Arbeit untersuchte dazu zwei verschiedene MCF-7/PGRMC1-KO Linien, welche im Voraus zu dieser Arbeit mittels CRIPR/Cas9-System generiert wurden.

Zunächst wurde die Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 nach Behandlung mit NET sowie mit DMSO als Negativkontrolle für 0 min bis 180 min in MCF-7/PGRMC1-KO untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von ER $\alpha$  nach Stimulation mit NET auch ohne die Anwesenheit von PGRMC1 in der Zelle ausgeprägt ist. Zu untersuchen ist, ob der kurzfristige *Knockdown* von PGRMC1 mittels siRNA zu einer Beeinflussung der Phosphorylierung von ER $\alpha$  führt. Dies würde zu der Annahme führen, dass der *Knockout* von PGRMC1 zu der Aktivierung von Kompensationsmechanismen in der Zelle führt, die eine Aktivierung von ER $\alpha$  ermöglichen. Dies würde auch einen Einfluss auf die Betrachtung von PGRMC1 als möglicher Angriffspunkt in der Brustkrebstherapie haben.

##### 4.4.2 Stimulation mit NET führt unabhängig von PGRMC1 zu einer gesteigerten Proliferation in MCF-7

Um zu untersuchen welche funktionellen Konsequenzen durch den *Knockout* von PGRMC1 in MCF-7 resultieren, wurde die Proliferation von zwei MCF-7/PGRMC1-KO-Zelllinien vor und nach NET-Stimulation untersucht. Zum Vergleich wurde gleichzeitig das proliferative Ansprechen von MCF-7 und MCF-7/PGRMC1 auf NET-Stimulation untersucht. Wie Willibald *et al.* bereits zeigen konnten [76], führte die Stimulation mit NET zu einer signifikant gesteigerten Proliferation in MCF-7. Nach NET-Stimulation der PGRMC1-überexprimierenden Zelllinie MCF-7/PGRMC1 konnte ebenfalls ein Anstieg der Proliferation beobachtet werden. Dieser zeigte sich gegenüber MCF-7 signifikant erhöht, was die Ergebnisse von Willibald *et al.* erfolgreich reproduzierte (3.4.3) [76]. Aus den Beobachtungen kann geschlossen werden, dass eine Überexpression von PGRMC1 zu einem verstärkten Ansprechen auf NET-Stimulation führt. Ein möglicher Mechanismus könnte eine verstärkte Interaktion mit PHB2 sein, welche zu einer verstärkten ER $\alpha$ -Aktivierung führt (s. 4.3.4).

Die Beobachtung der PGRMC1-Knockout-Zelllinien MCF-7/PGRMC1-KO5 und MCF-7/PGRMC1-KO6 zeigte eine signifikant gesteigerte Proliferation der Zelllinien nach NET-Stimulation (3.4.3). Allerdings ist nur im Vergleich der Zelllinien MCF-7 und MCF-7/PGRMC1-KO6 ein signifikanter Unterschied festzustellen, die gesteigerte Proliferation von MCF-7/PGRMC1-KO5 ähnelt der von MCF-7. Dies lässt eine PGRMC1-unabhängige Wirkung der NET-Stimulation auf die Proliferation von MCF-7 annehmen. Diese Ergebnisse lassen auch die Beobachtungen der Phosphorylierung von ER $\alpha$  der PGRMC1-Knockout-Zelllinien zu. Es scheint also, dass die Stimulation mit NET eine duale Wirkung auf die Zellen hat, welche nur zu einem Teil über eine Stimulation von PGRMC1 zu erklären ist.

## 4.5 Schlussfolgerung

Die Einnahme von Progesterin-haltiger Hormon-Ersatztherapie führt zu einem signifikant erhöhten Brustkrebsrisiko. Vorarbeiten haben gezeigt, dass sowohl die Expression von ER $\alpha$  wie auch der Proteine PGRMC1 und PHB2 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Progress von Brustkrebs spielen. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der zellulären Mechanismen der ER $\alpha$ -Aktivierung nach der Stimulation mit dem Progesterin NET sowie die Beleuchtung der Einflüsse durch PGRMC1 und PHB2 auf die ER $\alpha$ -Phosphorylierung und Aktivierung, sowie auf die Proliferation der Brustkrebszelllinie MCF-7.

Dazu wurde zunächst die Methode der subzellulären Fraktionierung in MCF-7 etabliert sowie ein Antikörper-Gemisch zur Identifizierung der erzeugten Fraktionen eingeführt. Im Anschluss wurde mittels subzellulärer Fraktionierung in MCF-7/PGRMC1 die Lokalisation von ER $\alpha$ , PGRMC1 und PHB2 vor und nach Stimulation mit NET untersucht. Dabei konnte diese Arbeit zeigen, dass ein signifikanter Teil von ER $\alpha$  nach Stimulation mit NET aus der Membran-Fraktion in die nukleäre Fraktion transloziert. PGRMC1 sowie PHB2 befinden sich ebenfalls in der Membran-Fraktion, zeigen jedoch keine Translokation nach Stimulation mit NET. Neben der Untersuchung der Lokalisation von ER $\alpha$ , wurde die Zeitkinetik der ER $\alpha$ -Phosphorylierung analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von ER $\alpha$  an S118 nach der NET-Stimulation über einen Zeitraum von 30 min bis 60 min am größten ist. Die Phosphorylierung nimmt dabei nach 180 min wieder ab.

Da PGRMC1-überexprimierende MCF-7-Zellen deutlich verstärkt proliferieren und ein verstärktes Ansprechen auf NET-Stimulation im Vergleich zur Leervektorkontrolle zeigen, untersuchte diese Arbeit die Folgen des *Knockouts* von PGRMC1 auf die Proliferation und ER $\alpha$ -Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der ER $\alpha$ -Phosphorylierung nach NET-Stimulation unabhängig von der PGRMC1-Expression in MCF-7 stattfindet. Ebenfalls konnte ein ähnlich proliferatives Ansprechen nach PGRMC1-*Knockout* beobachtet werden wie in MCF-7-Zellen. Es ist also anzunehmen, dass die Stimulation mit NET zu einer dualen Wirkung auf die Zellen führt. Zu einem Teil scheint die Steigerung der Proliferation in Zusammenhang mit einer Überexpression von PGRMC1 zu stehen und an eine ER $\alpha$ -Expression gebunden zu sein. Dieser Mechanismus könnte durch eine vermehrte Interaktion von PGRMC1 und PHB2 nach NET-Stimulation erklärt werden, welche zu einer vermehrten ER $\alpha$ -Aktivierung führt. Andererseits scheint eine NET-Stimulation auch unabhängig der PGRMC1-Expression eine proliferative Wirkung auf MCF-7 zu haben, was durch die Untersuchung von PGRMC1-*Knockout*-Zelllinien gezeigt werden konnte.

Die zellulären Mechanismen der PGRMC1-Wirkung, ER $\alpha$ -Aktivierung und der intrazellulären Interaktion der Proteine über das regulatorische Protein PHB2 bedürfen daher noch weiterer Untersuchungen in zukünftigen Arbeiten.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. *Breast cancer by the numbers*. P t, 2014. **39**(3): p. 213-4.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
4. Sinn, H.-P. and H. Kreipe, *A brief overview of the WHO classification of breast tumors*. Breast care, 2013. **8**(2): p. 149-154.
5. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020, AWMF Registernummer: 032-045OL*. [abgerufen am 20.07.2020]; Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>.
6. Sioshansi, S., K.E. Huber, and D.E. Wazer, *The implications of breast cancer molecular phenotype for radiation oncology*. Front Oncol, 2011. **1**: p. 12.
7. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. Jama, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
8. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
9. Nofech-Mozes, S., et al., *Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2012. **20**(3): p. 214-63.
10. Alqaisi, A., et al., *Impact of estrogen receptor (ER) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) co-expression on breast cancer disease characteristics: implications for tumor biology and research*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **148**(2): p. 437-44.
11. Sporikova, Z., et al., *Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer*. Clin Breast Cancer, 2018. **18**(5): p. e841-e850.
12. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
13. Maximiano, S., et al., *Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer*. BioDrugs, 2016. **30**(2): p. 75-86.
14. Page, D.L., R.A. Jensen, and J.F. Simpson, *Routinely available indicators of prognosis in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **51**(3): p. 195-208.
15. Ali, S. and R.C. Coombes, *Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 101-12.
16. Kuukasjärvi, T., et al., *Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy*. J Clin Oncol, 1996. **14**(9): p. 2584-9.
17. Willibald, M., et al., *High Level of Progesteron Receptor Membrane Component 1 (PGRMC 1) in Tissue of Breast Cancer Patients is Associated with Worse Response to Anthracycline-Based Neoadjuvant Therapy*. Horm Metab Res, 2017. **49**(8): p. 595-603.
18. Wörmann, B., *Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014*.
19. Lauby-Secretan, B., et al., *Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group*. N Engl J Med, 2016. **375**(8): p. 794-8.

20. Fournier, A., F. Berrino, and F. Clavel-Chapelon, *Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **107**(1): p. 103-11.
21. *Peri- and Postmenopause – Diagnosis and Interventions. Guideline of the DGGG, SGGG and OEGGG (S3 Level, AWMF Registry No. 015-062, January 2020)*. [abgerufen am 23.07.2020]; Available from: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/015-062.html>.
22. Mørch, L.S., et al., *Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(23): p. 2228-2239.
23. Africander, D., N. Verhoog, and J.P. Hapgood, *Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception*. *Steroids*, 2011. **76**(7): p. 636-52.
24. Hickey, M., S.R. Davis, and D.W. Sturdee, *Treatment of menopausal symptoms: what shall we do now?* *Lancet*, 2005. **366**(9483): p. 409-21.
25. National Collaborating Centre for, W.s. and H. Children's, *National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines, in Menopause: Full Guideline*. 2015, National Institute for Health and Care Excellence (UK) Copyright © 2015 National Collaborating Centre for Women's and Children's Health.: London.
26. Grady, D., et al., *Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis*. *Obstet Gynecol*, 1995. **85**(2): p. 304-13.
27. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom, Langversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 032/034-OL*. [abgerufen am 23.07.2020]; Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/>.
28. Köhrle, J., L. Schomburg, and U. Schweizer, *Steroidhormone – Produkte von Nebennierenrinde und Keimdrüsen*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 495-511.
29. Anderson, G.L., et al., *Conjugated equine oestrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the Women's Health Initiative randomised placebo-controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(5): p. 476-86.
30. Anderson, G.L., et al., *Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. *Jama*, 2004. **291**(14): p. 1701-12.
31. Beral, V., *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. *Lancet*, 2003. **362**(9382): p. 419-27.
32. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence*. *The Lancet*, 2019. **394**(10204): p. 1159-1168.
33. European-Medicines-Agency. *Guidelines on clinical investigation of medicinal products for hormone replacement therapy of oestrogen deficiency symptoms in postmenopausal women*. . [Guideline] 2005 [cited 2021 16 July]; Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-medicinal-products-hormone-replacement-therapy-oestrogen-deficiency\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-medicinal-products-hormone-replacement-therapy-oestrogen-deficiency_en.pdf).
34. *Hormonal Contraception. Guideline of the DGGG, SGGG and OEGGG (S3-Level, AWMF Registry No. 015/015, November 2019)*. [abgerufen am 23.07.2020]; Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/015-015l\\_S3\\_Hormonelle\\_Empfaengnisverhuetung\\_2020-01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-015l_S3_Hormonelle_Empfaengnisverhuetung_2020-01.pdf).

35. Hannaford, P.C., et al., *Mortality among contraceptive pill users: cohort evidence from Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study*. *Bmj*, 2010. **340**: p. c927.
36. Del Pup, L., G. Codacci-Pisanelli, and F. Peccatori, *Breast cancer risk of hormonal contraception: Counselling considering new evidence*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019. **137**: p. 123-130.
37. Kimura, I., et al., *Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins*. *Curr Protein Pept Sci*, 2012. **13**(7): p. 687-96.
38. Cahill, M.A., et al., *The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1866**(2): p. 339-349.
39. Gerdes, D., et al., *Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors*. *Biol Chem*, 1998. **379**(7): p. 907-11.
40. Ryu, C.S., K. Klein, and U.M. Zanger, *Membrane Associated Progesterone Receptors: Promiscuous Proteins with Pleiotropic Functions - Focus on Interactions with Cytochromes P450*. *Front Pharmacol*, 2017. **8**: p. 159.
41. Kabe, Y., et al., *Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance*. *Nature communications*, 2016. **7**(1): p. 1-13.
42. Mansouri, M.R., et al., *Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(23): p. 3776-83.
43. Cahill, M.A., et al., *PGRMC1 regulation by phosphorylation: potential new insights in controlling biological activity*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 50822-50827.
44. Peluso, J.J., V. Lodde, and X. Liu, *Progesterone regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) sumoylation and transcriptional activity in spontaneously immortalized granulosa cells*. *Endocrinology*, 2012. **153**(8): p. 3929-39.
45. Mir, S.U.R., et al., *Elevated progesterone receptor membrane component 1/sigma-2 receptor levels in lung tumors and plasma from lung cancer patients*. *International Journal of Cancer*, 2012. **131**(2): p. E1-E9.
46. Hornbeck, P.V., et al., *PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation*. *Proteomics*, 2004. **4**(6): p. 1551-61.
47. Hughes, A.L., et al., *Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes*. *Cell Metab*, 2007. **5**(2): p. 143-9.
48. Pedroza, D.A., et al., *Progesterone receptor membrane component 1 promotes the growth of breast cancers by altering the phosphoproteome and augmenting EGFR/PI3K/AKT signalling*. *Br J Cancer*, 2020.
49. Asperger, H., et al., *Progesterone receptor membrane component 1 regulates lipid homeostasis and drives oncogenic signaling resulting in breast cancer progression*. *Breast Cancer Res*, 2020. **22**(1): p. 75.
50. Piel, R.B., 3rd, et al., *A Novel Role for Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): A Partner and Regulator of Ferrochelatase*. *Biochemistry*, 2016. **55**(37): p. 5204-17.
51. Peluso, J.J., J. Romak, and X. Liu, *Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations*. *Endocrinology*, 2008. **149**(2): p. 534-43.

52. Cahill, M.A., *Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **105**(1-5): p. 16-36.
53. Ghosh, K., et al., *Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p*. Biochemistry, 2005. **44**(50): p. 16729-36.
54. Thomas, P., Y. Pang, and J. Dong, *Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterin receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors*. Endocrinology, 2014. **155**(3): p. 1107-1119.
55. Min, L., et al., *Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein*. The FEBS journal, 2005. **272**(22): p. 5832-5843.
56. Meyer, C., et al., *Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes*. Eur J Biochem, 1996. **239**(3): p. 726-31.
57. Peluso, J.J., et al., *Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action*. Endocrinology, 2006. **147**(6): p. 3133-40.
58. Sakamoto, H., et al., *Expression and localization of 25-Dx, a membrane-associated putative progesterone-binding protein, in the developing Purkinje cell*. Neuroscience, 2004. **126**(2): p. 325-34.
59. Hand, R.A. and R.J. Craven, *Hpr6.6 protein mediates cell death from oxidative damage in MCF-7 human breast cancer cells*. J Cell Biochem, 2003. **90**(3): p. 534-47.
60. Sabbir, M.G., *Progesterone induced Warburg effect in HEK293 cells is associated with post-translational modifications and proteasomal degradation of progesterone receptor membrane component 1*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019. **191**: p. 105376.
61. Terzaghi, L., et al., *PGRMC1 localization and putative function in the nucleolus of bovine granulosa cells and oocytes*. Reproduction, 2018. **155**(3): p. 273-282.
62. Hampton, K.K., et al., *PGRMC1 Elevation in Multiple Cancers and Essential Role in Stem Cell Survival*. Adv Lung Cancer (Irvine), 2015. **4**(3): p. 37-51.
63. Zhang, Y., et al., *May progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) predict the risk of breast cancer?* Gynecol Endocrinol, 2016. **32**(1): p. 58-60.
64. Ahmed, I.S., et al., *Progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1): a heme-1 domain protein that promotes tumorigenesis and is inhibited by a small molecule*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **333**(2): p. 564-73.
65. Arnold, M., et al., *Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(1): p. 36-46.
66. Nelson, E.R., C.Y. Chang, and D.P. McDonnell, *Cholesterol and breast cancer pathophysiology*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(12): p. 649-55.
67. Mollinedo, F. and C. Gajate, *Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer*. Adv Biol Regul, 2015. **57**: p. 130-46.
68. Orr, G., et al., *Cholesterol dictates the freedom of EGF receptors and HER2 in the plane of the membrane*. Biophys J, 2005. **89**(2): p. 1362-73.
69. Crudden, G., R. Loesel, and R.J. Craven, *Overexpression of the cytochrome p450 activator hpr6 (heme-1 domain protein/human progesterone receptor) in tumors*. Tumour Biol, 2005. **26**(3): p. 142-6.
70. Neubauer, H., et al., *Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(5): p. R85.
71. Clark, N.C., et al., *Progesterone receptor membrane component 1 promotes survival of human breast cancer cells and the growth of xenograft tumors*. Cancer Biol Ther, 2016. **17**(3): p. 262-71.

72. Putti, T.C., et al., *Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis*. Mod Pathol, 2005. **18**(1): p. 26-35.
73. Ji, S., A. Wu, and H. Yang, [*Expression of progesterone receptor membrane component-1 is associated with the malignant phenotypes of breast cancer*]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2012. **32**(5): p. 635-8.
74. Rohe, H.J., et al., *PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding*. Pharmacol Ther, 2009. **121**(1): p. 14-9.
75. Neubauer, H., et al., *Possible role of PGRMC1 in breast cancer development*. Climacteric, 2013. **16**(5): p. 509-13.
76. Willibald, M., et al., *Progesterone receptor membrane component 1 is phosphorylated upon progestin treatment in breast cancer cells*. Oncotarget, 2017. **8**(42): p. 72480-72493.
77. Schneck, H., et al., *Membrane-receptor initiated proliferative effects of dienogest in human breast cancer cells*. Gynecol Endocrinol, 2013. **29**(2): p. 160-3.
78. Montano, M.M., et al., *An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6947-52.
79. Kulkoyluoglu, E. and Z. Madak-Erdogan, *Nuclear and extranuclear-initiated estrogen receptor signaling crosstalk and endocrine resistance in breast cancer*. Steroids, 2016. **114**: p. 41-47.
80. Hall, J.M. and D.P. McDonnell, *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5566-78.
81. Dhamad, A.E., et al., *Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ERα) and Biochemical Characterization of the ERα-Hsp70 Interaction*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160312.
82. Pesiri, V., et al., *Identification of an estrogen receptor α non covalent ubiquitin-binding surface: role in 17β-estradiol-induced transcriptional activity*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 12): p. 2577-82.
83. Kato, S., et al., *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase*. Science, 1995. **270**(5241): p. 1491-4.
84. Kumar, R., et al., *The dynamic structure of the estrogen receptor*. J Amino Acids, 2011. **2011**: p. 812540.
85. Kong, E.H., et al., *Delineation of a unique protein-protein interaction site on the surface of the estrogen receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3593-8.
86. Anbalagan, M. and B.G. Rowan, *Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **418 Pt 3**: p. 264-72.
87. La Rosa, P., et al., *Palmitoylation regulates 17β-estradiol-induced estrogen receptor-α degradation and transcriptional activity*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(5): p. 762-74.
88. Marino, M., P. Ascenzi, and F. Acconcia, *S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions*. Steroids, 2006. **71**(4): p. 298-303.
89. Powell, E., et al., *Differential requirements of Hsp90 and DNA for the formation of estrogen receptor homodimers and heterodimers*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 16125-34.

90. Klinge, C.M., *Estrogen receptor interaction with estrogen response elements*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(14): p. 2905-19.
91. Osborne, C.K., et al., *Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 2): p. 865s-70s.
92. Kushner, P.J., et al., *Estrogen receptor pathways to AP-1*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 311-7.
93. Khan, D. and S. Ansar Ahmed, *The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 635.
94. Yager, J.D. and N.E. Davidson, *Estrogen carcinogenesis in breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(3): p. 270-82.
95. Ali, S., et al., *Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region*. Embo j, 1993. **12**(3): p. 1153-60.
96. Thomas, R.S., et al., *Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity*. J Mol Endocrinol, 2008. **40**(4): p. 173-84.
97. Cheng, J., C. Zhang, and D.J. Shapiro, *A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor-alpha is required for down-regulation of gene expression by 17beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen*. Endocrinology, 2007. **148**(10): p. 4634-41.
98. Brufsky, A.M. and M.N. Dickler, *Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance*. Oncologist, 2018. **23**(5): p. 528-539.
99. McDonnell, D.P. and J.D. Norris, *Connections and regulation of the human estrogen receptor*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1642-4.
100. Pinzone, J.J., et al., *Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(11): p. 4605-12.
101. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
102. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
103. Thompson, E.W., et al., *Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines*. J Cell Physiol, 1992. **150**(3): p. 534-44.
104. Kok, M., et al., *Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(24): p. 1725-9.
105. He, B., et al., *A repressive role for prohibitin in estrogen signaling*. Molecular endocrinology, 2008. **22**(2): p. 344-360.
106. Nuell, M.J., et al., *Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1372-81.
107. Kasashima, K., et al., *Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(47): p. 36401-36410.
108. Nijtmans, L.G., et al., *The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(1): p. 143-55.

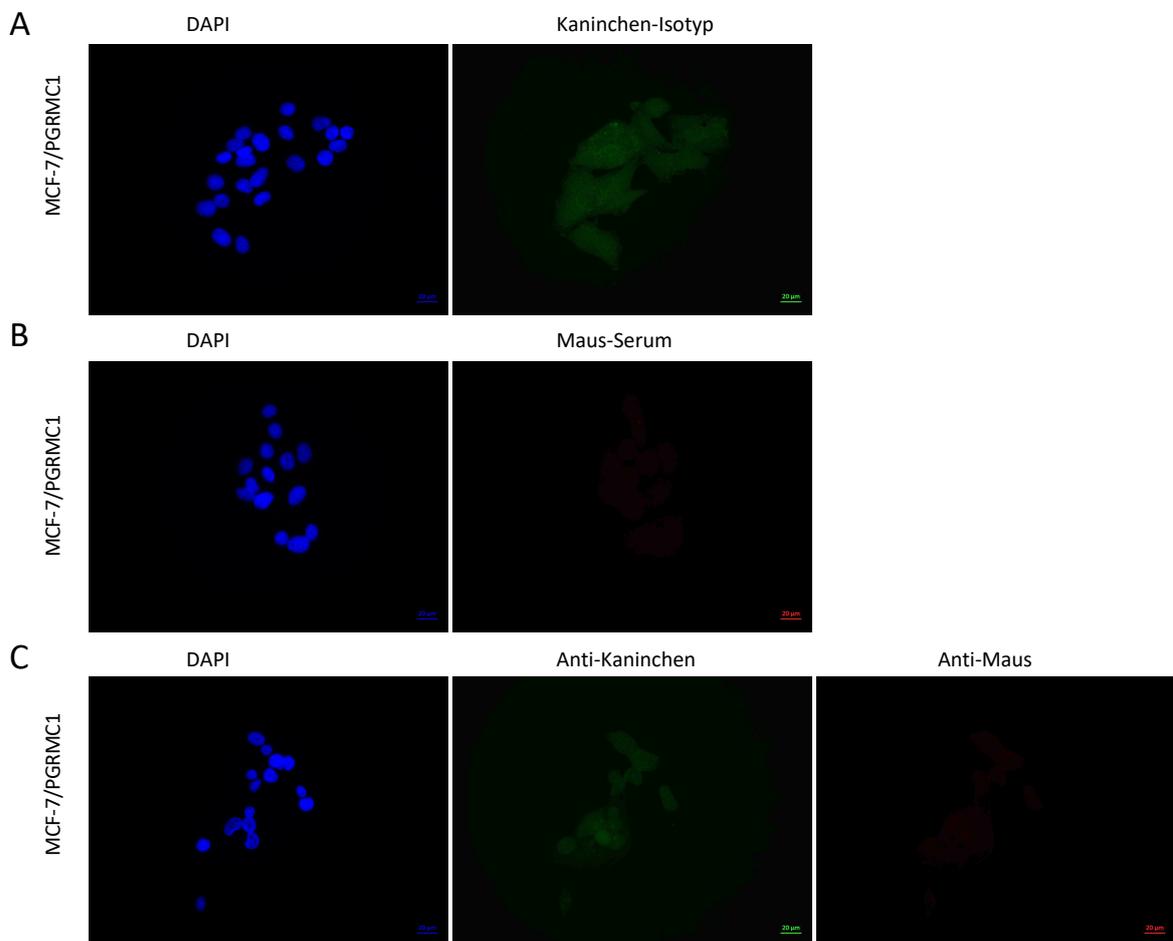
109. Fusaro, G., S. Wang, and S. Chellappan, *Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camptothecin-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2002. **21**(29): p. 4539-48.
110. Hasenkox, J., et al., *PGRMC1 is associated with ER $\alpha$  activation upon progestin treatment*. *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und-therapie*, 2021. **18**(02): p. 33.
111. Bai, Y., et al., *PGRMC1 promotes progestin-dependent progression of breast cancer cells by activating signaling pathways facilitating ER $\alpha$  activation*. *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und-therapie*, 2021. **18**(02): p. 61.
112. Bai, Y., et al., *PGRMC1 Promotes Progestin-Dependent Proliferation of Breast Cancer Cells by Binding Prohibitins Resulting in Activation of ER $\alpha$  Signaling*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(22).
113. Teakel, S.L., et al., *Protein complexes including PGRMC1 and actin-associated proteins are disrupted by AG-205*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020. **524**(1): p. 64-69.
114. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
115. Neubauer, H., et al., *Overexpression of progesterone receptor membrane component 1: possible mechanism for increased breast cancer risk with norethisterone in hormone therapy*. *Menopause*, 2013. **20**(5): p. 504-10.
116. *Thermo Fisher Scientific Webshop*. [cited 2021; 06/11]; Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells; 78840]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78840#/78840>.
117. *Servier Medical Art*. [cited 2020; 08/12]; Available from: <https://smart.servier.com>.
118. Barber, R.D., et al., *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. *Physiol Genomics*, 2005. **21**(3): p. 389-95.
119. Suzuki, T., P.J. Higgins, and D.R. Crawford, *Control selection for RNA quantitation*. *Biotechniques*, 2000. **29**(2): p. 332-7.
120. Balzar, M., et al., *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. *J Mol Med (Berl)*, 1999. **77**(10): p. 699-712.
121. van Roy, F. and G. Berx, *The cell-cell adhesion molecule E-cadherin*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(23): p. 3756-88.
122. Michalak, M., et al., *Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum*. *Biochem J*, 2009. **417**(3): p. 651-66.
123. Bai, W. and X. Zhang, *Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's subcellular localization*. *Cell Cycle*, 2016. **15**(24): p. 3337-3338.
124. Bártová, E., et al., *Histone modifications and nuclear architecture: a review*. *J Histochem Cytochem*, 2008. **56**(8): p. 711-21.
125. *The Human Protein Atlas; ACTB/ Data available from v20.1.proteinatlas.org*. 2021.02.24 [cited 2021 04.05.]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000075624-ACTB/pathology>.
126. *The Human Protein Atlas; ESR1/ Data available from v19.3.proteinatlas.org*. 2020.03.06 [cited 2020 09.10.]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000091831-ESR1/cell#human>.
127. *The Human Protein Atlas; PGRMC1/ Data available from v19.3.proteinatlas.org*. 2020.03.06 [cited 2020 04.11.]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000101856-PGRMC1/cell>.
128. *The Human Protein Atlas; PHB2/ Data available from v20.1.proteinatlas.org*. 2021.02.24 [cited 2020 23.04.]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000215021-PHB2/cell>.

129. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. Journal of cellular physiology, 2000. **182**(3): p. 311-322.
130. Kirkpatrick, C., I. Melzner, and T. Göller, *Comparative effects of trypsin, collagenase and mechanical harvesting on cell membrane lipids studied in monolayer-cultured endothelial cells and a green monkey kidney cell line*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1985. **846**(1): p. 120-126.
131. Geng, F., et al., *Multiple post-translational modifications regulate E-cadherin transport during apoptosis*. Journal of Cell Science, 2012. **125**(11): p. 2615-2625.
132. Lee, Y.H., H.T. Tan, and M.C. Chung, *Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics*. Proteomics, 2010. **10**(22): p. 3935-56.
133. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
134. Dongre, A. and R.A. Weinberg, *New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(2): p. 69-84.
135. Mesaeli, N., et al., *Calreticulin is essential for cardiac development*. J Cell Biol, 1999. **144**(5): p. 857-68.
136. *The Human Protein Atlas; CALR/ Data available from v20.1.proteinatlas.org*. 2021.02.24 [cited 2021 04.05.]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000179218-CALR/pathology>.
137. Christen, P., R. Jaussi, and R. Benoit, *Zellkompartimente und Proteinsortierung*, in *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 283-295.
138. Wu, W., et al., *Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm*. Mol Hum Reprod, 2011. **17**(4): p. 233-42.
139. Palade, G.E., *The endoplasmic reticulum*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1956. **2**(4): p. 85.
140. Pontvianne, F., et al., *Identification of nucleolus-associated chromatin domains reveals a role for the nucleolus in 3D organization of the A. thaliana genome*. Cell reports, 2016. **16**(6): p. 1574-1587.
141. Tanious, F.A., et al., *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites*. Biochemistry, 1992. **31**(12): p. 3103-12.
142. Schweizer, D., *Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI*. Chromosoma, 1976. **58**(4): p. 307-324.
143. Beausoleil, S.A., et al., *Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12130-5.
144. Krebs, C.J., et al., *A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12816-21.
145. Min, L., et al., *Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (inner zone antigen) and its role in the steroidogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **215**(1-2): p. 143-8.
146. Coates, P.J., et al., *The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan*. Curr Biol, 1997. **7**(8): p. 607-10.
147. Anbalagan, M., et al., *Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease*. Nucl Recept Signal, 2012. **10**: p. e001.

148. Murphy, L.C., et al., *Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha expression is associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(17): p. 5902-6.
149. Vendrell, J.A., et al., *Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(1): p. 75-92.
150. Likhite, V.S., et al., *Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(12): p. 3120-32.
151. Borrás, M., et al., *Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1994. **48**(4): p. 325-36.
152. Birkhäuser, M., *Klinische Bedeutung von gestagenen Partialwirkungen*. Gynäkologische Endokrinologie, 2006. **4**(1): p. 52-64.
153. Chávez, B.A., et al., *Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites*. J Steroid Biochem, 1985. **22**(1): p. 121-6.
154. Gual, C., et al., *Biosynthesis of estrogens*. Endocrinology, 1962. **71**: p. 920-5.
155. Larrea, F., et al., *The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level*. J Steroid Biochem, 1987. **27**(4-6): p. 657-63.
156. Santillán, R., et al., *Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites*. Eur J Pharmacol, 2001. **427**(2): p. 167-74.
157. Vilchis, F., et al., *Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors*. J Steroid Biochem, 1986. **24**(2): p. 525-31.
158. Lemus, A.E., et al., *Bioconversion of norethisterone, a progesterone receptor agonist into estrogen receptor agonists in osteoblastic cells*. J Endocrinol, 2009. **200**(2): p. 199-206.
159. Larrea, F., et al., *A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER alpha*. Endocrinology, 2001. **142**(9): p. 3791-9.
160. MacIndoe, J.H. and G.R. Woods, *Steroid-metabolizing enzymes in human breast cancer cells. II. 5 alpha-Reductase, 3 alpha-hydroxysteroid oxidoreductase, and 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase*. Endocrinology, 1981. **108**(4): p. 1407-13.
161. Wiebe, J.P., et al., *The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion*. Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 936-43.
162. Pasapera, A.M., et al., *Norethisterone is bioconverted to oestrogenic compounds that activate both the oestrogen receptor alpha and oestrogen receptor beta in vitro*. Eur J Pharmacol, 2002. **452**(3): p. 347-55.
163. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. Vol. 6. 2015, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
164. *Human Protein Atlas* available from. 2020.03.06 [cited 2020 09.10.]; Available from: <http://www.proteinatlas.org>.
165. Thul, P.J., et al., *A subcellular map of the human proteome*. Science, 2017. **356**(6340).
166. Adlanmerini, M., et al., *Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor alpha in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. E283-90.

167. Dauvois, S., R. White, and M.G. Parker, *The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling*. J Cell Sci, 1993. **106 ( Pt 4)**: p. 1377-88.
168. Devin-Leclerc, J., et al., *Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm*. Mol Endocrinol, 1998. **12(6)**: p. 842-54.
169. O'Lone, R., et al., *Genomic targets of nuclear estrogen receptors*. Mol Endocrinol, 2004. **18(8)**: p. 1859-75.
170. Fuentes, N. and P. Silveyra, *Estrogen receptor signaling mechanisms*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2019. **116**: p. 135-170.
171. Ahmed, I.S., et al., *Pgrmc1 (progesterone receptor membrane component 1) associates with epidermal growth factor receptor and regulates erlotinib sensitivity*. J Biol Chem, 2010. **285(32)**: p. 24775-82.
172. Kim, J.W., et al., *Activation of an estrogen/estrogen receptor signaling by BIG3 through its inhibitory effect on nuclear transport of PHB2/REA in breast cancer*. Cancer Sci, 2009. **100(8)**: p. 1468-78.
173. Kim, N.H., et al., *BIG3 Inhibits the Estrogen-Dependent Nuclear Translocation of PHB2 via Multiple Karyopherin-Alpha Proteins in Breast Cancer Cells*. PLoS One, 2015. **10(6)**: p. e0127707.
174. Yoshimaru, T., et al., *Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2443.

## 6 Anhang



**Abb. 25: Negativkontrolle der Immunfluoreszenzfärbung.** A: Inkubation mit Kaninchen-Isotyp-Kontrolle und Sekundärantikörper B: Inkubation mit Maus-Serum und Sekundärantikörper C: reine Sekundärantikörperinkubation mit Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-Antikörper. Vergrößerung 40x. Maßstab 20 µm. 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1).

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans Neubauer für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in den Forschungslaboren der Frauenklinik durchführen zu können. Die fachliche Betreuung und stets konstruktive Kritik bilden den unverzichtbaren Hintergrund dieser Arbeit. Auch bei Prof. Dr. Georg Pongratz möchte ich mich herzlichst für die Übernahme der Zweitbetreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Nadia Stamm. Danke dafür, dass du mich vom ersten Tag an eingearbeitet, unterstützt und angespornt hast. Du hast mich von den ersten Stunden im Labor bis zur letzten Seite dieser Arbeit begleitet, unermüdlich Fragen beantwortet und Korrektur gelesen. Danke dafür, dass du mich nie genervt rausgeschmissen hast, mit mir Kaffee, Mittagspausen und deine Keks-Schublade geteilt hast und dafür, dass du auch in der schwersten Zeit immer für dieses Projekt gekämpft hast. Diese Arbeit würde ohne dich nicht existieren und ich danke dir von ganzem Herzen!

Bei dem gesamtem Labor-Team der Frauenklinik bedanke ich mich für eure offene Art und fröhliche Gesellschaft. Auch meinen Freunden und Mitbewohnern danke ich für die wunderbare Studienzeit und die seelische Unterstützung. Ihr habt diese Zeit unvergesslich gemacht und ich bin sehr glücklich darüber euch immer an meiner Seite zu wissen.

Ich bedanke mich bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Förderung während des Studiums und der Durchführung dieser Doktorarbeit. Dies hat mir viel Zeit und Raum für eine intensive Ausarbeitung der Dissertation und des Studiums ermöglicht und meinen Horizont immer wieder erweitert.

Mein größter Dank gilt meinen wunderbaren Eltern und Großeltern. Eure grenzenlose Unterstützung hat mich durch mein komplettes Leben bis hierhin immer begleitet. Ich kann gar nicht mit Worten ausdrücken, wieviel mir euer Rückhalt, euer Vertrauen und eure Liebe bedeuten und hoffe, eines Tages einen Bruchteil davon zurückgeben zu können. Danke dafür, dass ihr mich immer in meinen Plänen bestärkt, konstruktive Kritik beigesteuert und mich mit Rat, Humor und dem besten Essen unterstützt habt. Ich könnte mir keine liebevollere, lustigere und klügere Familie vorstellen: Diese Arbeit widme ich euch!