

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Endokrinologikum, Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. H. M. Schulte

**Charakterisierung der zellulären Lokalisation und möglicher Interaktionen
von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1 in humanen myometrialen
Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Clarissa Alexandra Schulze zur Wiesch
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.03.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. H. M. Schulte

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD. Dr. med. J. Aberle

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. V. Müller

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 Der menschliche Uterus	5
1.1.1 Aufbau	5
1.1.2 Der Uterus im Menstruationszyklus	5
1.1.3 Schwangerschaft und Geburt	7
1.2 Effekte und Signaltransduktion von Progesteron	8
1.2.1 Der klassische Progesteronrezeptor	9
1.2.1.1 Struktur	9
1.2.1.2 Progesteronrezeptor-Isoformen	9
1.2.2 Nicht-genomische Effekte von Progesteron	10
1.2.2.1 Definition einer nicht-genomischen Steroidwirkung	10
1.2.2.2 Nicht-genomische Wirkung von Progesteron	11
1.2.3 Rezeptor-Kandidaten zur Vermittlung der nicht-genomischen Effekte von Progesteron	11
1.2.3.1 Nicht genomische Effekte vermittelt durch den klassischen Progesteronrezeptor	12
1.2.3.2 mPR α , β und γ	12
1.2.3.3 PGRMC-1 und PAIRBP-1 als gemeinsamer Rezeptorkomplex für Progesteron	13
1.2.3.3.1 PGRMC-1	14
1.2.3.3.2 PAIRBP-1	18
1.3 Ziel der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Zellkultur	21
2.1.1 Isolierung und Kultivierung von myometrialen Primärzellen aus uterinem Gewebe	21
2.1.2 Kultivierung von Zelllinien	22
2.1.2.1 Humanes Uterussarkom: Skut-1B	22
2.1.2.2 Human-embryonale Niere: HEK293	22
2.1.2.3 Simianes Nierenzellkarzinom: COS-7	22
2.1.2.4 Humanes hepatozelluläres Karzinom: HepG2	22
2.1.2.5 Humanes Adenokarzinom der Mamma: MDA-MB-231	22
2.1.3 Stimulierung der Zellkulturen	22
2.1.4 Cholesterol-Depletion durch Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD)	23
2.1.5 Chemische Protein-Quervernetzung in vivo	23
2.1.5.1 DSP-Quervernetzung	23
2.1.5.2 DSS-Quervernetzung	24
2.1.6 Transiente Transfektion	24
2.1.6.1 Transiente Transfektion mithilfe von PolyFect	25
2.1.6.2 Transiente Transfektion mithilfe von Fugene	25
2.1.6.3 Transiente Transfektion mithilfe von Lipofectamine	25
2.1.7 Immunfluoreszenz	25
2.1.8 Konfokalmikroskopie	28
2.1.9 HaloTag Ligandenbindung	29
2.2 Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten	30
2.2.1.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten	30
2.2.1.2 Herstellung von zytosolischen und nukleären Proteinextrakten	31
2.2.1.3 Herstellung von Schnell-Gesamtproteinextrakten	31
2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry	31
2.2.3 Westernblot	32
2.2.3.1 Westernblot mit dem NuPage-System	32
2.2.3.1.1 Gelelektrophorese	32
2.2.3.1.2 Proteintransfer	32
2.2.3.1.3 Immundetektion	33
2.2.3.1.4 Entfernen des Antikörpers auf dem Westernblot	33
2.2.4 Methoden zur Identifizierung von PGRMC-1 Interaktionen	34
2.2.4.1 HaloLink Resin Pulldown	34
2.2.4.2 Co-Immunpräzipitation	35
3. ERGEBNISSE	37
3.1 Antikörper-Validierung	37
3.1.1 Spezifität der Antikörper gegen PGRMC-1	37
3.1.1.1 Antikörper S1	37

3.1.1.2	Antikörper T2	38
3.1.1.3	Antikörper 7860	38
3.1.2	<i>Spezifität der Antikörper gegen PGRMC-2</i>	40
3.1.2.1	Antikörper der Firma Abnova	40
3.1.2.2	Antikörper 395	42
3.1.3	<i>Spezifität des Antikörpers gegen PAIRBP-1</i>	43
3.1.4	<i>Spezifität der Antikörper gegen Myc-Tag</i>	45
3.1.5	<i>Spezifität der Antikörper gegen V5 Tag</i>	46
3.2	Versuche zu möglichen Interaktionen zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1	46
3.2.1	<i>Untersuchung der PGRMC-1-Homodimerbildung unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen</i>	47
3.2.2	<i>Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildungen durch Co-Immun-präzipitation und reversible chemische Quervernetzung</i>	49
3.2.3	<i>Untersuchung der PGRMC-1-Multimerbildung durch irreversible chemische Quervernetzung</i>	50
3.2.4	<i>Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildung durch die HaloLink Resin Methode</i>	52
3.2.5	<i>Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 durch Halo Link Resin</i>	53
3.2.6	<i>Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen PGRMC-1- und PAIRBP-1-Varianten durch HaloLink Resin unter Progesteron-Stimulation</i>	53
3.3	Das Expressionsmuster von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1	56
3.4	Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1	57
3.4.1	<i>Überprüfung einer möglichen Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen und der COS-7-Zelllinie</i>	60
3.4.2	<i>Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1, und PAIRBP-1 unter dem Einfluss von Progesteron und cAMP</i>	62
3.4.3	<i>Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 nach Änderung der Plasmamembranstruktur und Progesteronstimulation</i>	64
3.4.4	<i>Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und Caveolin nach Änderung der Plasmamembranstruktur und Progesteronstimulation</i>	67
4.	DISKUSSION	70
4.1	Antikörper-Validierung	70
4.2	Interaktion von PGRMC-1 und PAIRBP-1 und PGRMC-1-Homomerbildung	71
4.2.1	<i>Untersuchung der PGRMC-1-Homodimerbildung unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen</i>	71
4.2.2	<i>Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildungen durch Co-Immunpräzipitation und reversible chemische Quervernetzung</i>	72
4.2.3	<i>Untersuchung der PGRMC-1-Multimerbildung durch irreversible chemische Quervernetzung</i>	72
4.2.4	<i>Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildungen durch die HaloLink Resin Methode</i>	72
4.2.5	<i>Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 durch HaloLink Resin</i>	73
4.3	Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1	73
4.3.1	<i>Überprüfung einer möglichen Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen und der COS-7 Zelllinie</i>	75
4.3.2	<i>Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 unter dem Einfluss von Progesteron und cAMP in myometrialen Zellen</i>	75
4.3.3	<i>Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 nach Cholesterol-Depletion in myometrialen Zellen</i>	76
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	AUSBLICK	80
7.	ABKÜRZUNGEN	81
8.	LITERATUR	83
9.	DANKSAGUNG	89
10.	LEBENS LAUF	90
11.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	91

1. EINLEITUNG

1.1 Der menschliche Uterus

1.1.1 Aufbau

Der Uterus wird in die Bereiche Fundus, Corpus und Zervix unterteilt (Abb. 1). Strukturell werden drei Gewebeschichten unterschieden. Die äußere Schicht bildet das Perimetrium (oder Serosa), die mittlere Schicht das Myometrium und die innerste Schicht das Endometrium. Durch das Perimetrium wird der Uterus von der Bauchhöhle abgegrenzt. Das Myometrium, welches den größten Strukturanteil ausmacht, besteht aus glatten Muskelzellen. Diese Muskelschicht vermittelt uterine Kontraktionen während des Menstruationszyklus und der Geburt. Das Endometrium ist eine Schleimhautschicht, welche zyklischen und morphologischen Veränderungen unterworfen ist. In diese innerste Schicht des Uterus nistet sich der Embryo ein, ein Vorgang, der als Implantation bezeichnet wird (Nakamura 2008).

In der Schwangerschaft dient der Uterus dem Embryo als Ort der Entwicklung und ermöglicht durch den Aufbau einer Plazenta die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen. Während der Geburt spielt das Myometrium die entscheidende Rolle, wenn es zu Uterus-Kontraktionen führt, die das Kind austreiben.

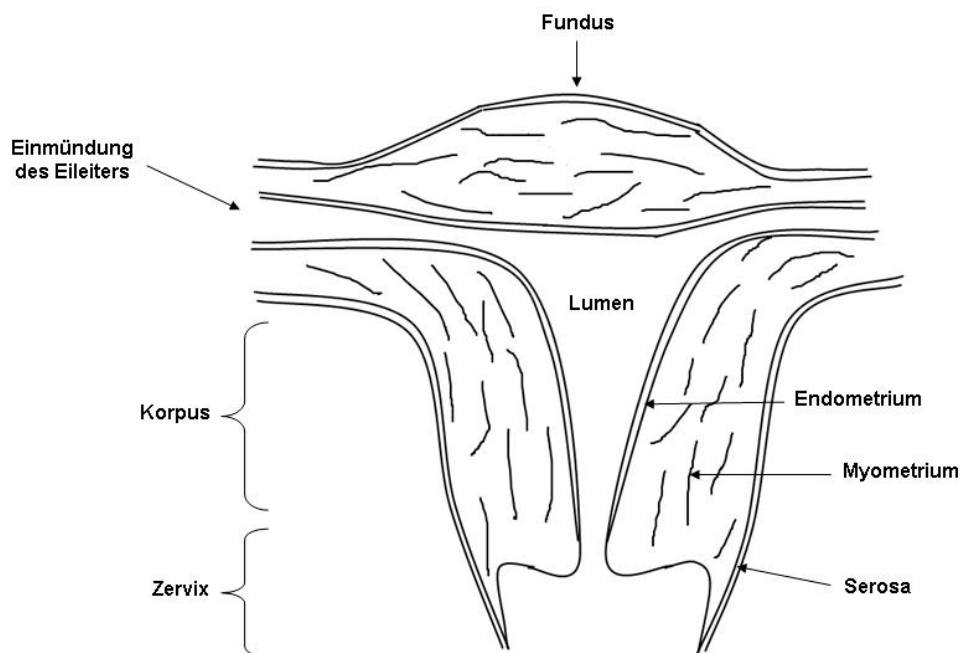


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des menschlichen Uterus.

1.1.2 Der Uterus im Menstruationszyklus

Die Phase der Reproduktionsfähigkeit bei Frauen erstreckt sich von der Menarche in der Pubertät bis zur Menopause gegen Ende des 5. Lebensjahrzehnts. Während dieser Zeit durchläuft der Uterus 400–500 aufeinanderfolgende Zyklen von etwa 28-tägiger Dauer. Schwankungen der Zykluslänge zwischen 26 und 32 Tagen sind jedoch nicht ungewöhnlich (Salamonsen 2008). In jedem Zyklus

werden am Endometrium drei Phasen unterschieden, die der Vorbereitung des Uterus auf eine mögliche Implantation des Embryos und den Erhalt der Schwangerschaft dienen: die proliferative Phase, die sekretorische Phase und die Menstruationsphase (Abb. 2).

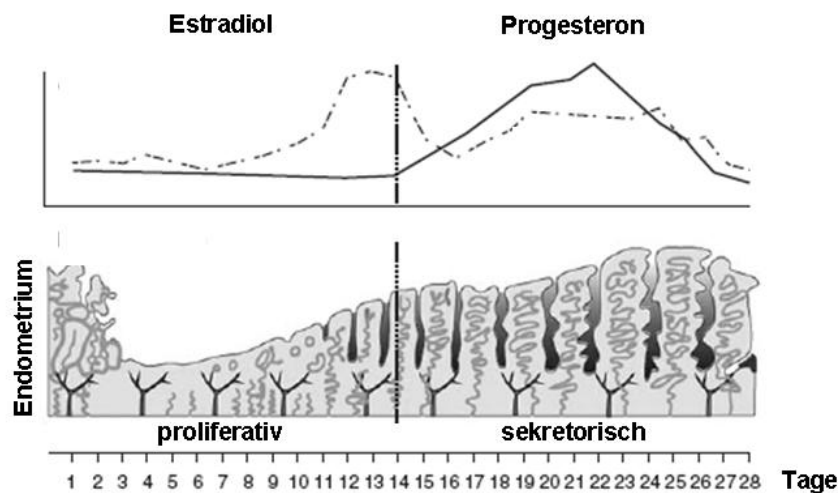


Abbildung 2: Der menschliche Menstruationszyklus.

Die obere Hälfte der Abbildung zeigt die Veränderungen im Plasmaspiegel von Östradiol (gestrichelte Linie) und Progesteron (durchgezogene Linie). Im unteren Teil ist ein schematischer Querschnitt des Endometriums im Monats-zyklus dargestellt (modifiziert nach Salamonsen 2008).

Das Endometrium, das der mittleren muskulären Schicht, dem Myometrium, als innerste Schicht anliegt, unterteilt sich in ein äußeres, dünneres Stratum basale und ein lunales, dickeres Stratum functionale. Während das Stratum functionale bei nicht erfolgter Implantation während der Menstruation abgeschieden wird, bleibt das Stratum basale unverändert und dient der Regeneration des Stratum functionale für den nachfolgenden Zyklus (Schiebler and Schmidt 2002).

Ein großer Anteil des Endometriums besteht aus endometrialen Stromazellen. Weiterhin befinden sich Drüsengänge und Spiralarterien in der Gebärmutter-schleimhaut. Diese durchziehen das endometriale Stroma bis zum Myometrium. Abgeschlossen wird das Endometrium zum Lumen hin durch ein einreihiges Epithel.

Komplexe parakrine Mechanismen zwischen den Bestandteilen des Endometriums regeln die Differenzierung und koordinierte Entwicklung des Endometriums innerhalb des Zyklus und während der Schwangerschaft. Sowohl das Endometrium als auch das Myometrium sind Zielgewebe der Sexualsteroiden Progesteron und Estrogen. Vermittler der Hormonwirkung innerhalb der Zelle sind die jeweiligen nukleären Rezeptoren, die zur Familie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren gehören. Jedoch scheinen zusätzlich noch ungeklärte Rezeptoren und Signalketten an der Wirkungsvermittlung beteiligt zu sein (näheres siehe Kapitel 1.2.3). In der proliferativen Phase, die der folliculären Phase im Ovar entspricht, geht der entscheidende hormonelle Effekt vom hypophysären Gonadotropin FSH (follikelstimulierendes Hormon) aus. FSH stimuliert im Ovar die Estrogenbildung, unter dessen Einfluss es im Endometrium zu einer Reepithelialisierung und einem Wachstum der Stroma- und Drüsenelemente kommt. Das Ergebnis ist eine Verdickung des Endometriums auf 4–6 mm mit Ausbildung von Drüsen und Blutgefäßen. Zusätzlich induziert Estrogen die Ausbildung von Progesteronrezeptoren, welche eine wichtige Voraussetzung für die Progesteronwirkung im weiteren Verlauf des Zyklus ist. Die sekretorische Phase, auch als Lutealphase bezeichnet, beginnt nach der Ovulation, entsprechend Tag 14 eines regelhaften Zyklus. Sie ist

gekennzeichnet durch die Umwandlung (Transformation) des Endometriums unter der Wirkung von Progesteron, das im Gelbkörper (Corpus luteum) gebildet wird und zu einer verstärkten Drüsensekretion sowie zu Wachstum und Verzweigung der Spiralarterien führt (Salamonsen 2008).

Falls es zu keiner Implantation kommt, bildet sich das Corpus luteum zurück (Luteolyse). Dies führt zu einer erniedrigten Estrogen- und Progesteronsekretion und somit zu einem Entzug der hormonellen Unterstützung für das sekretorische Endometrium. Unter der inadäquaten Hormonversorgung degeneriert das Stratum functionale. Eingeleitet wird dieser Vorgang durch die lokale Freisetzung von Prostaglandin F_{2α}, welches die Kontraktion der Spiralarterien bewirkt. Als Folge kommt es zu einer Nekrotisierung des Stratum functionale; das nekrotische Endometrium wird abgelöst und durch die Kontraktion des Myometriums abgestoßen.

1.1.3 Schwangerschaft und Geburt

Die Implantation einer Blastozyste in das vorbereitete, dezidualisierte Endometrium findet etwa zwischen Tag 20 und 24 des Zyklus statt (dem sogenannten Implantationsfenster) und wird durch komplexe Vorgänge reguliert. Eine wichtige Funktion haben hierbei die durch das Ovar und das Endometrium sezernierten Steroide, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine.

Bereits zum Zeitpunkt der Implantation stellt ein hoher Progesteron-Spiegel das Myometrium ruhig. Progesteron ist auch im weiteren Verlauf der Schwangerschaft entscheidend für die uterine Ruhigstellung. Hierbei scheinen genomische sowie nicht-genomische Signalwege eine Rolle zu spielen. Über den klassischen Progesteronrezeptor wird die Expression sogenannter kontraktionsassoziiierter Proteine, u.a. dem Oxytozinrezeptor und Connexin-43, welche die Uteruskontraktionen maßgeblich beeinflussen, herunterreguliert (Mesiano and Welsh 2007). Die nicht-genomischen Signalkaskaden, über welche Progesteron einen unmittelbaren relaxatorischen Effekt auf das Myometrium ausübt, sind weiterhin kontrovers diskutiert.

Die Einleitung der Geburt beim Menschen ist ein komplexer und noch ungenügend verstandener Vorgang. Durch das Zusammenspiel von maternalen und fetalen Faktoren kommt es zu koordinierten Kontraktionen des Uterus und einer Dilatation der Zervix.

Bei vielen Spezies beobachtet man vor dem Eintritt der Geburt einen Abfall des Progesteronspiegels. Auch die Hemmung der Progesteronwirkung durch den Antagonisten des klassischen Progesteronrezeptors, RU-486, kann die Schwangerschaft zu jedem Zeitpunkt beenden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass für die Umwandlung des Uterus in den kontraktile Status ein Progesteronentzug notwendig ist.

Bemerkenswert ist jedoch, dass beim Menschen der hohe Progesteronspiegel unverändert bestehen bleibt. Es wird angenommen, dass es durch eine veränderte Progesteronwirkung zu einem funktionellen Entzug kommt. Bekannt ist, dass es im Verlauf der Schwangerschaft zu einem veränderten Verhältnis der beiden Progesteronrezeptor-Isoformen PR-A und PR-B kommt (Merlino *et al.* 2007). Postuliert wird auch ein verändertes Expressionsmuster von transkriptionellen Co-Aktivatoren des PR (Condon *et al.* 2003).

Darüber hinaus wird aber, insbesondere für die schnelle, nicht genomische Wirkung auch die Beteiligung Plasmamembran-initiiertes Steroideffekte diskutiert, bei denen entweder der nukleäre PR

membranassoziiert vorzufinden ist oder gänzlich andere membranständige Progesteronrezeptoren Signalkaskaden einleiten (Mesiano and Welsh 2007).

Der einige Wochen vor der Geburt ansteigende Estrogenspiegel verändert das Mengenverhältnis von Estrogen und Progesteron und induziert dadurch eine vermehrte Expression des Oxytozinrezeptors. Unter dem vermehrten Einfluss von Oxytozin kann es im Endometrium zu einem Anstieg der Prostaglandin-Konzentration kommen. Prostaglandine selbst führen zu einer Hochregulation der Expression von Oxytozin-Rezeptoren im Endometrium und Myometrium sowie der Prostaglandin-Rezeptoren im Myometrium und verstärken hiermit ihre eigene Wirkung.

Der parakrine Prostaglandineffekt am Myometrium führt zu Kontraktionen des Uterus. Durch den funktionellen Progesteronentzug wird zudem eine inflammatorische Kaskade in Gang gesetzt, an der die Interleukine 6, 8 und 12 sowie weitere Zytokine beteiligt sind, die ebenfalls zu einer Erhöhung der Uteruskontraktilität, zervikalen Erweichung und Membranruptur führt (Challis *et al.* 2000).

Die abschließende detaillierte Klärung der Vorgänge, welche zu der Initiierung der Geburt beim Menschen führen, steht noch aus.

1.2 Effekte und Signaltransduktion von Progesteron

Das Steroidhormon Progesteron spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung der reproduktiven Vorgänge im weiblichen Organismus. Im normalen Zyklus kommt es postovulatorisch zur Bildung eines Corpus luteum, dessen Granulosazellen eine während der zweiten Zyklushälfte steigende Menge an Progesteron bilden. Ist eine Befruchtung ausgeblieben, so bildet sich das Corpus luteum nach etwa 10–12 Tagen zurück, bei abfallenden Progesteronspiegeln kommt es zur Menstruation mit Abstoßung der *functionalis*.

Ist es zur Befruchtung gekommen, so bleibt das Corpus luteum in den ersten 2–3 Monaten der Schwangerschaft bestehen und behält seine Funktion. Gegen Ende des ersten Schwangerschaftstrimenons übernimmt die Plazenta die Produktion von Progesteron und anderer Steroidhormone, welche die Schwangerschaft aufrechterhalten.

Die Zielorgane von Progesteron sind neben dem Uterus und dem Ovar die weibliche Brust, das Gehirn, der Knochen und die Blutgefäße. Zusätzlich ist das Hormon beteiligt an der Akrosomenreaktion des Spermiums (Osman *et al.* 1989). Während des Menstruationszyklus kommt es in der Lutealphase unter dem Einfluss von Progesteron zu einer Dezidualisierung der Stromazellen des Endometriums (Clarke and Sutherland 1990). Während der Schwangerschaft induziert Progesteron die Proliferation des Uterus und erleichtert die Einnistung des befruchteten Ovums (Kapur *et al.* 1992). Im Myometrium unterdrückt Progesteron die Kontraktilität und trägt damit zum Erhalt der Schwangerschaft bei (Mesiano and Welsh 2007). Progesteron ist im Ovar für die Luteinisierung der Granulosazellen sowie für die Auslösung der Ovulation notwendig (Lydon *et al.* 1995). In der weiblichen Brust ruft Progesteron einerseits die Ausbildung von lobulo-alveolären Strukturen hervor und führt andererseits während der Lutealphase zu einer erhöhten Proliferation (Topper and Freeman 1980, Masters *et al.* 1977). Untersuchungen an der Ratte zeigten einen Einfluss von Progesteron auf das Sexualverhalten (Mani *et al.* 1994) sowie einen vasorelaxierenden Effekt an Arterien (Kakucs *et al.* 1998).

1.2.1 Der klassische Progesteronrezeptor

1.2.1.1 Struktur

Progesteron vermittelt, wie andere Sexsteroidhormone, viele der biologischen Antworten über einen nukleären Rezeptor. Bei dieser Rezeptorfamilie handelt es sich um Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren, welche nach erfolgter Bindung die Expression bestimmter Zielgene, welche für Differenzierung, Proliferation und Homöostase verantwortlich sind, regulieren. Die über 100 nukleären Rezeptoren weisen als gemeinsame Strukturmerkmale verschiedene Domänen auf. Die zentral lokalisierte DNS-Bindungsdomäne mit einer Größe von 66–68 Aminosäuren ist hochkonserviert und besteht aus zwei Zinkfingermotiven, mit denen der Rezeptor an spezifische DNS-Sequenzen bindet. Die Ligandenbindungsdomäne erstreckt sich über den C-terminalen Anteil des Rezeptors und sichert durch die spezifische Erkennung des jeweiligen Hormons die Spezifität und Selektivität der physiologischen Antwort (Mangelsdorf *et al.* 1995). Neben der Homologie der Domänen werden die nukleären Rezeptoren anhand ihrer DNS-Bindungs- und Dimerisierungseigenschaften in vier Klassen eingeteilt. Zur Klasse 1 zählen alle bekannten Steroidhormonrezeptoren, wie der Estrogen-, Androgen-, Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptor. Durch Hitzeschockproteine werden Klasse-1-Rezeptoren in unaktivierter Form, das heißt nicht an einen Liganden gebunden, im Zytosol gehalten. Nach der Bindung des Liganden bilden die Rezeptoren Homodimere und werden in den Kern transloziert. Dort binden sie an einer bestimmten konservierten Sequenz von Zielpromotoren, dem hormonresponsivem Element (HRE) (Wahli and Martinez 1991).

1.2.1.2 Progesteronrezeptor-Isoformen

Die beiden Isoformen PR-A und PR-B des Progesteronrezeptors entstehen durch die Verwendung zweier verschiedener Promotoren eines Gens. Während die PR-B-Isoform die gesamte Länge des transkribierten Gens darstellt, fehlen bei der PR-A-Isoform 164 am N-terminalen Ende lokalisierte Aminosäuren (Abb. 3). Obwohl die DNS- und Liganden-Bindungsdomänen beider Isoformen identisch sind, scheinen sich die beiden Isoformen in ihrer Transkriptionsaktivität zu unterscheiden. Während die PR-B-Isoform in den meisten Fällen als ein starker Aktivator der Gentranskription agiert, ist die PR-A-Isoform schwächer in der Aktivierung und kann sogar als ein Transrepressor die Aktivität der PR-B-Isoform sowie anderer Steroidhormonrezeptoren vermindern. Erklärbar ist die unterschiedliche Transkriptionsaktivität durch eine zusätzlich vorhandene Aktivierungsdomäne der B-Isoform am N-terminalen Ende. In den Zielgeweben von Progesteron werden beide Isoformen meist co-exprimiert. Während des Zellzyklus und abhängig vom Gewebetyp variiert das Verhältnis der jeweiligen Isoformen zueinander (Edwards 2005).

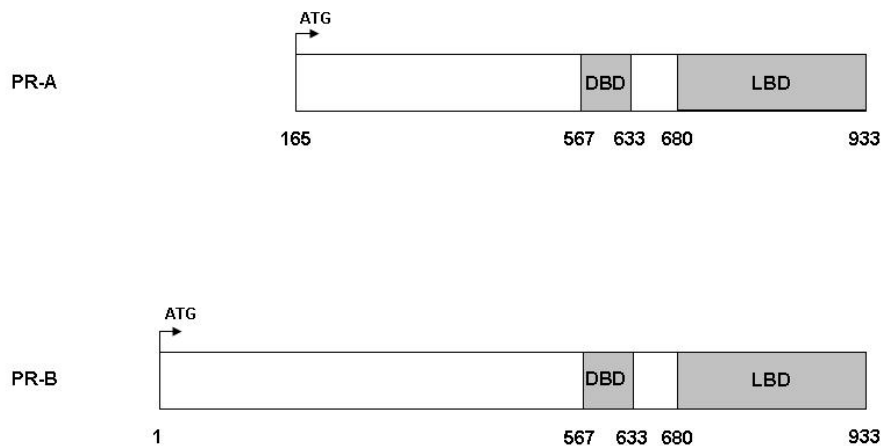


Abbildung 3: Struktur der humanen Progesteronrezeptor-Isoformen, PR-B und PR-A.

Die von einem Gen kodierte Proteine PR-A und PR-B liegen unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren. Der Pfeil zeigt das Start-Methionin, die Aminosäuren sind nummeriert. DBD: DNS-Bindungsdomäne; LBD: Liganden-Bindungsdomäne (nach Graham und Clarke 1997).

Um die spezifischen Funktionen von PR-A und PR-B zu untersuchen, wurden in Experimenten in Mäusen die Isoformen selektiv auf genetischer Ebene ausgeschaltet. Dabei zeigte sich, dass PR-A die dominante Rolle in der Signalvermittlung im Uterus und im Ovar besitzt, während PR-B entscheidend für die Vermittlung der Progesteronwirkung in der Brust ist (Mulac-Jericevic *et al.* 2003, Mulac-Jericevic *et al.* 2000).

Eine weitere, N-terminal gekürzte Isoform des klassischen Progesteronrezeptors ist beschrieben und als PR-C bezeichnet worden (Wei *et al.* 1990). Dabei soll es sich um eine 60 Kilodalton (kDa) große Form des klassischen Progesteronrezeptors handeln, die eine Ligandenbindungs-, aber keine DNS-Bindungsdomäne besitzt (Wei *et al.* 1996). PR-C ist somit nicht fähig an die DNS zu binden und verhindert zusätzlich die DNS-Bindung von PR-B (Wei *et al.* 1997). Die Hochregulation der PR-C-Isoform zum Ende der Schwangerschaft wurde als möglicher Mechanismus eines funktionellen Progesteronentzugs vermutet (Condon *et al.* 2006). Die Existenz einer PR-C-Isoform und weiterer verkürzter Isoformen wurde jedoch durch Expressions- und Antikörperstudien in myometrialen Primärzellen und der Brustkrebszelllinie T47D durch unsere Arbeitsgruppe widerlegt (Samalecos and Gellersen 2008).

1.2.2 Nicht-genomische Effekte von Progesteron

1.2.2.1 Definition einer nicht-genomischen Steroidwirkung

Die Wirkung von Steroidhormonen ist eng verknüpft mit dem Signalweg über den nukleären Rezeptor und einer Regulierung der Transkription spezifischer Gensequenzen. Durch die Regulation auf genomischer Ebene zeigt das klassische Modell eine Latenzzeit von mehreren Stunden bis Tagen bis zum Wirkungseintritt (Losel *et al.* 2003). Viele Effekte der Steroidhormone sind von ihrem Zeitverlauf jedoch zu schnell und damit nicht vereinbar mit dem klassischen Modell. Als Beispiel sei hier die seit 1942 bekannte, unmittelbare anästhetische Wirkung von Progesteron genannt (Falkenstein *et al.* 2000a). Diese schnellen Effekte wurden definiert als nicht-genomische Aktivitäten der Steroidhormone. Ein weiteres Charakteristikum dieser Vorgänge ist, dass sie durch Inhibitoren der Translation und Transkription oder durch klassische Steroidantagonisten nicht blockiert werden können (Bramley *et al.* 2002). Es gibt einige Hinweise dafür, dass nicht-genomische Effekte von

Steroidhormonen an der Plasmamembran beginnen. So sind für einige Steroide, wie Progesteron und Estrogen, in den Zielgeweben spezifische Bindungsaffinitäten an der Zelloberfläche bekannt (Baulieu 1978, Menzies *et al.* 1999). Weiterhin konnten nicht-genomische Effekte auch durch Steroidhormone ausgelöst werden, welche durch Verknüpfung mit z.B. Serumalbumin als Konjugate nicht membrangängig waren (Bramley *et al.* 2002).

1.2.2.2 Nicht-genomische Wirkung von Progesteron

Die oben erwähnte unmittelbare anästhetische Wirkung von Progesteron gehört zu den frühesten Beschreibungen eines nicht-genomischen Effekts. Weitere Erkenntnisse folgten, insbesondere wurde hierbei in Keimzellen geforscht. Bei der Oozytenreifung des *Rana pipiens* kommt es unter der Stimulation von Progesteron innerhalb von wenigen Sekunden zu einer Kalziumabgabe an der Membranoberfläche. Weitere frühe Ereignisse der Reifung sind die Hemmung der cAMP-Produktion und ein transients Anstieg von cGMP (Falkenstein *et al.* 2000b). In der *Xenopus-laevis*-Art führt Progesteron neben einer Hemmung der Adenylatzyklase zu einer Phosphorylierung der Proteinkinase Eg2 (Losel *et al.* 2003).

Zusätzlich zum schnellen Wirkeintritt sprechen Ergebnisse in kernlosen Oozyten sowie eine bleibende Progesteronwirkung trotz Hemmung der RNA-Synthese mit Actinomycin D für eine nicht genomische Wirkung (Losel *et al.* 2003). Die Induktion der Akrosomenreaktion des Spermiums durch Progesteron ist eng assoziiert mit dem sofort auftretenden Kalziuminflux. Dabei ist diese innerhalb von Sekunden einsetzende Progesteronwirkung auch durch Membran-impermeables Progesteron auslösbar und nicht durch Inhibitoren der genomischen Antwort hemmbar (Blackmore *et al.* 1991).

Unter dem Einfluss von Progesteron wird das Myometrium in der Schwangerschaft relaxiert. Eine Hemmung von Progesteron, etwa durch den Antagonisten RU-486, kann zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft die Geburt einleiten (Smith 2007). Dabei spielen längerfristige genomische Effekte sowie nicht genomische Effekte von Progesteron eine Rolle (Mesiano and Welsh 2007).

Die Theorien über die vermuteten Signalwege der nicht genomischen Aktionen von Progesteron sind weiterhin nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden nicht nur unterschiedliche Rezeptoren, sondern auch eine mögliche Beteiligung von Progesteronmetaboliten an der Wirkung des Hormons. Als mögliche Interaktionspartner könnten der Oxytoxinrezeptor (OTXR) oder der γ -Aminobuttersäure-(GABA-) Rezeptor eine Rolle spielen (Gellersen *et al.* 2009) Im folgenden Abschnitt wird der Stand der Forschung zu den bisher diskutierten Rezeptor-Kandidaten der nicht-genomisch vermittelten Progesteronwirkungen dargestellt.

1.2.3 Rezeptor-Kandidaten zur Vermittlung der nicht-genomischen Effekte von Progesteron

Während die Existenz von nicht-genomischen Effekten unumstritten ist, besteht eine Kontroverse über die möglichen Signalwege. Die Vielschichtigkeit der Effekte von Steroidhormonen spricht gegen die Signaltransduktion über nur einen Rezeptor. Die Mannheim-Klassifikation versucht die nicht-genomischen Steroidhormoneffekte nach verschiedenen Mechanismen zu unterteilen. Ein unspezifischer Effekt von Steroidhormonen ohne Rezeptorbeteiligung wird angenommen. Spezifische nicht-genomische Wirkungen könnten sowohl durch eine Beteiligung der klassischen nukleären Rezeptoren als auch durch neuartige Membranrezeptoren vermittelt werden (Falkenstein *et al.* 2000a).

1.2.3.1 Nicht genomische Effekte vermittelt durch den klassischen Progesteronrezeptor

Für einige der nicht-genomischen Effekte ist es wahrscheinlich, dass sie durch den klassischen Progesteronrezeptor über Interaktionen mit membranständig bestehenden Signalkaskaden vermittelt werden. Die Auslösung der Oozytenreifung des *Xenopus laevis* gehört zu den schnellen, nicht-genomischen Effekten von Progesteron. Einige Experimente weisen darauf hin, dass der klassische Rezeptor für diesen Effekt verantwortlich ist. Die Überexpression von xPR, welcher Ähnlichkeiten zum humanen PR hat, führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Progesteron (Bayaa *et al.* 2000). Dagegen blockiert die Zugabe von xPR-Antisense-Strängen die Fähigkeit von Oozyten, auf Progesteron reagieren zu können (Tian *et al.* 2000). In mit xPR-Vektoren transfizierten COS7-Zellen konnte eine Assoziation des Rezeptors zur Zellmembran durch die Ligandenbindungsdomäne nachgewiesen werden (Martinez *et al.* 2006). Außerdem konnte eine polyprolinreiche Domäne in der N-terminalen Region des Progesteronrezeptors ausgemacht werden, mit welcher Interaktionen zu zytoplasmatischen Kinasen möglich sind. Die Vermittlung einer Progesteronwirkung im epithelialen Gewebe der Brust konnte durch die Interaktion dieser Domäne mit einer Src-Kinase nachgewiesen werden (Boonyaratanakornkit *et al.* 2001).

1.2.3.2 mPR α , β und γ

Die Forschungsgruppe um Thomas *et al.* entdeckte 2003 eine neue Gruppe von möglichen Gestagenrezeptoren. Bei dem membranständigen Progesteronrezeptor (mPR), welcher zur Familie der Progesteron- und Adiponectin-Rezeptoren (PAQR) gehört, soll es sich um einen G-Proteingekoppelten Rezeptor mit 7 Transmembran-Domänen handeln, der ubiquitär bei Fischen, zahlreichen Säugetierarten sowie dem Menschen nachgewiesen wurde (Zhu *et al.* 2003a, Zhu *et al.* 2003b).

Die drei Isoformen mPR α , β und γ werden unterschiedlich stark in reproduktiven, neuronalen und intestinalen Geweben sowie der Niere exprimiert (Zhu *et al.* 2003a). In Fischoozyten (*Cynoscion nebulosus*) wurde der mPR membranständig lokalisiert und zeigte eine spezifische Progesteronbindungsfähigkeit. Die Behandlung von Zebrafisch-Oozyten mit mPR-Antisense-Strängen führte zu einer Blockierung der Progesteron-induzierten Reifung der Oozyten. Weiterhin wurde bei Progesteronbindung eine Aktivierung der MAP-Kinase sowie eine Inhibition der Adenylatzyklase beobachtet. Die Inhibition der Adenylatzyklase war durch Pertussistoxin modulierbar, was für eine Koppelung des mPR an ein inhibitorisches G-Protein spricht. Durch die Stimulation von Oozyten des *Cynoscion nebulosus* (gefleckter Umberfisch) mit humanem Choriongonadotropin (hCG) zeigte sich eine Hochregulation von mPR (Zhu *et al.* 2003b). In humanem Endometrium und Schwangerschaftsgewebe konnte eine Abhängigkeit der mPR-Expression vom Zyklus und von den Stadien der Schwangerschaft beobachtet werden (Fernandes *et al.* 2005). Die Rolle von mPR in der Signaltransduktion von Progesteron bleibt umstritten (Fernandes *et al.* 2008).

In Experimenten unserer Gruppe mit HEK293- und MDA-MB-231-Zelllinien wurde die Lokalisation und Funktion von endogenem und überexprimiertem mPR untersucht. Es stellte sich heraus, dass sowohl endogenes als auch überexprimiertes mPR im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert war und keinerlei spezifische Bindungsfähigkeit für Progesteron aufwies. Des Weiteren ergaben sich keine Hinweise für eine Aktivierung der MAP-Kinase, Inhibition der Adenylatzyklase oder eine durch G-Proteine induzierte Kalzium-Mobilisierung (Krietsch *et al.* 2006).

Durch die Expression von mPR α , β und γ in der Hefe konnte jedoch eine spezifische Antwort auf Progesteron induziert werden. In diesem heterologen System, welches endogen keine eigenen

Progesteronrezeptoren besitzt und keine Antwort auf Progesteron zeigt, konnte somit spezifisch für die mPRs eine dosisabhängige Progesteronwirkung gezeigt werden (Smith *et al.* 2008). Im Widerspruch zu der vermuteten Struktur der mPR-Isoformen mit 7 Transmembrandomänen, berechnete die Strukturanalyse, dass die mPR-Formen anders als der Rest der PAQR-Familie 8 Transmembrandomänen besitzen (Zhu *et al.* 2003b, Smith *et al.* 2008). Der C-Terminus des mPR scheint im Zytoplasma zu liegen. Die Wirkung von Progesteron über die mPR-Isoformen wurde durch RU-486 agonisiert (Smith *et al.* 2008). Dies ist ein entscheidender Unterschied zur antagonistischen Wirkung von RU-486 auf den nukleären Rezeptor (Blackmore *et al.* 1990). Ebenfalls im Gegensatz zu den Ergebnissen von Thomas *et al.* beobachtete eine weitere Forschungsgruppe, dass der Signalweg von Progesteron über mPR nicht abhängig von G-Proteinen ist (Thomas 2008, Smith *et al.* 2008).

1.2.3.3 *PGRMC-1 und PAIRBP-1 als gemeinsamer Rezeptorkomplex für Progesteron*

Ein weiterer Kandidat für die Vermittlung nicht-genomischer Progesteronsignale ist ein Rezeptorkomplex aus PGRMC-1 (*progesterone receptor membrane component 1*) und PAIRBP-1 (*plasminogen activator inhibitor RNA binding protein-1*). Die These eines gemeinsamen Rezeptorkomplexes für Progesteron von PGRMC-1 und PAIRBP-1 stützt sich auf verschiedene Ergebnisse im reproduktiven Gewebe. So ließ sich die antiapoptotische Wirkung von Progesteron in Granulosazellen durch einen Antikörper gegen entweder PGRMC-1 oder PAIRBP-1 supprimieren. Der klassische Progesteronrezeptor wurde zu diesem Zeitpunkt nicht exprimiert und der Antagonist der klassischen Progesteronwirkungen, RU-486, hatte keinen Einfluss auf den Effekt von Progesteron (Engmann *et al.* 2006). Ein weiterer interessanter Befund war, dass die Bindungsfähigkeit für Progesteron in spontan immortalisierten Granulosazellen (SIGC) nur durch die Überexpression von PGRMC-1, nicht aber von PAIRBP-1 gesteigert werden konnte (Peluso *et al.* 2006, Peluso *et al.* 2005). In einem anderen Versuchsaufbau wurden membranständige Proteine durch eine Biotinylierung ohne vorherige Permeabilisierung der Zelle dargestellt. Sowohl PAIRBP-1 als auch PGRMC-1 befanden sich unter den biotinylierten Proteinen (Peluso *et al.* 2006, Peluso *et al.* 2005).

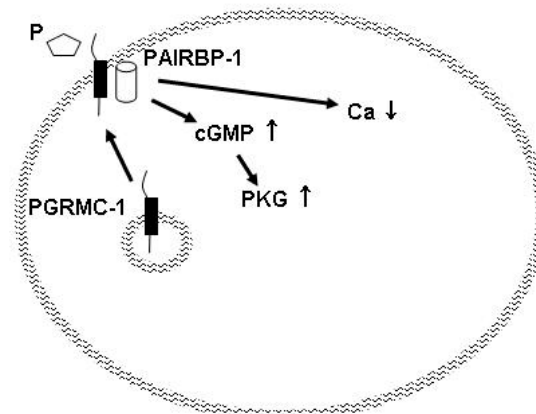


Abbildung 4: Membranständiger Progesteronrezeptorkomplex aus PGRMC-1 und PAIRBP-1.

Integration des PGRMC-1-/PAIRBP-1-Komplexes in die Plasmamembran durch die transmembranöse Domäne von PGRMC-1 und die Bindung von Progesteron (P) an die extrazelluläre PGRMC-1-Domäne. Nachfolgend Erhöhung von cGMP, Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) und Suppression des freien Kalziumspiegels (nach Peluso 2006).

Darüber hinaus konnte bisher keine Transmembrandomäne in PAIRBP-1 identifiziert werden, sodass eine Komplexbildung mit einem membranspannenden Protein angenommen wird (Peluso *et al.* 2004).

Eine Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1, welche durch eine Co-Immunpräzipitation sowie in der Immunfluoreszenz in humanen Granulosazellen nachgewiesen werden konnte, weist ebenfalls auf einen Komplex aus beiden Rezeptoren hin (Peluso *et al.* 2005, Engmann *et al.* 2006). Dabei scheint insbesondere die Häm-Bindungsdomäne von PGRMC-1 wichtig für die Interaktion mit PAIRBP-1 zu sein (Peluso *et al.* 2008b). Der antiapoptotische Effekt von Progesteron in Granulosazellen der Ratte ist assoziiert mit zwei schnellen membraninitiierten Signalkaskaden: Zum einen kommt es zu einer Suppression des intrazellulären freien Kalziumspiegels und zum anderen zu einer Aktivierung der Proteinkinase G durch die Steigerung des cGMP-Spiegels. Es bleibt zu klären, inwieweit PGRMC-1 und PAIRBP-1 an diesen Signalkaskaden beteiligt sind (Abb. 4) (Peluso and Pappalardo 2004, Tai *et al.* 2005, Sirotkin *et al.* 1995).

Neben PGRMC-1 und PAIRBP-1 ist eine Beteiligung von PGRMC-2 an der Signaltransduktion nicht ausgeschlossen. PGRMC-2 konnte zusammen mit PAIRBP-1 und PGRMC-1 in Progesteron-responsiven Zellen des Ovars der Ratte nachgewiesen werden. Im humanen Spermium wurden neben dem nukleären Rezeptor sowohl PGRMC-1 als auch PGRMC-2 detektiert (Losel *et al.* 2005).

1.2.3.3.1 PGRMC-1

1.2.3.3.1.1 Struktur von PGRMC-1

Die Beschreibungen der intrazellulären Lokalisation von PGRMC-1 sind ein erster Hinweis auf die Vielfältigkeit der Funktionen, die das Protein zu erfüllen vermag. So wurden Lokalisationen von PGRMC-1 an der Plasmamembran, nukleär, innerhalb der Mikrosomenmembran oder am endoplasmatischen Retikulum beschrieben (Cahill 2007). Bei diesen unterschiedlichen Lokalisationen handelte es sich zumeist um unterschiedliche Gewebearten. Geeignete Stimuli können zu einem Wechsel der Lokalisation innerhalb eines Zelltyps führen (Buddhikot *et al.* 1999, Peluso *et al.* 2006). Auch die Struktur von PGRMC-1 lässt an viele mögliche physiologische Funktionen denken.

Das aus 194 Aminosäuren bestehende Protein besitzt eine membranspannende Domäne in der Nähe des N-Terminus, wodurch PGRMC-1 in einen kurzen N-terminalen und langen C-terminalen Teil unterteilt wird (Falkenstein *et al.* 1996) (Abb. 5). Eine Arbeitsgruppe konnte in einem Sequenzabgleich zeigen, dass ein Teil der Struktur von PGRMC-1 homolog zu der Häm-Bindungsdomäne von Cytochrom b5 ist. Dieser Arbeitsgruppe erschien eine Hämbindung durch diese Sequenz innerhalb von PGRMC-1 unwahrscheinlich, stattdessen wurde eine entwicklungsgeschichtlich aus der Eisenbindungsdomäne entstandene Bindungmulde für Lipidliganden vermutet (Mifsud and Bateman 2002).



Abbildung 5: Humanes PGRMC-1-Protein.

Das PGRMC-1-Protein besitzt ein kurzes N-terminales Ende, eine transmembranöse Domäne (TMD) und eine Häm-Bindungsdomäne (HBD) am C-terminalen Ende. Der Pfeil bezeichnet das Start-Methionin. Die Aminosäuren sind nummeriert (nach Peluso 2007).

Mit dem Scan-Site-Programm können bestimmte Motive, wie z.B. Interaktionsstellen mit Kinasen, vorhergesagt werden. Für das PGRMC-1-Homolog im *Arabidopsis* wurden zahlreiche Interaktionsdomänen vorhergesagt, darunter zwei SH2- und SH3-Zielsequenzen, Tyrosinkinase-Stellen, sowie Ziele für CK2-Kinasen, ERK1 und PDK1 (Cahill 2007). Während keine Domänen für potenzielle N-Glykosylierungen in PGRMC-1 beobachtet wurden, fand man, in Übereinstimmung mit den vorhergesagten Kinasedomänen, an unterschiedlichen Aminosäuren phosphoryliertes PGRMC-1 (Beausoleil *et al.* 2004, Selmin *et al.* 2005). Eine wichtige Rolle bei der wechselnden Lokalisation von PGRMC-1 könnten bestimmte Sortierungssignale, sogenannte YXX(ϕ)-Motive (ϕ steht für eine aliphatische Aminosäure), spielen. Diese Tyrosin-basierten Motive wurden in der Sequenz von PGRMC-1 beobachtet und werden für die schnelle Internalisation von Proteinen in die Plasmamembran oder in Endosomen benötigt (Runko and Kaprielian 2004, Marks *et al.* 1997). Während PGRMC-1 keinerlei Ähnlichkeit mit klassischen Steroidhormonrezeptoren hat, zeigt besonders die Transmembrandomäne Ähnlichkeiten mit dem Interleukin-6-Rezeptor. PGRMC-1 könnte somit ein Mitglied der Cytokin- und Wachstumsfaktor-Rezeptorfamilie sein (Falkenstein *et al.* 1996, Selmin *et al.* 1996).

1.2.3.3.1.2 *Synonyme und Homologe von PGRMC-1*

Das Protein, welches unter dem Namen PGRMC-1 (*progesterone receptor membrane component 1*) in der internationalen Nomenklatur verzeichnet wurde, ist unter zahlreichen verschiedenen Synonymen und in den unterschiedlichsten biologischen Kontexten beschrieben worden. In dem folgenden Abschnitt sollen die Synonyme mPR, 25-Dx, Hpr6, VemaA, Ratp28 und IZA sowie das Homolog in der Hefe, Dap1p, mit den beobachteten Funktionen besprochen werden.

mPR

Die Gruppe um Mayer *et al.* konnte 1996 spezifische Bindungsstellen mit unterschiedlich starken Affinitäten für Progesteron in der Membranfraktion von Lebergewebe identifizieren. Eine Bindungsstelle mit hoher Affinität zeigte eine Dissoziationskonstante von $K_d = 11$ nM, während eine weitere Bindungsstelle mit schwacher Affinität eine Dissoziationskonstante von $K_d = 286$ nM aufwies. Die zwei dazugehörigen Proteine, jeweils 28 und 56 kDa schwer, wiesen ein identisches N-terminales Ende auf (Meyer *et al.* 1996). Unter nativen Umständen beobachtete Meyer einen 200 kDa schweren Progesteron-bindenden Komplex, in welchem sowohl das 28 kDa, als auch das 56 kDa schwere Polypeptid mittels Größenausschluss-chromatographie nachgewiesen werden konnte (Meyer *et al.* 1998). Als erstes nachgewiesenes membranständiges Protein mit Bindungsaffinität für Progesteron wurde das Protein in der Literatur zunächst mPR (*membrane progesterone receptor*) genannt (Falkenstein *et al.* 2001, Losel *et al.* 2003). (Das hier beschriebene mPR steht in keinem Zusammenhang mit den oben beschriebenen Isoformen mPR α , β und γ).

25-Dx

In demselben Jahr, in welchem die Arbeitsgruppe um Meyer die Progesteron-bindenden Polypeptide in der Schweineleber erforschte, zeigte eine andere Arbeitsgruppe, dass Dioxin in der Leber der Ratte die Expression einiger Gene hochreguliert (Selmin *et al.* 1996). Unter den über Northern-Blot ermittelten Transkripten kodierte eine Sequenz für ein 223 Aminosäuren langes Polypeptid, welches nach der Größe und der Eigenschaft 25-Dx (25 kDa Peptid, Dioxin-induzierbar) benannt wurde (Selmin *et al.* 1996). PGRMC-1 und 25-Dx unterscheiden sich N-terminal, zeigen jedoch eine zu 89% identische Sequenz (Runko *et al.* 1999). Bei der N-terminalen Differenz könnte es sich um ein

Klonierungsartefakt handeln, da nur einige unterschiedliche Aminosäuren in dem 25-Dx Transkript zu einem konzeptionell größeren Translationsprodukt führen (Runko *et al.* 1999). Cahill weist in seinem Übersichtsartikel über PGRMC-1 darauf hin, dass in verschiedenen Veröffentlichungen, unter anderem von der Arbeitsgruppe, welche 25-Dx erforschte, 25-Dx und PGRMC-1 gleichgesetzt werden (Cahill 2007).

IZAG

Im Jahre 2001 berichtete eine Gruppe über ein Antigen, welches spezifisch in der *Zona fasciculata* und der *Zona reticularis* der Nebennierenrinde, jedoch nicht in der *Zona glomerulosa* exprimiert wird (Raza *et al.* 2001). Die IZAGs (*inner zone antigens*) wiesen zwei miteinander verknüpfte Formen auf. Die 55–60 kDa schwere Form (IZAg2) ließ sich in der Mikrosomen-/Mitochondrien-Fraktion nachweisen, während die 28 kDa Form (IZAg1) im Zytosol gefunden wurde. Über Strukturanalysen und die Erforschung der Expression wurde IZAg als das von Meyer *et al.* (Meyer *et al.* 1998) beschriebene mPR identifiziert. Eine Transportfunktion von IZAg zwischen Mitochondrium und Mikrosomen sowie eine Beteiligung bei der Steroidsynthese wurde vermutet (Raza *et al.* 2001). In einer späteren Veröffentlichung benannte die Gruppe PGRMC-1 in rIZA1 um (Min *et al.* 2005).

Hpr6.6

In Anlehnung an die mögliche Häm-bindende Domäne, welche auch in Cytochrom b5 vorkommt, bezeichnete eine Arbeitsgruppe das humane PGRMC-1 Homolog in Epithelgewebe als Hpr6.6 (*heme progesterone receptor 6.6*) (Gerdes *et al.* 1998).

Ratp28

Eine weitere Forschungsgruppe fand mittels RT-PCR mit Primern für Hpr6.6 in der Leber der Ratte ein homologes Protein, welches sie Ratp28 nannten (Nolte *et al.* 2000).

VEMA

Unter dem Namen VEMA (ventrales Mittellinien-Antigen) war PGRMC-1 als spezifischer Marker für die ventrale Mittellinie im ZNS von Nagern beschrieben worden (Runko *et al.* 1999, Runko and Kaprielian 2002). Das Expressionsmuster von PGRMC-1 glich dem vieler anderer Gene, welche bei der Regulation der Axonformation eine kritische Rolle spielen, unter anderem Robo2. Das Ausschalten des VEMA Orthologs VEM-1 im *Caenorhabditis elegans* führte zu einer Fehlf ormation der Axone. Außerdem konnte eine Interaktion zwischen UNC-40 und VEM-1 nachgewiesen werden (Runko and Kaprielian 2004). Bei UNC-40 handelt es sich um einen hochkonservierten Oberflächenrezeptor, welcher die Signale von Mittellinien-assoziierten chemischen Reizen auf die Axonformierung vermittelt. Aus der Tatsache, dass die ektope Expression von PGRMC-1 in HEK293-Zellen keine Axonformation fördert, folgerten die Autoren, dass PGRMC-1 seine Rolle im Zusammenspiel mit weiteren Regulatoren der Axonformation erfüllt (Runko *et al.* 1999).

In neueren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Progesteron einen proliferativen Effekt auf neuronale Progenitorzellen von Ratten hat und diese Wirkung über PGRMC-1 und die extrazellulär regulierte Kinase ERK1/2 vermittelt ist (Liu *et al.* 2009).

Dap1p

Das PGRMC-1-Homolog in der Hefe, Dap1p (*damage response protein related to membrane-associated progesterone receptors*), ist wichtig für das Fortschreiten des Zellzyklus nach Schädigung durch methylierende Agenzien. Durch ein Ausschalten von Dap1p kommt es zu verlängerten Telomeren, einer mitochondrialen Fehlfunktion und einer Hemmung der Sterolsynthese (Hand *et al.*

2003). Später konnte gezeigt werden, dass Dap1p für die Stabilisierung von Erg1p verantwortlich ist, einem P450-Protein, welches die Ergosterol-Synthese in der Hefe reguliert (Mallory *et al.* 2005).

Passend zu diesen Ergebnissen konnte durch Ausschaltung von PGRMC-1 in einer Ovarialkarzinom-Zelllinie, Ovar 3, die Sensitivität auf das Chemotherapeutikum Cisplatin erhöht werden. In einer weiteren Zelllinie aus Ovarialkarzinomen, dsRed-SKOV-3, kam es durch PGRMC-1-Depletion zu einem verminderten Wachstum der Zellen, während der apoptotische Effekt von Cisplatin vermindert war (Peluso *et al.* 2009, Peluso *et al.* 2008a). Außerdem wurde eine Überexpression von PGRMC-1 in Mamma-, Schilddrüsen- und Kolon-Karzinomen nachgewiesen (Crudden *et al.* 2005). Der bekannte antiapoptotische Effekt in Granulosazellen könnte hier ebenso relevant sein.

1.2.3.3.1.3 Mögliche PGRMC-1-Liganden und Interaktionen

Progesteronbindung

Während viele Veröffentlichungen eine Progesteronaffinität bestimmter Zellfraktionen oder -komplexe, in welchen PGRMC-1 enthalten ist, nachweisen können, bleibt die direkte Progesteronbindung an PGRMC-1 umstritten.

Der Name PGRMC-1 – *progesterone receptor membrane component 1* – verweist auf den Umstand, dass dieses Protein in der Mikrosomenfraktion der Leber als Progesteronbindungsstelle detektiert worden war (Meyer *et al.* 1996). Im nativen Zustand wurde die Progesteronbindungsstelle als ein Komplex von über 200 kDa beschrieben, in welchem mindestens ein 28 kDa und 56 kDa großes Protein enthalten sind (Meyer *et al.* 1998). Durch Überexpression von PGRMC-1 konnte in unterschiedlichen Zellarten die Bindungsfähigkeit für Progesteron erhöht werden (Peluso *et al.* 2006, Falkenstein *et al.* 1999). Peluso konnte eine Progesteronbindungsfähigkeit von rekombinantem und gereinigtem PGRMC-1 mit einer Bindungskonstante von etwa 35 nM nachweisen, während in zwei anderen Veröffentlichungen der Nachweis einer Progesteronbindung an bakteriell exprimiertes PGRMC-1 scheiterte (Peluso *et al.* 2008b, Ghosh *et al.* 2005, Min *et al.* 2005). Die Arbeitsgruppe um Runko, welche die Expression von PGRMC-1 in der ventralen Mittellinie des ZNS untersuchte, konnte trotz zahlreicher verschiedenster Versuchsansätze keine Progesteronbindung durch PGRMC-1 im Rückenmark feststellen (Runko *et al.* 1999).

Cholesterolbindung

In unterschiedlichen Veröffentlichungen über PGRMC-1 spielt Cholesterol eine Rolle und steht im Zusammenhang mit der Bindungsfähigkeit von PGRMC-1 für Progesteron.

Bei Untersuchungen der Bindungsfähigkeit von Lutealmembranen für ³H-Progesteron konnte durch Zugabe von Digitonin dosisabhängig eine Erhöhung der Bindungskapazität erreicht werden (Rae *et al.* 1998). Das Steroidglykosid Digitonin ist in der Lage, Cholesterol und andere Steroide zu komplexieren. Außerdem wurde beobachtet, dass auch die Bindungsfähigkeit des PGRMC-1-Antikörpers in Lutealmembranen abhängig von der Digitonindosis stimuliert wird (Bramley *et al.* 2002). Über eine neuartige Methode der Quervernetzung durch photoaktivierte Aminosäuren konnte in COS-7-Zellen eine Interaktion zwischen PGRMC-1 und sowohl Insig-1 als auch SCAP nachgewiesen werden (Suchanek *et al.* 2005). Diese beiden Proteine sind an der Regulation der 21-Hydroxylation beteiligt, welche einen wichtigen Schritt in der Cholesterolsynthese darstellt. Somit scheint auch IZA/PGRMC-1 bei diesem Vorgang involviert zu sein (Min *et al.* 2005).

Hämbindung

Nicht geklärt ist die wegen der Cytochrom-b5-ähnlichen Struktur denkbare Hämbindung von PGRMC-1 (Mifsud and Bateman 2002). Sowohl Mallory als auch Min beobachteten bei der Aufreinigung von IZA/PGRMC-1 und Dap1p eine Braunfärbung mit maximaler Extinktion bei 400 nm. Zugabe von Dithionat verschob das Extinktionsmaximum hin zu 420 nm. Die aufgeführten Beobachtungen sind charakteristisch für eine Häm-bindende Funktion (Min *et al.* 2004, Mallory *et al.* 2005). Durch spektroskopische Methoden konnte für Dap1p und eine N-terminal verkürzte Form von Maus-PGRMC-1 ein hoch-spinnender Eisenruhezustand nachgewiesen werden (Ghosh *et al.* 2005). Bei weiteren Experimenten mit PGRMC-1 stellte sich heraus, dass Eisen vom Chromo-b-Typ gebunden wird (Min *et al.* 2005).

1.2.3.3.1.4 Verwandte Proteine: HC5 und PGRMC-2

Bei Expressionsstudien von ratp28 über RT-PCR wurde ein weiteres Produkt mit ähnlichen Sequenzen im Nierengewebe der Ratte entdeckt. Das PCR-Produkt HC5 zeigt eine 94%-ige Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz von ratp28 und kodiert für ein Polypeptid mit 75 Aminosäuren (Leel *et al.* 2004). Obwohl auch HC5 eine Transmembrandomäne besitzt, scheint das Protein in der Niere im Zytosol und nicht in der Mikrosomenfraktion lokalisiert zu sein (Leel *et al.* 2004).

Das entwicklungsgeschichtlich sehr eng verwandte Protein PGRMC-2 wurde 1998 aus humanem Gewebe kloniert, und homologe Varianten dieses Proteins konnten in anderen Metozoa nachgewiesen werden. Stammesgeschichtlich entwickelten sich die für PGRMC-1 und PGRMC-2 kodierenden Abschnitte vermutlich aus einem Gen und gleichen sich deshalb in der Gesamttopologie. In einem Sequenzabgleich zwischen den beiden Proteinen zeigten sich insbesondere in der Transmembrandomäne sowie am N-terminalen Ende deutliche Unterschiede (Cahill 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte PGRMC-2-Expression mit einer erhöhten Metastasierung eines endozervikalen Adenokarzinoms des Uterus assoziiert ist (Hirai *et al.* 2004).

1.2.3.3.2 PAIRBP-1

Das zweite Protein, für das eine Beteiligung an der Signaltransduktion von Progesteron angenommen wird, wurde durch einen Antikörper gegen den klassischen Progesteronrezeptor identifiziert. Der Antikörper C-262 ist gegen die Hormonbindungsdomäne des nukleären PR gerichtet und wurde zur Untersuchung der spezifischen Progesteronbindungsstellen im Ovar der Ratte eingesetzt. Granulosazellen der Ratte und des Menschen reagieren dosisabhängig und spezifisch auf Progesteron, obwohl sie den klassischen PR nicht exprimieren. Es konnte ein bisher unbekanntes membranständiges Protein von 60 kDa identifiziert werden, das eine Progesteronbindungsaffinität zeigte (Peluso and Pappalardo 1998). Der C-262-Antikörper konnte die Progesteronwirkung auf Mitose und Apoptose von Granulosazellen blockieren. Mithilfe einer C-262-Affinitätschromatografie wurde das Progesteron-bindende Protein als RDA288 bestimmt (Peluso *et al.* 2004). Die Strukturanalyse des Proteins RDA288 zeigte Ähnlichkeit mit dem Hyaluron-bindenden Protein 4. Ein gegen RDA288 generierter Antikörper blockierte die antiapoptotische Wirkung von Progesteron, und RDA288 konnte auf der Oberfläche von nicht permeabilisierten SIGC lokalisiert werden (Peluso *et al.* 2004).

Fast zeitgleich mit der Erforschung des Progesteron-bindenden Proteins im reproduktiven Gewebe arbeitete die Arbeitsgruppe um Gelehrter (Heaton *et al.* 2001) an RNA-bindenden Proteinen, welche

an der Stabilisierung von mRNA beteiligt sind. Bei der mRNA handelte es sich um das Transkript für den Typ-1-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1). Der PAI-1 reguliert die Plasminogenaktivatoren, welche die Umwandlung von Plasminogen in das aktive fibrinolytische Enzym Plasmin katalysieren. Unter den RNA-bindenden Proteinen befand sich ein 50–53 kDa schweres Protein, welches entsprechend seiner Funktion als Typ-1-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor RNA-bindendes Protein (PAIRBP-1) benannt wurde (Heaton *et al.* 2001). Der PAI-1 gehört zu den Serpinen, zu deren Aufgaben die Regulation der Proteasen gehört. In der Gendatenbank ist PAIRBP-1 unter dem Namen *Serpine mRNA binding protein 1* (SERBP-1) mit vier verschiedenen Isoformen verzeichnet.

Bei der Charakterisierung der mRNA von myometrialen Primärzellen in unserer Arbeitsgruppe konnte die Expression von drei verschiedenen Isoformen nachgewiesen werden (Gellersen, unveröffentlichte Resultate). Im Folgenden werden diese Varianten PAIRBP-1/v1, PAIRBP-1/v3 und PAIRBP-1/v4 genannt. Bei der PAIRBP-1/v3 Variante handelt es sich um eine um 45 Basenpaare verkürzte Form, während bei der PAIRBP-1/v4-Form zusätzlich weitere 18 Basenpaare deletiert sind.

Die RNA-bindende Domäne in PAIRBP-1 befindet sich in der C-terminalen Region, und nachdem in einem Sequenzabgleich weitere Proteine mit ähnlicher Domäne ermittelt werden konnten, wurde eine neuartige Familie von RNA-bindenden Proteinen postuliert (Heaton *et al.* 2001). Für eine universelle biologische Rolle von PAIRBP-1 spricht neben der weiten Verbreitung innerhalb der Metazoa das breite Expressionsmuster von PAIRBP-1 in humanem Gewebe (Heaton *et al.* 2001).

Bei RDA288 und PAIRBP-1 handelt es sich um ein identisches Protein, für das sich der letztere Name in der Literatur durchgesetzt hat und im Folgenden verwendet werden soll. Die Sequenz des Proteins CGI-55, das ebenfalls als Plasminogen-Aktivator-Inhibitor RNA-bindendes Protein identifiziert wurde, gleicht dem des PAIRBP-1 bis auf 6 zusätzliche Aminosäuren bei CGI-55 an Position 202. Es könnte sich bei CGI-55 um eine Spleißvariante von PAIRBP-1 handeln (Heaton *et al.* 2001). In HeLa-Zellen wurde durch eine Inhibition von Methylierungen oder der mRNA-Synthese eine Änderung der kernständigen Lokalisation von CGI-55 beobachtet. Die Gly/Arg-reiche Domäne (RGG/RXR) in dem CGI-55-Protein, welche Ziel der Methyltransferase ist, kommt häufig in Proteinen vor, die bei RNA-Prozessierung und Regulierung der Transkription mitwirken (Passos *et al.* 2006). Einen weiteren Hinweis für nukleäre Funktionen von CGI-55 zeigt die Interaktion mit CHD-3, einem nukleären Protein, welches am Umbau von Chromatin beteiligt ist (Lemos *et al.* 2003).

1.3 Ziel der Arbeit

Im menschlichen Uterus hat Progesteron insbesondere während der Schwangerschaft eine entscheidende Funktion bei der peripartalen myometrialen Ruhigstellung. In vielen Säugetierarten kommt es zum Ende der Schwangerschaft zu einem Abfall des Progesteronspiegels und konsekutiv der Geburtseinleitung. Konträr hierzu bleiben die Progesteronspiegel im menschlichen Organismus zum Ende der Schwangerschaft konstant. Angenommen wird ein funktioneller Progesteronentzug. Die Signalkaskaden, welche den Zustand des Myometriums von einem ruhigen in einen kontraktilen Status führen, sind weiterhin ungeklärt.

Von klinischer Relevanz könnte die Entschlüsselung der möglicherweise verantwortlichen Progesteronrezeptoren insbesondere bei der Erforschung der Ursachen und Therapie von Fehl- und Frühgeburten sein.

Um die physiologische Relevanz von PAIRBP-1, PGRMC-1 und PGRMC-2 im menschlichen Uterus zu klären, ist die Identifizierung ihrer intrazellulären Lokalisation sowie einer möglichen Interaktion der genannten Proteine unerlässlich.

Als Zellsystem wurden deshalb myometriale Primärzellen ausgewählt. Außerdem kamen verschiedene Zelllinien zum Einsatz, in denen die genannten Proteine überexprimiert wurden. Zunächst wurden, als wichtigstes Handwerkszeug, mehrere Antikörper gegen PAIRBP-1, PGRMC-1 und PGRMC-2 auf ihre Spezifität in verschiedenen Anwendungen getestet.

Die Zellen wurden dem Einfluss von Progesteron oder cAMP ausgesetzt. Untersucht wurde die Auswirkung auf die intrazelluläre Lokalisation und auf mögliche Interaktionen der genannten Proteine.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden sterile Kunststoffartikel der Firmen Nunc, Falcon, Greiner und Sarstedt bezogen sowie sterile Lösungen und Medien verwendet. Alle Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.1.1 Isolierung und Kultivierung von myometrialen Primärzellen aus uterinem Gewebe

Gewebe von Hysterektomien prämenopausaler Frauen wurde zur Gewinnung von Primärzellen verwendet. Indikationen für den Eingriff waren gutartige Tumoren des Myometriums (Uterus myomatosus) oder Senkungsbeschwerden des Uterus (Descensus uteri). Die Gewebeproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Lindner, ELIM-Krankenhaus, zur Verfügung gestellt. Die Verwendung solcher Gewebeproben wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt.

Verdaulösung: 20 ml Ham's F12 mit HEPES (Sigma)
1 ml Kollagenase Typ 2 (20 mg/ml) (Worthington)
200 µl Fungizone (250 µg/ml) (Invitrogen)
50 µl Primocin (50 mg/ml) (Invitrogen)
1 ml DNase 1(2000 Kunitz U/ml) (Roche)
1 ml Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml) (PAA)

Percoll-Gradient: 6,66 ml D-PBS
1,34 ml 9% NaCl
12 ml Percoll-400 (Pharmacia)

Kulturmedium: DMEM/Ham's F12 ohne Phenolrot (Sigma)
10% FCS (PAA)
100 IU/ml Penicillin (PAA)
100 µg/ml Streptomycin (PAA)

Zur Gewinnung von myometrialer glatter Muskulatur wurde zunächst das Endometrium durch stumpfes Abschaben mithilfe eines Skalpells vom Myometrium getrennt. Danach wurde das Myometrium grob zerstückelt und zum enzymatischen Verdau für maximal 14 h in der steril filtrierten Verdaulösung bei 37°C inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde dann mit einer 10 ml Pipette resuspendiert und durch einen autoklavierten Nylonstrumpf in ein konisches Röhrchen (50 ml) filtriert. Das Filtrat wurde mit 5 ml Versene (0,2 mg EDTA/ml; Cambrex) versetzt und auf 50 ml mit Ham's F12 aufgefüllt. Ein Gewebepellet wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 400 g mit anschließender Bremsung Stufe 5 (von 9 möglichen Bremsstufen) hergestellt, in 15 ml Ham's F12 resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen auf einen Percoll-Gradienten geschichtet. Mithilfe des Percoll-Gradienten gelingt eine Abtrennung der Erythrozyten. Durch Zentrifugation bei 1080 g ohne Bremsung für 20 min sammelten sich die myometrialen Zellen zwischen Medium und Percoll-Gradienten und konnten mit einer Pipette abgesaugt und in ein 50-ml-Röhrchen überführt werden. Mit Ham's F12 wurde auf 50 ml aufgefüllt und bei 600 g, Bremsung 5, für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in der gleichen Vorgehensweise zwei weitere Male gewaschen und dann in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und ausplattiert.

2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Kulturmedium für alle Zelllinien:

Skut-Medium: DMEM/Ham's F12 ohne Phenolrot (Sigma)
10% FCS (PAA)
2 mM Glutamin (PAA)
100 IU/ml Penicillin (PAA)
100 µg/ml Streptomycin (PAA)

2.1.2.1 *Humanes Uterussarkom: Skut-1B*

Die Skut-1B-Zelllinie entstammt humanen uterinen Sarkomzellen (ATCC Nr. 115; American Type Culture Collection, Rockville, USA), wächst adhärent und wurde alle 3–4 Tage 1:5 passagiert.

2.1.2.2 *Human-embryonale Niere: HEK293*

Die HEK293 Zelllinie entstammt einer humanen embryonalen Niere, wächst adhärent und wurde alle 3–4 Tage 1:10 passagiert.

2.1.2.3 *Simianes Nierenzellkarzinom: COS-7*

Die COS-7-Zelllinie entstammt einem Nierenkarzinom eines Affen (African green monkey) (ATCC Nr. CRL-1651; American Type Culture Collection, Rockville, USA). Die Zellen wachsen adhärent und wurden alle 3–4 Tage im Verhältnis 1:5 passagiert.

2.1.2.4 *Humanes hepatozelluläres Karzinom: HepG2*

Die HepG2-Zelllinie entstammt einem humanen hepatozellulären Karzinom. Die Zellen wachsen adhärent und wurden alle 3–4 Tage im Verhältnis 1:10 passagiert.

2.1.2.5 *Humanes Adenokarzinom der Mamma: MDA-MB-231*

Die MDA-MB-231-Zelllinie entstammt einem humanen Adenokarzinom der Mamma. Die Zellen wachsen adhärent und wurden alle 3–4 Tage im Verhältnis 1:10 passagiert.

2.1.3 Stimulierung der Zellkulturen

Um den Einfluss verschiedener Substanzen, wie z.B. von Steroiden, auf das Expressionsmuster unterschiedlicher Proteine zu untersuchen, wurden kultivierte Zellen mit Substanzen verschiedener Konzentration und über unterschiedlich lange Zeiträume stimuliert. Um Verfälschungen durch residuelle Steroide im Medium zu vermeiden und den Zellen alle Steroide vor der Behandlung zu entziehen, werden die Zellen eine bestimmte Zeit vor der Stimulation in Kulturmedium, welches mit steroid-depletiertem fetalem Kälberserum FCS (DCC-FCS) versetzt ist, gehalten. Die Herstellung von DCC-FCS erfolgt durch die Inkubation von FCS mit einer dextranbeschichteten Aktivkohle (dextran coated charcoal, DCC) für eine Stunde bei 55°C unter Schütteln. Die Aktivkohle adsorbiert nicht-polare Moleküle, wie Steroidhormone, und wurde nach Inkubation durch Zentrifugation und Sterilfiltration durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße entfernt. Weiterhin wurde Phenolrot-freies Kulturmedium verwendet, da dem Farbstoff eine östrogene Wirkung zugeschrieben wird.

2.1.4 Cholesterol-Depletion durch Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD)

Reagenzien:

100 x ITS + 3 (Sigma)	Insulin-Transferrin-Selen-Präparat mit Olein- und Linolsäurezusatz
Ham's F-12 (Sigma)	
M- β -CD (Sigma)	zyklisches Oligosaccharid mit Cholesterol-komplexierenden Eigenschaften
Cholesterol (Sigma)	

Serumfreies Medium: Ham's F-12 mit 10 ml/L 100x ITS+3

Um den Einfluss einer Änderung der Plasmamembraneigenschaften durch Cholesterol-Depletion zu untersuchen, wurde Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD) angewendet. Die Nutzung von M- β -CD ist eine effiziente Methode, um selektiv Cholesterol aus der Plasmamembran zu extrahieren (Ohtani *et al.* 1989). Cholesterol wird in den hydrophoben Hohlräumen des Cyclodextrins aufgenommen und es bildet sich ein M- β -CD-Cholesterol-Komplex. Diese Reaktion ist durch Zugabe von Cholesterol reversibel (Klein *et al.* 1995).

Zur Herstellung einer 40 mM Stammlösung wurde 0,1 g M- β -CD mit einem Molekulargewicht von 1135 unter ständigem Rühren in 2,2 ml destilliertem Wasser für 30 min gelöst. M- β -CD kann in trockener Form bei Raumtemperatur und als Lösung bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden.

Jeweils $4,5 \times 10^4$ myometriale Primärzellen wurden in in 8-Well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc) (Fläche 0,9 cm²) in Skut-Medium ausgesät. Nach 24 h folgte die Transfektion mit den jeweiligen Vektoren (siehe Abschnitt 2.1.6). Am folgenden Tag wurde das Medium auf Ham's F-12/ITS+3 gewechselt und 14 h nach der Serumdepletion wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 15 mM M- β -CD für 20 min bei 37°C inkubiert und mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Stimulation mit Progesteron (1 μ M), Cholesterol (1 mM) oder der Kombination beider Reagenzien für 15 min.

2.1.5 Chemische Protein-Quervernetzung in vivo

Mit chemischen Quervernetzungsreagenzien können Proteine, welche intrazellulär co-lokalisieren oder interagieren, kovalent gebunden werden. Dazu wurden DSP (Dithiobis-succinimidylpropionat; Pierce) und DSS (Disuccinimidyl-suberate; Pierce) angewendet.

2.1.5.1 DSP-Quervernetzung

Bei DSP handelt es sich um einen membranpermeablen bifunktionellen N-Hydroxsuccimid-Ester, welcher mit primären Aminen kovalente Amidbindungen bildet. Diese Bindung ist durch Thiole spaltbar, also reversibel.

Um die Proteine von mit PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5 transfizierten HEK293-Zellen quervernetzen, wurden die Zellen mit einer Dichte von $6,5 \times 10^5$ in 6-er Wells ausgesät und 1 Tag später mit PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5 transfiziert. 2 Tage später erfolgte die Quervernetzung mit anschließender Proteinernte. Die DSP-Lösung wurde kurz vor Gebrauch angefertigt, da der enthaltene N-Hydroxsuccimid-Ester leicht hydrolysiert. Bei einem Molekulargewicht von 404,42 g/mol wurde für die Stammlösung (20 mM) 29,9 mg DSP in 3,69 ml

wasserfreiem DMSO gelöst. Kurz vor der Quervernetzung wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Die DSP-DMSO-Stammlösung wurde mit PBS verdünnt, in einer Endkonzentration von 2 mM auf die Zellen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Durch Zugabe von 20 mM Tris pH 7,5 in der Endkonzentration und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und geerntet.

2.1.5.2 DSS-Quervernetzung

DSS gehört wie DSP zu den membranpermeablen bifunktionellen N-Hydroxysuccimid-Estern, ist aber im Gegensatz zu DSP nicht durch Thiole spaltbar, bewirkt also eine irreversible Bindung. Für die Stammlösung von 25 mM wurde eine Ampulle DSS (2 mg) in 216 µl DMSO gelöst. Die Trockenform von DSS kann bei 4°C aufbewahrt werden. Zur Vermeidung von Kondensationswasser auf dem Produkt muss DSS auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Lösung muss unmittelbar vor Anwendung vorbereitet werden.

In 6-er Wells mit einer Dichte von 1×10^6 ausgesäte und mit PGRMC-1/myc oder dem Leervektor transfizierte HepG2-Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion mit 100 nM P4 für 15 min behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 3,5 mM DSS (Verdünnung der Stammlösung mit PBS) für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mM Tris pH 7,5 und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS konnten die Zellen geerntet werden.

2.1.6 Transiente Transfektion

Bei einer transienten Transfektion handelt es sich um das zeitweilige Einbringen von Fremd-DNS in eukaryontische Zellen. Die zellfremde DNS wird in Form von Plasmiden in die Zelle geschleust; Expressionskonstrukte enthalten ein Gen, welches unter der Kontrolle eines meist viralen Promotors stark exprimiert wird.

Verwendete Expressionskonstrukte (gestellt von Frau Dr. B. Gellersen, Endokrinologikum):

Tabelle 1: Vektoren.

Expressionskonstrukt	Vektor	cDNA-Insert (human)	Tag (C-terminal)
pcDNA/PGRMC-1/myc-His	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	PGRMC-1	Myc-His
pcDNA/PGRMC-2/myc-His	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	PGRMC-2	Myc-His
pcDNA/PAIRBP-1_v1/V5	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	PAIRBP-1(v1)	V5
pcDNA/PAIRBP-1_v3/V5	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	PAIRBP-1(v3)	V5
pcDNA/PAIRBP-1_v4/V5	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	PAIRBP-1(v4)	V5
pFc/PGRMC-1/Halo	pFc8A CMV Flexi (Promega)	PGRMC-1	Halo
pFc/PGRMC-2/Halo	pFc8A CMV Flexi (Promega)	PGRMC-2	Halo
pFc/PAIRBP-1_v1/Halo	pFc8A CMV Flexi (Promega)	PAIRBP-1(v1)	Halo

2.1.6.1 Transiente Transfektion mithilfe von PolyFect

Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde das Polyfect Transfection Reagent (Qiagen) angewendet. PolyFect ist ein aktiviertes Dendrimer, welches mit der DNS eine positive Ladung bildet, wodurch die Bindung an negativ geladene Rezeptoren auf der Membran ermöglicht wird. Die Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. HEK293-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von $0,4 \times 10^5$ in 8-Well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc) auf einer Fläche von $0,8 \text{ cm}^2$ in $0,25 \text{ ml}$ Skut-Medium ausgesät. Für die Transfektion in einer Kammer wurden $0,2 \text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNS und $2 \text{ }\mu\text{l}$ PolyFect-Reagenz in $10 \text{ }\mu\text{l}$ Opti-MEM (Invitrogen) eingesetzt (Verhältnis DNS:Reagenz 1:10). Das Medium wurde jeweils kurz vor der Transfektion gewechselt. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Inkubator.

2.1.6.2 Transiente Transfektion mithilfe von Fugene

Myometriale Primär-, HepG2- sowie MDA-MB-231-Zellen wurden mit der Fugene-Methode (Roche) transfiziert, bei der das lipidbasierte Reagenz mit der DNS komplexiert und so den Durchtritt durch die Membran ermöglicht. Unter Verwendung des Reagenzes Fugene wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für die Transfektion in 8-Well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc) auf einer Fläche von $0,8 \text{ cm}^2$ wurden myometriale Primärzellen 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von $4,5 \times 10^5$ in $0,25 \text{ ml}$ Skut-Medium ausgesät. Ein Wechsel des Mediums erfolgte kurz vor der Transfektion; je Well wurde $0,2 \text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNS und $0,8 \text{ }\mu\text{l}$ Fugene in $10 \text{ }\mu\text{l}$ Opti-MEM verwendet (Verhältnis DNS:Reagenz 1:4). Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 24 h inkubiert.

2.1.6.3 Transiente Transfektion mithilfe von Lipofectamine

Zur Transfektion von Skut-1B-Zellen wurde die Methode mit Lipofectamine (Invitrogen) angewandt. Eine Bindung zwischen negativ geladener DNS und kationischen Lipiden führt zu einem stabilen DNS-Liposomenkomplex, welcher mit der ähnlich aufgebauten Plasmamembran verschmilzt (Lipofektion). Bei der Verwendung des Lipofectamine™ 2000 Reagenzes wurde das Protokoll des Herstellers angewandt. Zur besseren Anhaftung der Zellen wurden die Kulturplatten mit Poly-L-Lysin beschichtet (Vorgehen nach Angaben des Herstellers Roche). Die Zellen wurden in 12-Wells mit einer Dichte von $1,2 \times 10^5$ 1 Tag vor der Transfektion in Skut-Medium ausgesät und nach einem Mediumwechsel kurz vor der Transfektion mit $0,4 \text{ }\mu\text{g}$ DNS und $1 \text{ }\mu\text{l}$ Lipofectamine in Opti-MEM je Well transfiziert (Verhältnis DNS: Reagenz 1:2,5). Danach wurden die Zellen weitere 24 h inkubiert.

2.1.7 Immunfluoreszenz

Um die Lokalisation von PAIRBP-1, PGRMC-1 und PGRMC-2 innerhalb der Zelle sichtbar zu machen, wurden myometriale Primärzellen in 8-Well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc) mit einer Dichte von $4,5 \times 10^5$ auf einer Fläche von $0,8 \text{ cm}^2$ in Skut-Medium ausgesät. Der Vorteil der Kammer-Objektträger ist die Möglichkeit der Kultivierung und nachfolgender Immunfluoreszenz ohne den Transfer der Zellen. Die Transfektion mit dem jeweiligen Vektor erfolgte am folgenden Tag. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 10 min fixiert. Nach mehreren Waschvorgängen wurden die Zellen mit 0,2% Triton-X 100 10 min permeabilisiert und anschließend wieder mehrmals mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Objektträger für 30 min mit filtriertem Ziegen Serum (*Normal goat serum*; NGS) inkubiert. Das NGS wurde abgesaugt und es folgte die Inkubation mit dem

Primär-Antikörper in PBS für 1 h (Spezifikationen und Verdünnungen der Antikörper siehe Tabelle 2 und 3). Die Objektträger wurden 4×5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Sekundär-Antikörper in PBS + 2% NGS für 1 h inkubiert. Zur Anfärbung des Kernes wurden die Zellen für 20 min mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Roche) inkubiert. Zum Eindecken der Zellen mit ProLong Gold (Invitrogen) wurde das Gitter entfernt und ProLong Gold blasenfrei auf den Objektträger aufgetragen. Ein Deckglas wurde befestigt und Luftblasen wurden durch vorsichtiges Drücken mithilfe eines Glasstabs entfernt. Die Objektträger wurden 1 Tag bei Raumtemperatur in der Dunkelheit getrocknet und anschließend bei -20°C trocken aufbewahrt.

Tabelle 2: Primäre Antikörper.

primärer Antikörper	Quelle	erzeugt in	Erkennungssequenz	Verdünnung
S1 (PGRMC-1)	Dr. Ralf Lösel	Kaninchen	Schwein Gesamtprotein	IF 1:50 WB 1:2500
T2 (PGRMC-1)	Dr. Ralf Lösel	Kaninchen	Schwein N-Terminal AS 1–15	IF 1:100
7860 (PGRMC-1)	Dr. Ralf Lösel	Kaninchen	Human AS 53–68	IF 1:50 WB 1:2500
395 (PGRMC-2)	Dr. Ralf Lösel	Kaninchen	humanes Gesamtprotein	IF 1:50 WB 1:500
PGRMC-2	Abnova	Maus	Human AS 124–224	IF 1:100 WB: 1:1000
PAIRBP-1	Abnova	Maus	rekombinantes PAIRBP-1	IF 1:100 WB: 1:1000
Cadherin	Abcam	Maus	Huhn AS 889–912	IF 1:500
Cadherin	Abcam	Kaninchen	Huhn AS 889–912	IF 1:100
Calreticulin	Novus	Kaninchen	Maus AS 154–347	IF 1:100
Lamp	Abcam	Kaninchen	Human AS 407–416	IF 1:250
Caveolin	Upstate Biotechnology	Kaninchen	Human	IF 1 :50
V5	Rockland	Kaninchen	–	IF: 1:100 WB: 1:5000
V5	Invitrogen	Maus	–	IF: 1:500 WB: 1:5000
Myc	Abcam	Kaninchen	–	WB: 1:5000
Myc	Covance	Maus	–	IF: 1:1000 WB: 1:1000
HaloTag	Promega	Kaninchen	–	IF : 1:500 WB: 1:1000

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper.

sekundärer Antikörper	Konjugat	Firma	erzeugt in	Verdünnung
Maus IgG (488)	AlexaFluor-488	Invitrogen	Ziege	IF 1:250
Maus IgG (568)	AlexaFluor-568	Invitrogen	Ziege	IF 1:250
Kaninchen IgG (488)	AlexaFluor-488	Invitrogen	Ziege	IF 1:500
Kaninchen IgG (568)	AlexaFluor-568	Invitrogen	Ziege	IF 1:500
Maus IgG (HRP)	Meerrettich-Peroxidase	Dianova	Ziege	WB 1:5000
Kaninchen IgG (HRP)	Meerrettich-Peroxidase	Dianova	Ziege	WB 1:2500

2.1.8 Konfokalmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Elektronen eines Fluoreszenzfarbstoffs durch Licht in einer definierten Wellenlänge angeregt. Durch die Rückkehr der Elektronen in den energetischen Grundzustand wird Licht in einer definierten Wellenlänge emittiert. Eine duale Immunfluoreszenz von verschiedenen Proteinen wird durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren möglich. Bei der konfokalen Lasermikroskopie wird der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff angeregt und das emittierte Licht wird in einer fokalen Ebene gemessen. Licht, welches außerhalb des Fokus liegt, wird ausgeschlossen. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurde die räumliche Lage verschiedener Proteine bestimmt und verglichen. Für die Aufnahmen wurde das Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta verwendet in der folgenden Einstellung: Objektiv Plan/Apo 63×1.4 oder Objektiv Plan/Apo 40×1.4.

Tabelle 4: Filter und Reflektorsysteme.

Filter-Kurzbeschreibung	Anregungsfilter [nm]	Teilerspiegel [nm]	Sperrfilter [nm]	detektierter Fluoreszenzfarbstoff
A	340–380	400	425	DAPI
Filter Set 15	515–560	580	580	AlexaFluor-568
Filter Set 10	470	500	525	AlexaFluor-488

2.1.9 HaloTag Ligandenbindung

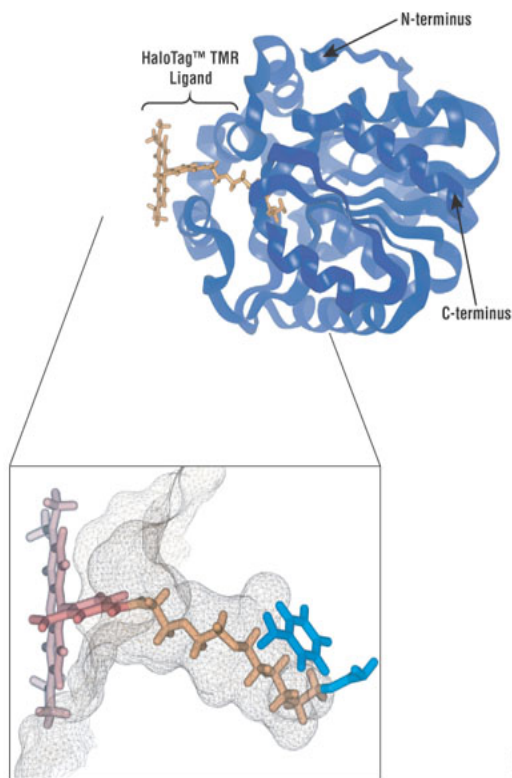


Abbildung 6: Molekularmodell eines Proteins mit HaloTag und kovalent gebundenem HaloTag-TMR-Liganden.

Oben: Überblick der Proteinstruktur, mit einer Vergrößerung des Ligandentunnels unten. Der HaloTag-TMR-Ligand (fluoreszente Domäne in rot, reaktive Domäne in orange) ist kovalent gebunden an das Aspartat (blau markiert). Das Ersetzen der katalytischen Base (Histidin) durch ein Phenylalanin (auch blau markiert) macht es für das Protein unmöglich die kovalente Bindung zu hydrolysieren (Promega).

Reagenzien: HaloTagTMR (Promega)

Eine neuartige Methode, um in lebenden und fixierten Zellen Proteine darzustellen, ergibt sich durch die Verwendung von HaloTag und HaloTag-Liganden. Das HaloTag wurde durch Veränderungen einer Wildtyp-Hydrolase synthetisiert. Anders als die Wildtyp-Hydrolase, welche einen zwischenzeitlichen Enzym-Substrat-Komplex bildet, kommt es bei dem HaloTag-Protein zu einer kovalenten Bindung der reaktiven Einheit eines HaloTag-Liganden. Die reaktive Einheit besteht aus einem Chloralkan. Durch die Verbindung der reaktiven Einheit des Liganden mit einer fluoreszierenden Einheit kann das entsprechende Protein unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Anfärbung der mit einem HaloTag versehenen Fusionsproteine in noch lebenden, nicht permeabilisierten Zellen (Abb. 6).

Um eine mögliche Translokation von PAIRBP-1/Halo und PGRMC-1/Halo innerhalb der Zelle unter dem Einfluß von Progesteron (P4) oder 8-bromo-cAMP darzustellen, wurden myometriale Primärzellen mit einer Dichte von $4,5 \times 10^4$ in 8-Well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc) ausgesät und 1 Tag später mit dem jeweiligen Vektor transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min bei 37°C mit $10 \mu\text{M}$ HaloTag[®]-TMR-Ligand inkubiert. Dieser Ligand enthält Tetramethyl-Rhodamin (TMR), welches Licht mit einer Wellenlänge von 555 nm absorbiert und Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 585 nm emittiert. Ausgewählt wurde der Ligand, weil die

angegebenen Wellenlängen kompatibel sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen der verwendeten Sekundärantikörper und den Filtern des verwendeten Mikroskops. Es folgten drei Waschgänge mit PBS. Danach wurden die Zellen 15 min mit 100 nM P4 bzw. 0,5 mM 8-bromo-cAMP stimuliert. Die Kontrollen blieben unstimuliert. Danach wurden die Zellen sogleich mit 4% PFA fixiert.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

Die für die proteinbiochemischen Methoden verwendeten Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen Gibco, ICN, NEB, NUNC, Serva und Sigma bezogen, bei Abweichungen wird dies gesondert angegeben. Die Molekulargewichtstandards stammen von Amersham und Invitrogen.

2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

2.2.1.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Radio-Immunoprecipitation-Buffer (Ripa):

in PBS
1% IGEPAL Ca-630
0,1% SDS
0,5% Na-Deoxycholat
1 Tab/ml Proteinase Inhibitor „Complete“ (Roche)

Ripa-N:

Ripa
150 mM NaCl

Ripa-T:

in PBS
0,1% SDS
1% Triton X-100
1% Na-Deoxycholat
150 mM NaCl
10 mM Tris HCl pH 7,4
1 mM EDTA
1 Tab/ml Proteinase Inhibitor „Complete“(Roche)

Zur Herstellung von Gesamtzellprotein wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 80 µl eiskaltem Ripa-Puffer (falls nicht anders angegeben) je 6-er Well abgeschabt und in Mikro-Tubes für 15 min auf Eis gestellt. Nach einer Sonifikation für 15 sec wurde das Pellet bei 11000 g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand aliquotiert.

2.2.1.2 *Herstellung von zytosolischen und nukleären Proteinextrakten*

<u>ProtExA:</u>	in H ₂ O
	10 mM HEPES
	10 mM KCl
	0,1 mM EDTA
	0,1 mM EGTA
	2 mM DTT
	1 Tab/ml Proteinase Inhibitor (Roche)
<u>ProtExB:</u>	ProtExA
	400 mM NaCl
	1% NP-40

Um die Lysate in nukleäre und zytosolische Extrakte aufzutrennen, wurden je 3 Wells einer 6-Well-Platte vereinigt. Zuerst wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und mit 50 µl ProtExA je Well geerntet und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. 7,5 µl 20% IGEPAL wurde hinzugegeben und für 10 sec gevortext. Nach der Abzentrifugation für 5 min bei 11000 g und 4°C konnte der Überstand als zytosolischer Extrakt aliquotiert werden. Das Pellet wurde in 100 µl ProtExB resuspendiert, im Eisbad für 15 min inkubiert und für 15 min bei 11000 g und 4°C abzentrifugiert. Dadurch wurden die nukleären Proteine als Überstand gewonnen.

2.2.1.3 *Herstellung von Schnell-Gesamtproteinextrakten*

<u>Lämmli-Puffer (Maniatis):</u>	2% SDS
	0,1% Bromphenolblau
	10% Glycerol
	50 mM Tris-HCl pH 6,6
	2% β-Mercaptoethanol

Zur schnellen Extraktion von Proteinen aus 24-er Wells wurde der Lämmli-Extraktionspuffer auf 85°C erhitzt. Mit 30 µl Puffer je Well wurden die Zellen geerntet und danach für 15 sec sonifiziert. Darauf wurden die Proben bei 100°C für 5 min erhitzt, kurz abzentrifugiert und dann für die Gelelektrophorese aufgetragen.

2.2.2 **Proteinbestimmung nach Lowry**

Um nach der Herstellung von Zelllysaten deren Proteinkonzentrationen zu ermitteln, wurde der Lowry-Test eingesetzt. Als Maß der Proteinkonzentration einer Probe dient ein instabiler blauer Komplex, der aus der Biuret-Reaktion (Komplex aus Proteinen mit Kupferionen) mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz gebildet wird. Der DC Protein Assay (Biorad) wurde zum Nachweis des Proteingehalts eingesetzt. Es erfolgte eine 4-fach Bestimmung der Proteinmenge und jeweils 5 µl der Probe wurden nach Anweisung des Herstellers verarbeitet. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 690 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät „Safire 2“ (Tecan) gemessen. Als Standard diente eine erstellte BSA-Eichreihe (0,17–1,37 µg/µl).

2.2.3 Westernblot

Um die Expression von endogenen und exogenen Proteinen nachzuweisen, wurde die Westernblot-Analyse angewandt. Dabei wurden die denaturierten Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Weiterverwendung auf eine Membran transferiert. Die Membran (der Westernblot) wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu detektierende Protein (Primärantikörper) und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert. Durch die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Luminol (Chemilumineszenzreaktion) kann die Position des Zielproteins auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

2.2.3.1 Westernblot mit dem NuPage-System

2.2.3.1.1 Gelelektrophorese

Crash-Puffer (2 x): 10% SDS
 25% Glycerol
 10 mM Tris pH 7,2
 0,01% Bromphenolblau
 25% β -Mercaptoethanol

Verwendet wurde das Fertiggel-Elektrophoresesystem (XCell SureLock™) der Firma Invitrogen. Bei dieser Methode wurden, wenn nicht anders angegeben, 6 μ g bis 200 μ g Gesamtprotein mit dem reduzierenden Probenpuffer (Crash-Puffer) versetzt und für 10 min bei 99°C denaturiert. Die denaturierten Proben wurden auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel (10% NuPAGE®, Novex Bis-Tris-Fertigel; Invitrogen) aufgetragen und bei konstant 200 V im elektrischen Feld für 1 h aufgetrennt. Gegenüber herkömmlichen SDS-PAGE-Systemen ist der Vorteil dieser Methode der neutrale pH-Wert während des Gellaufs, wodurch es zu einer verbesserten Proteinstabilität und Bandenschärfe kommt. Als Laufpuffer wurde MOPS (Invitrogen) eingesetzt, mit dem eine Auftrennung der Proteine im Bereich von 15 bis 200 kDa möglich war. Durch den Zusatz von NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen) in den Laufpuffer wurde die Reoxidation der Proteine verringert. Als Marker für die Proteingröße diente SeeBlue Prestained Protein Standard (Invitrogen).

2.2.3.1.2 Proteintransfer

Mithilfe einer Blotting-Kammer (Invitrogen) wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-Immobilon-P Transfermembran (PVDF) übertragen. Dabei wurde die hydrophobe PVDF für die Kammer zurechtgeschnitten und durch Methanol aktiviert. Nach dem Aufbrechen der Gelkassette wurde die PVDF ohne Blasen auf das Gel gelegt. Mit Transferpuffer (Invitrogen) befeuchtete Stücke Whatman-Papier wurden auf die andere Seite des Gels und auf die PVDF gelegt. Mit einem Stapel von Blot-Kissen wird das Transfer-Paket in die Transferkammer eingespannt und mit Transferpuffer bedeckt. Anschließend wurde der „Nass“-Transfer bei 30 V für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Kontrolle eines gleichmäßig erfolgten Transfers wurde das NuPAGE®-Gel mit Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) angefärbt. Zur besseren Fixierung der Proteine wurde die Membran kurz in Methanol geschwenkt und für 10 min bei 37°C getrocknet.

2.2.3.1.3 *Immundetektion*

TBS: 15 mM Tris (pH 7,6)
136 mM NaCl

Blockierungslösung (Blotto): 5% (w/v) Milchpulver (1% Fettgehalt) in TBS

TBS-T: TBS
0,03% Tween-20

Um die PVDF-Membran für die Immundetektion nutzen zu können, muss diese durch Methanol „reaktiviert“ werden. Um unspezifische Bindungen des Erst-Antikörpers zu vermeiden, wurden die restlichen Bindungsstellen durch die Inkubation mit Blotto für 30 min abgesättigt. Der Erst-Antikörper des jeweiligen Antigens wurde in der Blockierungslösung verdünnt und in dieser Antikörper-Lösung wurde die PVDF-Membran bei 4°C über Nacht auf einem Schwenktisch inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBS erfolgte die Inkubation in der Zweit-Antikörper-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur. Der ungebundene Anteil des Zweit-Antikörpers wurde durch erneutes mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Danach wurde die Membran mit TBS und ddH₂O gespült. Zur Darstellung des spezifisch gebundenen Zweit-Antikörpers und damit des Proteins wurde das Detektionskit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) verwendet. Die Lösungen A (Stable Peroxide Solution) und B (Luminol/Enhancer Solution) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membran wurde 5 min bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert und anschließend in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Chemilumineszenzreaktion wurde durch Exposition mit einem Röntgenfilm RX (Fuji) nachgewiesen.

2.2.3.1.4 *Entfernen des Antikörpers auf dem Westernblot*

Um einen Westernblot nach der Detektion mit einem Antikörper für weitere Detektionen mit anderen Antikörpern zu verwenden, wurde der Antikörper von seiner spezifischen Bindung entfernt. Zunächst wurde der Blot 20 min auf dem Schüttler in Blotto inkubiert. Nach einmaligem Waschen in destilliertem Wasser folgte eine 10-minütige Inkubation in 0,5 M NaCl/0,5 M Essigsäure und Waschen mit destilliertem Wasser. Die Entfernung des Antikörpers wurde durch eine Inkubation in 1,5 M Tris (pH 7) für 1 min und einen weiteren Waschgang beendet.

2.2.4 Methoden zur Identifizierung von PGRMC-1 Interaktionen

2.2.4.1 *HaloLink Resin Pulldown*

Reagenzien:

Waschpuffer: 100 mM Tris (pH 7,6)
 150 mM NaCl
 1 mg/ml BSA
 0,05% IGEPAL

Bindungspuffer: 100 mM Tris (pH 7,6)
 150 mM NaCl
 0,05% IGEPAL

Um mögliche Interaktionen zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 nachzuweisen, wurden Extrakte von mit PGRMC-1/HaloTag- oder PAIRBP-1/HaloTag-Fusionskonstrukten transfizierten Zellen für die HaloLink Resin Methode (Promega) verwendet. Hierbei werden die jeweiligen HaloTag-Fusionsproteine kovalent an einen auf Sepharosekügelchen immobilisierten HaloTag-Liganden gebunden. Die Fusionsproteine sowie die Interaktionspartner werden bei dieser Prozedur mit präzipitiert und können später über einen Westernblot und Immundetektion nachgewiesen werden.

Zur Äquilibration wurde das HaloLink Resin für 1 min bei 595 g abzentrifugiert, 3-mal mit Bindungspuffer gewaschen und der Überstand verworfen und in dem Bindungspuffer resuspendiert. Proteinlysate (500 µg) wurde mit dem äquilibrierten HaloLink Resin für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert und anschließend für 2 min bei 595 g abzentrifugiert. Nach 5-maligem Waschen für 2 min mit dem Waschpuffer und Abzentrifugation bei 595 g wurden die an die Sepharose gebundenen Proteine in Lämmli-Puffer suspendiert und für 5 min bei 99°C aufgeköcht. Der Nachweis der Proteine im Überstand erfolgte mit der Westernblot-Methode.

2.2.4.2 Co-Immunpräzipitation

Reagenzien:

Ripa+BoeCo: 0,1% SDS
1% Na-Deoxycholat
150 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM EDTA
1 Tab/ml Proteinase Inhibitor Complete (Roche)

Ripa-T+BoeCo: 0,1% SDS
1% Triton X-100
1% Na-Deoxycholat
150 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM EDTA
1 Tab/ml Proteinase Inhibitor Complete (Roche)

Ladungspuffer:

Crash-Puffer (2x): 10% SDS
25% Glycerol
10 mM Tris pH 7,2
0,01% Bromphenolblau
25% β -Mercaptoethanol

Eine weitere Methode des Nachweises von Interaktionen zwischen Proteinen in vivo ist die Co-Immunpräzipitation. Das Prinzip beruht auf der spezifischen Bindung eines Antigens in einem Proteinlysat an den jeweiligen Antikörper und der anschließenden Präzipitation durch an Sepharose-Kügelchen immobilisiertes Protein A/G, welches an den Fc-Teil des Antikörpers bindet. Das Antigen des jeweiligen Antikörpers sowie mögliche Interaktionspartner können nach Abtrennung vom Protein A/G nun im Westernblot nachgewiesen werden.

Um eine mögliche Interaktion zwischen endogenem PGRMC-1 und exogenem PGRMC-1/myc nachweisen zu können, wurden HEK293-Zellen mit PGRMC-1/myc transfiziert. Vor der Proteinernte erfolgte eine reversible Verlinkung von Proteininteraktionen durch DSP. Die Zellen wurden mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend mit Ripa/BoeCo geerntet. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis, darauf folgender Sonifikation für 15 sec und Abzentrifugation für 20 min mit 32935 g erfolgte die Proteinbestimmung. Für die Co-Immunpräzipitation wurden jeweils 300 μ g Proteinextrakt eingesetzt. Um unspezifische Bindungen an die Sepharose-Kügelchen zu verhindern, wurden die Proteinextrakte für 2 h bei 4°C mit A/G Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology) präinkubiert und für 5 min bei 4°C und 11000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit jeweils 3 μ g des spezifischen Antikörpers gegen das Myc-Tag, welches in Mäusen generiert wurde oder unspezifischem Maus IgG und der A/G Plus Agarose über Nacht bei 4°C auf einem Röhrchen-Rotator (Snijders) inkubiert. Durch das Zentrifugieren für 3 min bei 1300 g wurden die Antigen-Antikörper-Agarose-Komplexe präzipitiert. Das Waschen erfolgte mit Ripa-T mit jeweils 1 ml die ersten drei Waschgänge und 500 μ l für die letzten beiden Waschgänge. Die Abzentrifugation zwischen den Waschgängen wurde bei 1300 g für je 3 min durchgeführt mit einer abschließenden Zentrifugation bei 1300 g. Der Überstand wurde

bis auf 30 µl verworfen. Das Präzipitat wurde in 30 µl Ladungspuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C erhitzt. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Westernblot-Analyse. Zur Beladung des Gels wurden für den Input (Extrakt vor der Präzipitation) 9 µl des Gesamtproteinzell-extrakts und für die Detektion der Immunpräzipitation 20 µl verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Antikörper-Validierung

Zunächst sollten die uns zur Verfügung stehenden Antikörper gegen PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1 auf ihre Spezifität und Sensitivität überprüft werden. Einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper gibt die Tabelle 2.

Das mit einem myc- oder V5-Tag versehene PGRMC-1-, -PGRMC-2- oder PAIRBP-1-Protein wurde durch Transfektion in myometriale Primärzellen, COS7- und HEK293-Zellen überexprimiert. Durch die parallele Darstellung der überexprimierten Proteine zum einen über Antikörper gegen die Tag-Anteile und zum anderen über die jeweils zu überprüfenden Antikörper wurde die Spezifität in der Immunfluoreszenz und teilweise dem Westernblot überprüft. Es wurden Primärantikörper verwendet, welche in unterschiedlichen Spezies generiert wurden. Besonders wichtig hierbei war der Ausschluss einer Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern für PGRMC-1 und PGRMC-2.

3.1.1 Spezifität der Antikörper gegen PGRMC-1

Drei verschiedene Antikörper (S1, T2 und 7860) zur Detektion von PGRMC-1 wurden in ihrer Spezifität als auch der Sensitivität in der Immunfluoreszenz und im Westernblot verglichen. Alle Antikörper, generiert in Kaninchen, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Wehling, Universität Heidelberg, Klinische Pharmakologie zur Verfügung gestellt.

3.1.1.1 Antikörper S1

Der S1-Antikörper wurde erzeugt gegen rekombinantes PGRMC-1-Gesamtprotein des Schweins. Hier wurde er bei der Westernblot-Immundetektion eingesetzt. HEK293-Zellen wurden mit den folgenden Vektoren transfiziert: PGRMC-1/myc, PGRMC-1/Halo, PGRMC-2/myc, PGRMC-2/Halo. HEK293-Zellen haben augenscheinlich endogenes PGRMC-1, das in unserem Gelsystem bei 22 kDa migriert. Außerdem wird das überexprimierte PGRMC-1 mit Myc-Tag (25 kDa) oder Halo-Tag (57 kDa) erkannt (Abb. 7).

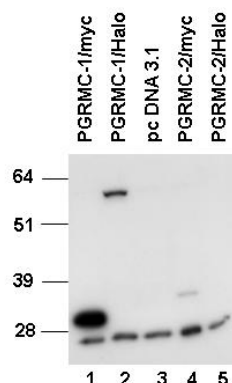


Abbildung 7: Testung des PGRMC-1-Antikörpers S1 im Westernblot.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/myc, PGRMC-1/Halo, PGRMC-2/myc und PGRMC-2/Halo. Der Westernblot wurde mit dem PGRMC-1-Antikörper S1 inkubiert. Erkennung von endogenem PGRMC-1 (22 kDa), überexprimiertem PGRMC-1/myc (Spur 1, 25 kDa) und PGRMC-1/Halo (Spur 2, 57 kDa), leichte Kreuzreaktion mit überexprimiertem PGRMC-2/myc (Spur 4, 27 kDa).

Es besteht eine leichte Kreuzreaktivität mit überexprimiertem PGRMC-2 im Westernblot (Abb. 7).

3.1.1.2 Antikörper T2

Der T2-Antikörper richtet sich gegen ein N-terminales Epitop des PGRMC-1-Schweineproteins. Er wurde hier in der Immunfluoreszenz getestet. Myometriale Primärzellen wurden mit entweder PGRMC-1/myc oder PGRMC-2/myc transfiziert und anschließend wurde eine Co-Immunfluoreszenz mit dem zu testenden Antikörper und einem Antikörper gegen das Tag durchgeführt. Der Antikörper erkennt überexprimiertes PGRMC-1/myc, jedoch kein überexprimiertes PGRMC-2/myc. Der Myc-Antikörper wurde eingesetzt, um das überexprimierte PGRMC-1 und PGRMC-2 darzustellen. Ohne eine Transfektion kam es zu einer Anfärbung innerhalb des Zytoplasmas entlang fibröser Strukturen mit Aussparung des Zellkerns. Bei diesem Fluoreszenzsignal scheint es sich um endogenes PGRMC-1 zu handeln, eine alleinige Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper führte nicht zu einer Anfärbung der Zellen.

Aus den Beobachtungen der Immunfluoreszenz scheint es sich um einen spezifischen und sensitiven Antikörper gegen PGRMC-1 ohne Kreuzreaktivität gegen PGRMC-2 zu handeln (Abb. 8).

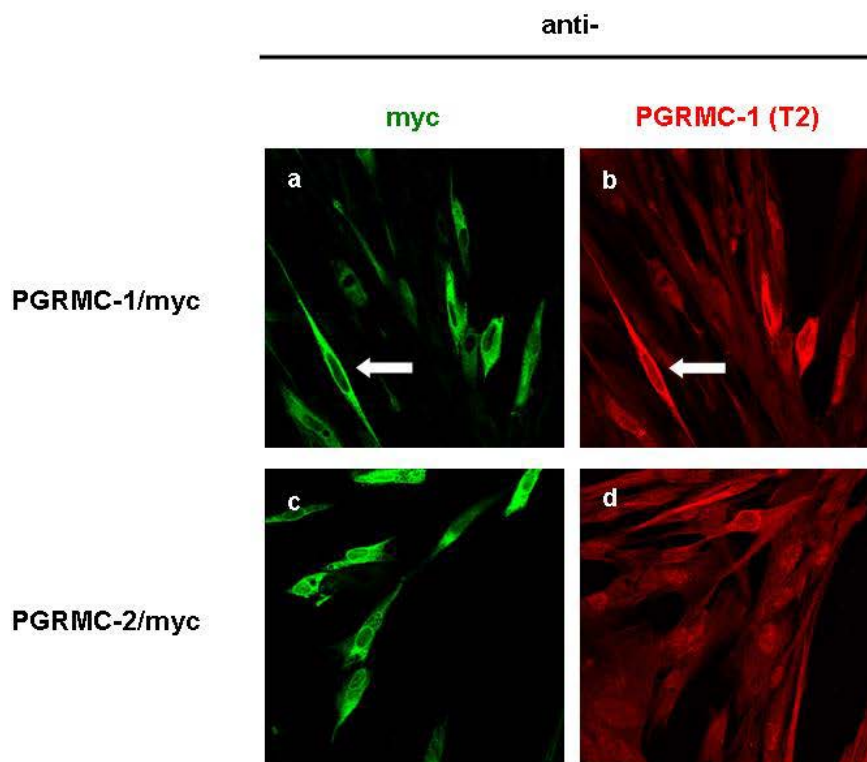


Abbildung 8: Testung des PGRMC-1-Antikörpers T2 in der Immunfluoreszenz.

In myometriale Primärzellen wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/myc (a, b), PGRMC-2/myc (c, d). Anschließend folgte die Immunfluoreszenz mit dem Myc- (a, c) und T2-Antikörper (b, d) sowie dem sekundären AlexaFluor-488- (a, c) und -568- (b, d) Antikörper. Der weiße Pfeil zeigt ein Beispiel einer Zelle, die sowohl vom myc als auch dem PGRMC-1-Antikörper T2 erkannt wird (a, b), es besteht keine Kreuzreaktion mit überexprimiertem PGRMC-2/myc (c, d). Konfokalmikroskop Zeiss, Vergrößerung 40x.

3.1.1.3 Antikörper 7860

Der 7860-Antikörper ist gerichtet gegen die Aminosäuren 53–68 des humanen PGRMC-1-Proteins und wurde sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Westernblot getestet. Im Westernblot wurde

endogenes PGRMC-1(22 kDa) sowie transfiziertes PGRMC-1/myc (25 kDa) und PGRMC-1/Halo (57 kDa) erkannt (Abb. 9). Eine weitere Bande auf Höhe von 60 kDa stellte sich in allen Zellysaten dar. Hierbei könnte es sich um die endogene dimerisierte Form von PGRMC-1 handeln. Es besteht keine Kreuzreaktivität mit PGRMC-2 (Abb. 9). In der Immunfluoreszenz erkennt der Antikörper überexprimiertes PGRMC-1/myc, jedoch kein überexprimiertes PGRMC-2/myc. In untransfizierten Zellen kam es zu einer Anfärbung innerhalb des Zytoplasmas entlang einer fibrösen Struktur. Hierbei scheint es sich um endogenes PGRMC-1 zu handeln, da eine alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper zu keiner Anfärbung der Zelle führte (Abb. 10). Auch hier handelt es sich um einen spezifischen und sensitiven Antikörper bei der Detektion von überexprimiertem und endogenem PGRMC-1.

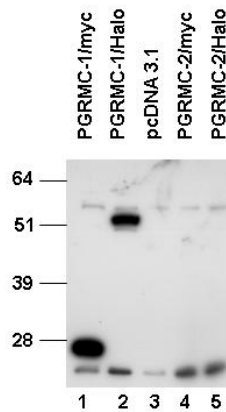


Abbildung 9: Testung des PGRMC-1-Antikörpers 7860 im Westernblot.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/myc, PGRMC-1/Halo, PGRMC-2/myc und PGRMC-2/Halo. Der Westernblot wurde mit dem PGRMC-1-Antikörper 7860 inkubiert. Nachweis von endogenem PGRMC-1 als Mono- und möglicherweise Dimer (22 bzw. 60 kDa) sowie überexprimiertem PGRMC-1/myc (25 kDa) und PGRMC-1/Halo (57 kDa). Keine Kreuzreaktion mit überexprimiertem (Spur 4 und 5) PGRMC-2.

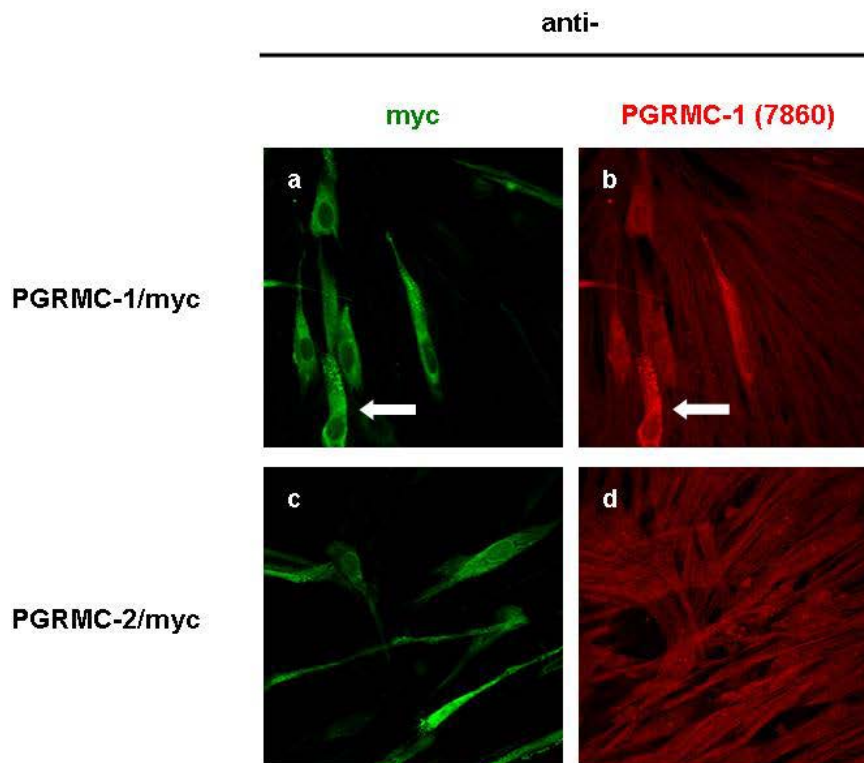


Abbildung 10: Testung des PGRMC-1-Antikörpers 7860 in der Immunfluoreszenz.

In myometriale Primärzellen wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/myc (a, b), PGRMC-2/myc (c, d). Anschließend folgte die Immunfluoreszenz mit dem Myc- (a, c) und 7860-Antikörper (b, d) sowie dem sekundären AlexaFluor-488- (a, c) und -568- (b, d) Antikörper. Der weiße Pfeil zeigt ein Beispiel einer Zelle, die sowohl vom Myc-als auch dem PGRMC-1-Antikörper 7860 erkannt wird (a, b), es besteht jedoch keine Kreuzreaktion mit überexprimiertem PGRMC-2/myc (c, d). Konfokalmikroskop Zeiss, Vergrößerung 40x.

3.1.2 Spezifität der Antikörper gegen PGRMC-2

3.1.2.1 Antikörper der Firma Abnova

Bei der Testung in der Westernblot Immundetektion erkannte der Antikörper PGRMC-2/myc (27 kDa) und PGRMC-2/Halo (59 kDa), jedoch kein endogenes PGRMC-2 (24 kDa) (Abb. 11). Als Nachweis für eine endogene PGRMC-2-Expression der HEK-293-Zellen sei auf Abbildung 13 verwiesen.

In der Immunfluoreszenz detektiert der Antikörper überexprimiertes PGRMC-2/myc, jedoch kein überexprimiertes PGRMC-1/myc. In den untransfizierten Zellen kam es zu Anfärbung innerhalb des Zytoplasmas entlang fibröser Strukturen. Hierbei handelt es sich vermutlich um endogenes PGRMC-2, da eine alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper keine Anfärbung innerhalb der Zellen verursacht (Abb. 12). Bei hinreichender Spezifität wies dieser Antikörper eine unzureichende Sensitivität gegenüber endogenem PGRMC-2 auf.

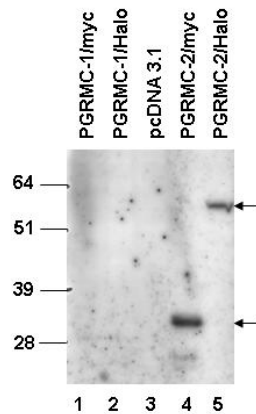


Abbildung 11: Testung des PGRMC-2-Antikörpers (Abnova) im Westernblot.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/myc, PGRMC-1/Halo, PGRMC-2/myc und PGRMC-2/Halo. Der Westernblot wurde mit dem PGRMC-2-Antikörper inkubiert. Der Antikörper erkennt überexprimiertes PGRMC-2, jedoch kein endogenes PGRMC-2. Die Pfeile bezeichnen PGRMC-2/myc (Spur 4, 29 kDa) und PGRMC-2/Halo (Spur 5, 59 kDa). Kein Nachweis einer Kreuzreaktion mit überexprimiertem PGRMC-1 (Spur 1 und 2).

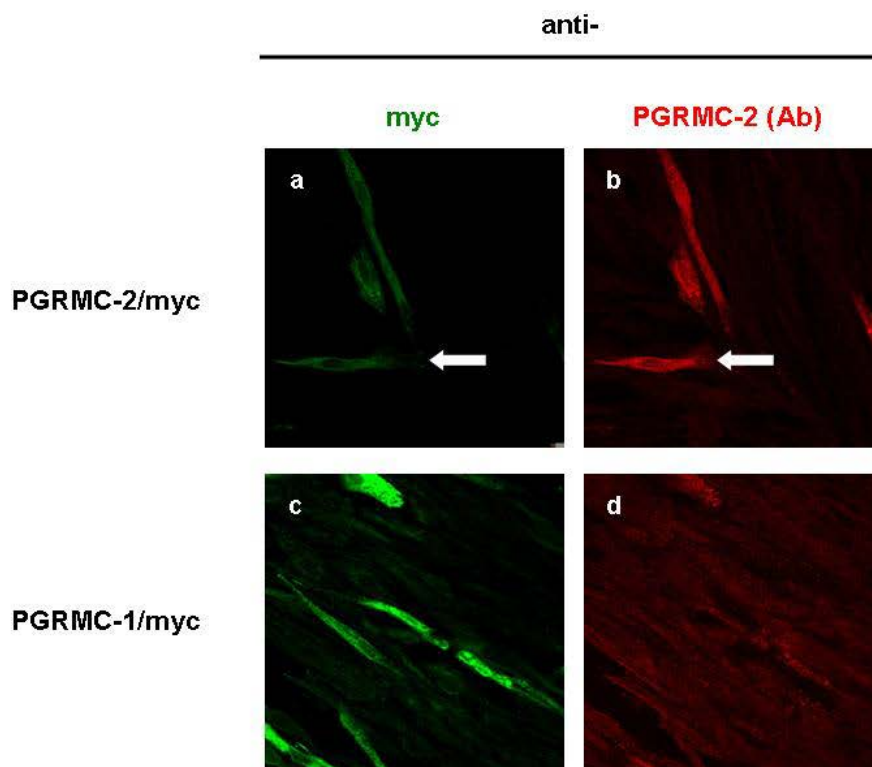


Abbildung 12: Testung des PGRMC-2-Antikörpers (Abnova) in der Immunfluoreszenz.

In myometriale Primärzellen wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-2/myc (a, b), PGRMC-1/myc (c, d). Anschließend folgte die Immunfluoreszenz mit dem Myc- (a, c) und PGRMC-2-Antikörper (b, d) sowie dem sekundären AlexaFluor-488- (a, c) und -568- (b, d) Antikörper. Der weiße Pfeil zeigt ein Beispiel einer Zelle, die sowohl vom Myc- als auch dem PGRMC-2-Antikörper von Abnova erkannt wird (a, b), jedoch keine Kreuzreaktion mit überexprimiertem PGRMC-1/myc (c, d). Konfokalmikroskop Zeiss, Vergrößerung 40x.

3.1.2.2 Antikörper 395

Bei dem Antikörper 395 handelt es sich um einen Antikörper gegen das gesamte humane PGRMC-2-Protein, welches in Kaninchen generiert wurde. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Wehling, Universität Heidelberg, Klinische Pharmakologie zur Verfügung gestellt. In der Westernblot Immundetektion erkennt der Antikörper endogenes PGRMC-2 (24 kDa) sowie überexprimiertes PGRMC-2 (PGRMC-2/myc 27 kDa, PGRMC-2/Halo 59 kDa) (Abb. 13).

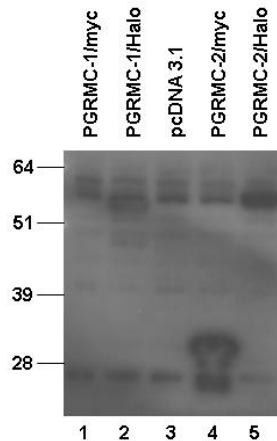


Abbildung 13: Testung des 395-Antikörpers im Westernblot.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/myc, PGRMC-1/Halo, Leervektor pcDNA3.1, PGRMC-2/myc und PGRMC-2/Halo. Der Westernblot wurde mit dem Antikörper 395 inkubiert. Der Antikörper erkennt endogenes PGRMC-2 (Spur 1–5) sowie überexprimiertes PGRMC-2/myc (Spur 4, 29 kDa) und PGRMC-2/Halo (Spur 5, 59 kDa). Kein Nachweis einer Kreuzreaktion mit überexprimiertem PGRMC-1 (Spur 1 und 2). Die Banden auf der Höhe von 60 kDa in Spur 1–4 stammen von einer vorherigen Inkubation mit dem Halo-Antikörper.

In der Immunfluoreszenz detektiert der Antikörper überexprimiertes PGRMC-2/myc, jedoch kein überexprimiertes PGRMC-1/myc. Auch endogenes PGRMC-2 wird erkannt (Abb. 14).

Weder in der Immunfluoreszenz noch im Westernblot zeigt der Antikörper eine Kreuzreaktivität gegen endogenes oder transfiziertes PGRMC-1. Somit ist die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers ausreichend. Allerdings gab dieser Antikörper im Westernblot generell einen höheren Hintergrund.

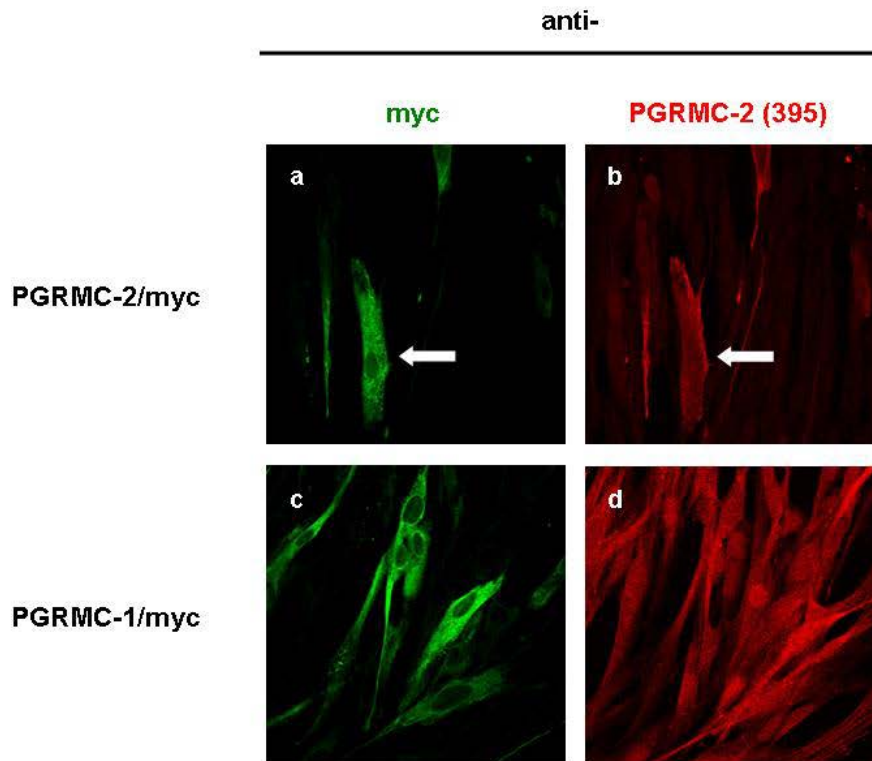


Abbildung 14: Testung des PGRMC-2-Antikörpers 395 in der Immunfluoreszenz.

In myometriale Primärzellen wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-2/myc (a, b), PGRMC-1/myc (c, d). Anschließend folgte die Immunfluoreszenz mit dem Myc- (a, c) und PGRMC-2-Antikörper 395 (b, d) sowie dem sekundären AlexaFluor-488- (a, c) und -568- (b, d) Antikörper. Der weiße Pfeil zeigt ein Beispiel einer Zelle, die sowohl vom myc- als auch dem PGRMC-2-Antikörper 395 erkannt wird (a, b), es besteht keine Kreuzreaktion mit überexprimiertem PGRMC-1/myc (c, d). Konfokalmikroskop Zeiss, Vergrößerung 40x.

3.1.3 Spezifität des Antikörpers gegen PAIRBP-1

Der PAIRBP-1-Antikörper (von der Firma Abnova) ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, welcher gegen rekombinantes PAIRBP-1 gerichtet ist. Wie in der Einleitung erwähnt konnte durch unsere Arbeitsgruppe die Expression unterschiedlicher Varianten nachgewiesen werden. Die Varianten unterscheiden sich um 45 bzw. 63 Basenpaare. Im Folgenden werden diese Varianten PAIRBP-1/v1, PAIRBP/v3 und PAIRBP-1/v4 genannt. Bei der PAIRBP-1/v3-Variante handelt es sich um eine um 45 Basenpaare verkürzte Form, während bei der PAIRBP-1/v4-Form zusätzlich weitere 18 Basenpaare deletiert sind. Die erwartete Größe beträgt 45 kDa (PAIRBP-1/v1), 43 kDa (PAIRBP-1/v3) und 42 kDa (PAIRBP-1/v4).

Der Antikörper erkennt das endogene PAIRBP-1 in der COS-7-Zelllinie (50 kDa), transfizierte PAIRBP-Isoformen mit V5-Tag (56-59 kDa) sowie PAIRBP-1 mit einem HaloTag (80 kDa) (Abb. 15). Die COS-7-Zelllinie scheint nur eine PAIRBP-1-Variante zu exprimieren. Bei der detektierten Bande könnte es sich um PAIRBP-1/v1 handeln. Die Unterscheidung ist jedoch aufgrund der geringen Größendifferenz nicht sicher möglich.

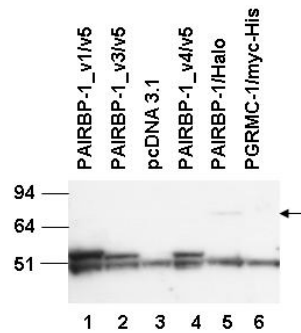


Abbildung 15: Testung des PAIRBP-1-Antikörpers im Westernblot.

In die Zelllinie COS-7 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PAIRBP-1-v1/V5, PAIRBP-1-v3/V5, Leervektor pcDNA 3.1, PAIRBP-1-v4/V5, PAIRBP-1/Halo, PGRMC-1/myc. Der Westernblot wurde mit dem PAIRBP-1-Antikörper inkubiert. Der Pfeil weist auf die PAIRBP-1/Halo-Expression in Spur 5 hin. Spur 1, 2 und 4 Nachweis der PAIRBP-1-Isoformen mit V5 Tag, die sich in ihrer Größe minimal unterscheiden und knapp oberhalb des endogenen PAIRBP-1 migrieren.

In der Immunfluoreszenz wurden mit PAIRBP-1/V5 transfizierte Zellen durch den PAIRBP-1-Antikörper erkannt und gaben ein stärkeres Signal als die untransfizierten Zellen. In untransfizierten Zellen kam es zu einer grobkörnigen Anfärbung des Zytoplasmas mit Anreicherung um den Zellkern. Bei diesem Fluoreszenzsignal scheint es sich um endogenes PAIRBP-1 zu handeln, eine alleinige Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper führte nicht zu einer Anfärbung der Zellen (Abb. 16).

Die Beobachtungen in der Immunfluoreszenz und im Western-Gel zeugen von der Spezifität und Sensitivität des Antikörpers gegen PAIRBP-1.

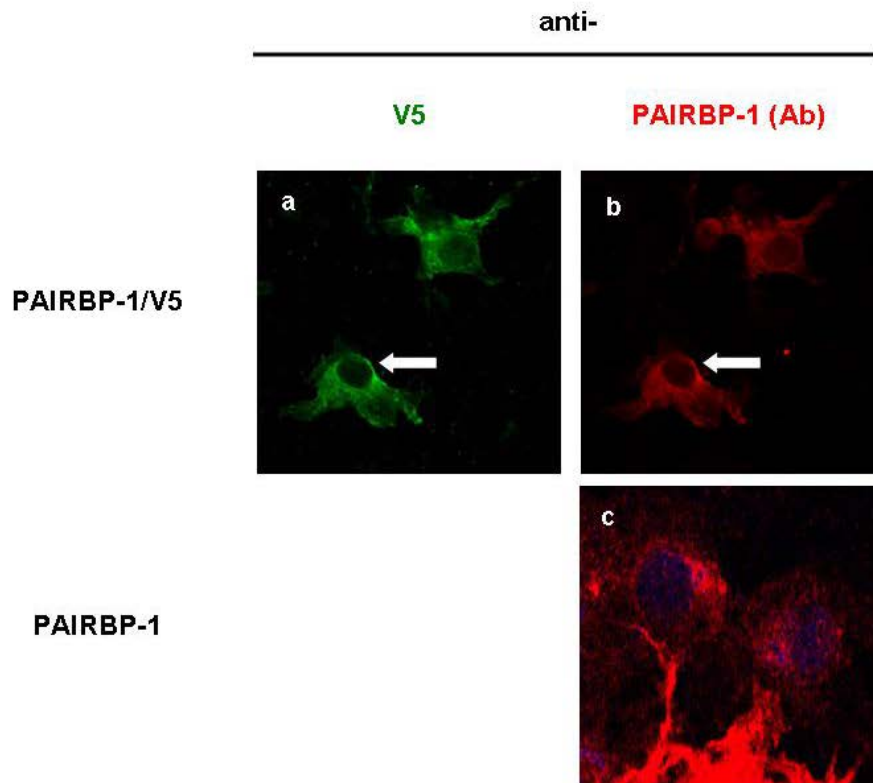


Abbildung 16: Testung des PAIRBP-1-Antikörpers in der Immunfluoreszenz.

Die Zelllinie COS-7 wurde mit folgendem Konstrukt transfiziert: PAIRBP-1/V5 (a, b) oder untransfiziert belassen (c). Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit dem V5 (a) und PAIRBP-1-Antikörper (b und c) und den Sekundär-Antikörpern AlexaFluor-488 (grün) und -568 (rot) durchgeführt. Anfärbung des Zellkerns durch DAPI (c). Konfokalmikroskopie: Zeiss, Vergrößerung 40x. Endogenes und überexprimiertes PAIRBP-1 wird durch den geprüften Antikörper erkannt.

3.1.4 Spezifität der Antikörper gegen Myc-Tag

Für die Co-Immunfluoreszenz entscheidend ist die Verfügbarkeit zweier Antikörper gegen die Tag-Anteile, welche in unterschiedlichen Spezies generiert wurden, da so der Antikörper gegen den Tag abhängig von dem Primärantikörper des anderen zu untersuchenden Proteins ausgewählt werden kann. Hier wurden ein in Kaninchen generierter polyklonaler, und ein muriner monoklonaler Antikörper gegen das Myc-Epitop getestet.

Beide Antikörper erkennen PGRMC-1/myc (25 kDa) und PGRMC-2/myc (27 kDa) (Abb. 17). Somit ist der Myc-Antikörper sensitiv und spezifisch in der Erkennung von Proteinen mit Myc-Tag.

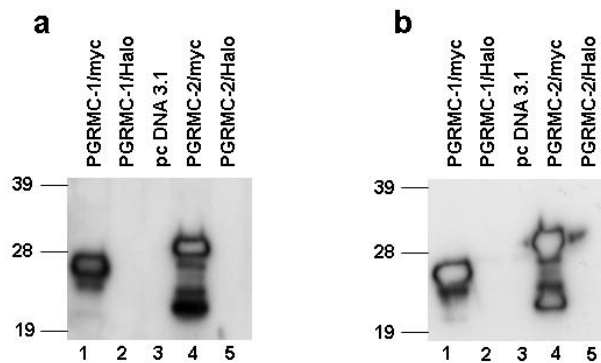


Abbildung 17: Testung der Myc-Antikörper im Westernblot.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/myc, PGRMC-1/Halo, pcDNA 3.1, PGRMC-2/myc und PGRMC-2/Halo. a) Der Westernblot wurde mit dem Myc-Antikörper aus Kaninchen inkubiert. b) Inkubation des Westernblot mit dem monoklonalen Myc-Antikörper aus Maus inkubiert. Beide Antikörper erkennen überexprimiertes PGRMC-1/myc (Spur 1, 25 kDa) und PGRMC-2/myc (Spur 4, 27 kDa).

3.1.5 Spezifität der Antikörper gegen V5 Tag

Hier wurden V5-Antikörper aus Kaninchen (polyklonal) und Maus (monoklonal) verglichen. Im Westernblot erkennen beide Antikörper gleichermaßen die PAIRBP-1/V5-Isoformen auf den errechneten Höhen (56-59 kDa) (Abb. 18).

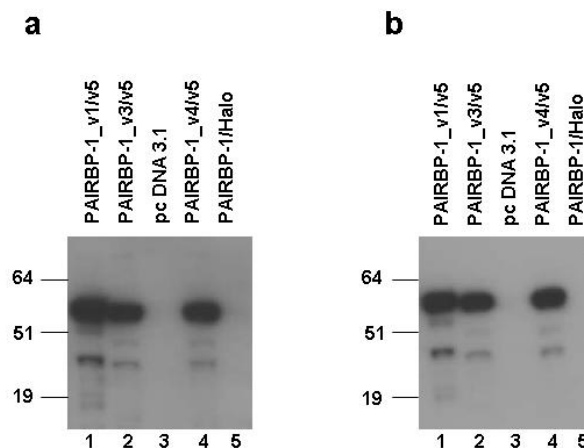


Abbildung 18: Testung der V5-Antikörper im Westernblot.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PAIRBP-1-v1/V5, PAIRBP-1-v3/V5, pcDNA3.1, PAIRBP-1-v4/V5, PAIRBP-1/Halo. a) Der Westernblot wurde mit dem V5-Antikörper aus Kaninchen inkubiert. b) Inkubation des Westernblot mit dem V5-Antikörper aus Maus. Beide Antikörper erkennen die überexprimierten PAIRBP-Isoformen v1, v3 und v4 (Spur 1, 2 und 4, 56-59 kDa) mit V5-Tag.

3.2 Versuche zu möglichen Interaktionen zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1

Die beschriebenen und vermuteten Interaktionspartner von PGRMC-1 sind vielfältig und scheinen abhängig vom Zelltyp zu sein (Losel *et al.* 2007). Mithilfe der Photo-Quervernetzung wurden Interaktionen zwischen PGRMC-1 und sowohl Insig-1 als auch SCAP in COS-7 Zellen nachgewiesen

(Suchanek *et al.* 2005). In Granulosazellen wurde eine Interaktion mit BIP sowie mit PAIRBP-1 beschrieben (Losel *et al.* 2007, Peluso *et al.* 2006).

Außerdem gibt es viele Anhaltspunkte dafür, dass PGRMC-1 Homomultimere bildet (Suchanek *et al.* 2005, Meyer *et al.* 1996). Nicht geklärt ist, welcher Art der Bindung die Bildung von PGRMC-1-Komplexen bewirkt.

Die Arbeitsgruppe um Wehling vermutet, dass Disulfidbrücken bei der Bildung von PGRMC-1-Dimeren beteiligt sind, da unter reduzierenden Bedingungen die 28-kDa-Form dominierte, während unter nicht reduzierenden Bedingungen vorwiegend die 56-kDa-Form vorlag (Falkenstein *et al.* 2001). Eine andere Arbeitsgruppe schließt eine Disulfidbindung aus, da PGRMC-1 in der Leber der Ratte unter reduzierenden Umständen als 50-kDa-Form detektiert wurde (Selmin *et al.* 2005).

3.2.1 Untersuchung der PGRMC-1-Homodimerbildung unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen

Um die Bildung von PGRMC-1-Homomultimeren und den dazu führenden Bindungen zu untersuchen, wurde PGRMC-1 mit unterschiedlichen Tags in HEK293-Zellen überexprimiert und anschließend unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen im Westernblot detektiert.

In untransfizierten Zellen konnte mit dem S1-Antikörper gegen PGRMC-1 sowohl unter reduzierenden, als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen endogenes monomeres PGRMC-1 (22 kDa), jedoch keine Bildung von Multimeren detektiert werden (Abb. 19).

In den Lysaten mit PGRMC-1/myc transfizierter Zellen konnte mit dem Myc-Antikörper unter reduzierenden Bedingungen nur überexprimiertes PGRMC-1 als Monomerform nachgewiesen werden (25 kDa), während im nicht reduzierenden Westernblot eine Bande bei 56 kDa detektiert werden konnte. Nach der Entfernung des Myc-Antikörpers konnte jedoch durch den S1-Antikörper in dem nicht reduzierten Blot neben dem möglichen PGRMC-1-Dimer endogenes und überexprimiertes PGRMC-1 als Monomerform nachgewiesen werden. Auch im reduzierten Blot stellt sich in den PGRMC-1/myc-Lysaten nach Inkubation mit dem S1-Antikörper endogenes und überexprimiertes PGRMC-1 (22,25 kDa) als Monomer dar (Abb. 19).

In den mit PGRMC-1/Halo transfizierten Lysaten stellt sich unter reduzierenden, jedoch nicht unter nicht reduzierenden Bedingungen ein PGRMC-1/Halo-Monomer (57 kDa) dar (Abb. 19). Durch erneute Inkubation mit dem S1-Antikörper wird neben dem PGRMC-1/Halo endogenes PGRMC-1 als Monomer (22 kDa) sichtbar (Abb. 20). Weder unter nicht reduzierenden noch unter reduzierenden Bedingungen gelang der Nachweis einer Dimerbildung von PGRMC-1/Halo.

Da unter reduzierenden Umständen keine Dimerisierung von endogenem oder überexprimiertem PGRMC-1 beobachtet werden konnte, ist die Multimerbildung durch Disulfidbrücken sehr wahrscheinlich.

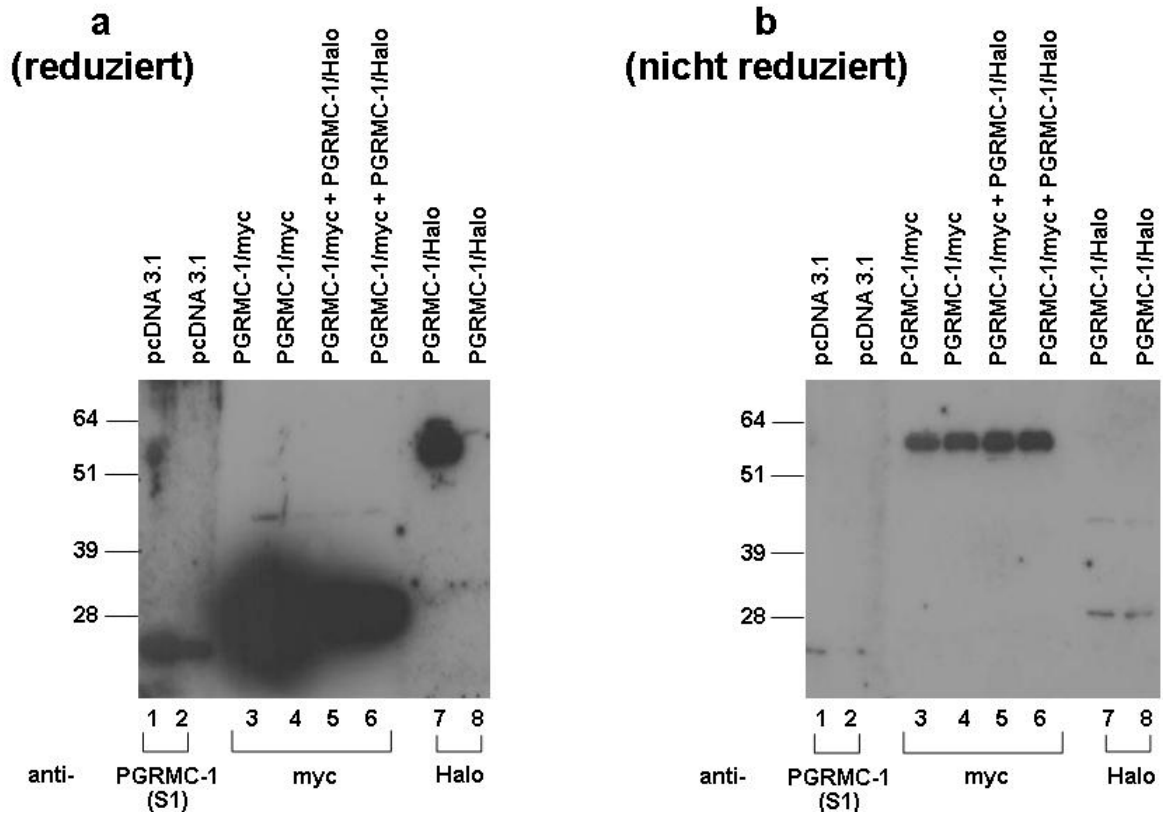


Abbildung 19: Multimerbildung von PGRMC-1 unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 (Spur 1, 2), PGRMC-1/myc (Spur 3–6), PGRMC-1/Halo (Spur 5–8). Unter reduzierenden Bedingungen (a) und nicht reduzierenden Bedingungen (b) erfolgte der Proteinlauf. Die Westernblots wurden mit folgenden Antikörpern inkubiert: gegen PGRMC-1 (S1) (Spur 1–2), Myc (3–6) und Halo (Spur 7–8). Detektiert wird endogenes PGRMC-1 als Monomerform [Blot a) und b), Spur 1–2]. Unter reduzierenden Umständen wird überexprimiertes PGRMC-1/myc als monomere Form detektiert [Blot a) Spur 3–6], während unter nicht reduzierenden Umständen PGRMC-1/myc als Dimer beobachtet wird [Blot b) Spur 3–6]. Unter reduzierenden Umständen wird PGRMC-1/Halo als monomere Form detektiert [Blot a), Spur 7–8], unter nicht reduzierenden Umständen bleibt diese Detektion aus [Blot b), Spur 7–8].

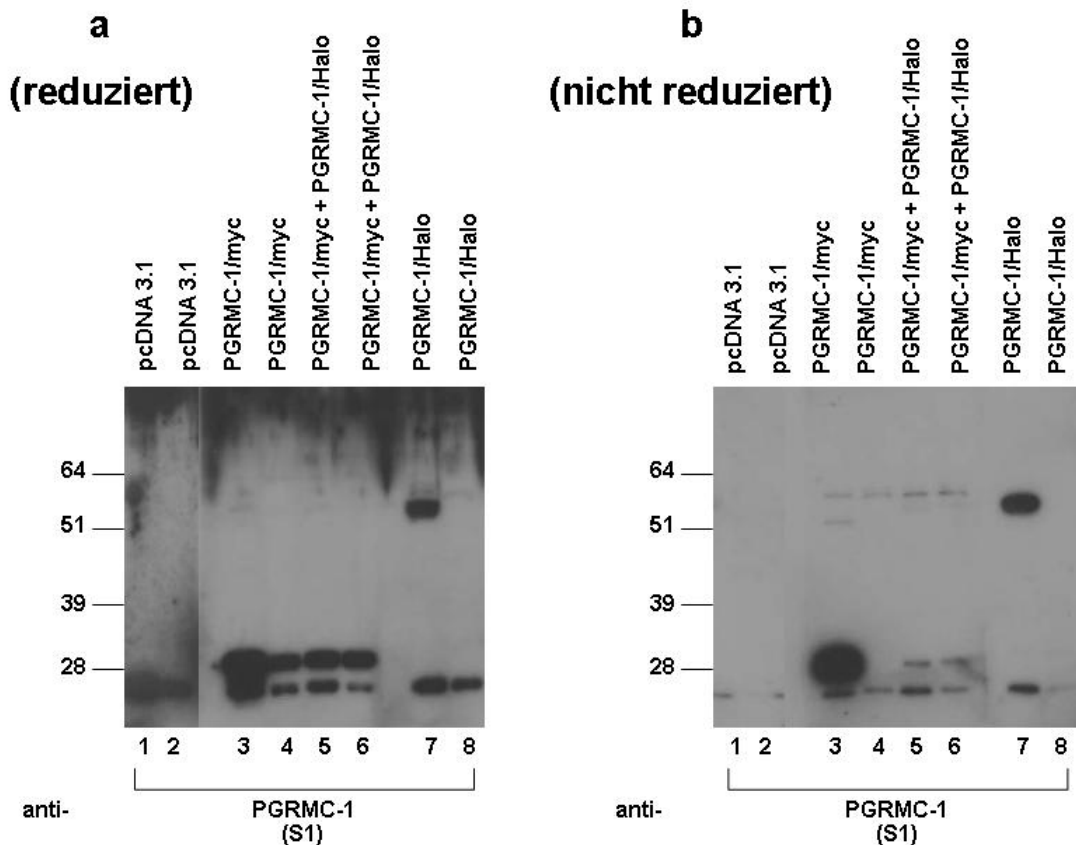


Abbildung 20: Multimerbildung von PGRMC-1 unter reduzierenden und nicht reduzierenden Umständen.

Die in Abbildung 19 beschriebenen Westernblots wurden gestrippt und die Spuren 3–8 wurden mit dem S1-Antikörper gegen PGRMC-1 inkubiert. Während unter reduzierenden Umständen (a) nur die monomere Form von endogenem PGRMC-1 und überexprimiertem PGRMC-1 mit Myc- oder HaloTag detektiert wird, werden unter nicht reduzierenden Umständen (b) auch Dimere von endogenem PGRMC-1/PGRMC-1/myc beobachtet (Spuren 3–6).

3.2.2 Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildungen durch Co-Immünpräzipitation und reversible chemische Quervernetzung

Mit der Methode der Co-Immünpräzipitation und chemisch reversibler Quervernetzung sollte auf eine andere Art die Interaktion von PGRMC-1/myc und endogenem PGRMC-1 untersucht werden. HEK293-Zellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert oder untransfiziert belassen und kurz vor der Proteinernnte mit DSP quervernetzt. Anschließend folgte die Immünpräzipitation von PGRMC-1/myc mit dem Myc-Antikörper. Als Kontrolle erfolgte eine Immünpräzipitation mit einem unspezifischen Maus-Antikörper. Die Quervernetzung wurde anschließend gelöst und die Proteinlysate wurden für eine Immünpräzipitation verwendet.

Im Input der transfizierten und untransfizierten Zellen sind im Westernblot mit dem S1-Antikörper deutliche Banden auf Höhe von endogenem PGRMC-1 zu sehen. In dem Input mit transfizierten Zellen sieht man zusätzlich eine Bande auf der erwarteten Höhe von PGRMC-1/myc (Abb. 21).

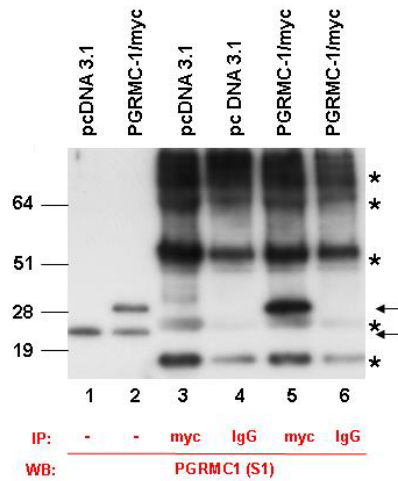


Abbildung 21: Co-Immünpräzipitation nach reversibler DSP-Quervernetzung.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 und PGRMC-1/myc. Die Lysate wurden durch DSP quervernetzt. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation mit dem Myc-Antikörper (Spur 3 und 5) und Maus-IgG (Spur 4 und 6). Anschließend wurde die Quervernetzung gelöst. Der Westernblot wurde mit dem S1-Antikörper gegen PGRMC-1 inkubiert. Input: Spur 1–2, Pulldown: Spur 3–6. Im Input-Nachweis von endogenem PGRMC-1 (Spur 1–2) und überexprimiertem PGRMC-1/myc (Spur 2). Es kommt zu einem spezifischen Pulldown von PGRMC-1/myc, jedoch nicht zu einem Co-Pulldown von endogenem PGRMC-1 (Spur 5, Pfeil). Unspezifische Banden in allen Pulldown-Spuren (3–6) auf den Höhen 15, 25, 53, 64 und 80 kDa (*).

Nach der Präzipitation des PGRMC-1/myc enthaltenden Lysats mit Myc-Antikörper ist bei der Detektion mit dem S1-Antikörper auf Höhe von PGRMC-1/myc eine Bande zu detektieren. Dies ist der Nachweis einer erfolgreichen Immunpräzipitation. Jedoch ist auf der Höhe von endogenem PGRMC-1 keine spezifische Bande zu sehen. Es ist also zu keiner Co-Immünpräzipitation von endogenem PGRMC-1 gekommen (Abb. 21).

In den Kontrollen mit untransfizierten Zellen und der Präzipitation mit Maus-IgG ist weder auf Höhe von PGRMC-1 noch auf der erwarteten Höhe von PGRMC-1/myc eine Bande zu detektieren. Dies zeugt von der spezifischen Immunpräzipitation von überexprimiertem PGRMC-1/myc durch den Myc-Antikörper. Alle Immunpräzipitatlysat zeigen unspezifische Banden auf der Höhe von 15, 25, 53, 64 und 80 kDa (Abb. 21). Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser Banden könnte eine Kreuzreaktivität des sekundären Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers mit dem Maus-IgG aus der Immunfällung sein. Die leichte Kette des Immunglobulins G hat ein Gewicht von 25 kDa, während die schwere Kette eine Größe von 50 kDa besitzt.

3.2.3 Untersuchung der PGRMC-1-Multimerbildung durch irreversible chemische Quervernetzung

Da vorherige Beobachtungen zur Multimerisierung in Lebergewebe gemacht worden waren (Selmin *et al.* 2005, Falkenstein *et al.* 2001), wurde ein weiterer Versuch zur Untersuchung von PGRMC-1-Komplexen in HepG2-Zellen durchgeführt. Bei der HepG2 entstammt aus einem humanen hepatozellulären Karzinom. Wie in Kapitel 4.1.2.2. beschrieben, konnte in der Co-Immünpräzipitation keine Interaktion zwischen endogenem PGRMC-1 und überexprimiertem PGRMC-1/myc nachgewiesen werden. Bei der irreversiblen Quervernetzung kommt es zu einer kovalenten Quervernetzung von Proteinen, welche intrazellulär co-lokalisieren. Diese Methode sollte in diesem

Versuchsansatz genutzt werden, um mögliche Interaktionspartner von endogenem und überexprimiertem PGRMC-1 nachzuweisen. Außerdem sollte der Einfluss von Progesteron auf die jeweiligen Co-Lokalisationen getestet werden.

HepG2-Zellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert oder untransfiziert belassen und für 15 min mit 100 nM Progesteron stimuliert und anschließend mit DSS chemisch irreversibel quervernetzt. In den Kontrollen blieben die Zellen entweder unstimuliert oder waren nicht quervernetzt. Anschließend wurde endogenes und überexprimiertes PGRMC-1 mit dem S1- und Myc-Antikörper nachgewiesen.

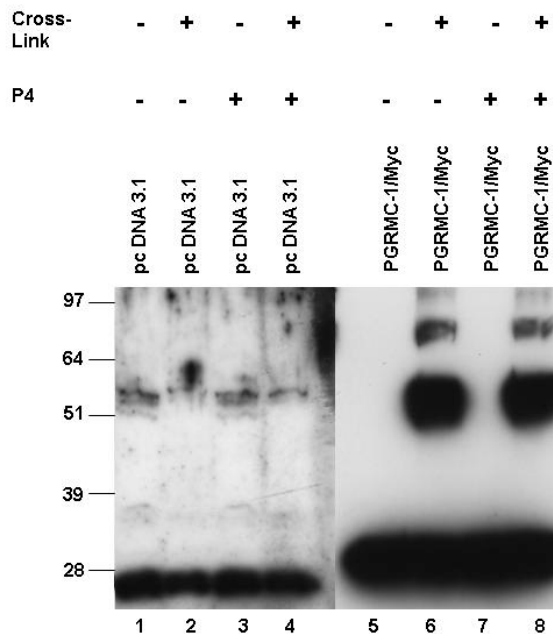


Abbildung 22: Multimerbildung von PGRMC-1 nach irreversiblen DSS Cross-Link.

In die Zelllinie HepG2 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 (Spur 1–4), PGRMC-1/myc (Spur 6–9). Vor der Proteinernie erfolgte eine P4-Stimulation und/oder ein irreversibler DSS Cross-Link. Die Kontrollen blieben jeweils ohne Stimulation und/oder Cross-Link. Der Westernblot wurde mit dem Antikörper S1 gegen PGRMC-1 (Spur 1–4) oder mit Myc-Antikörper (Spur 6–9) inkubiert. Spuren 1–4: 30 min Exposition auf Röntgenfilm, Spuren 5–8: 3 min Exposition auf Röntgenfilm. In Spur 1–4 Nachweis von endogenem PGRMC-1 als Monomer und Dimer. In Spur 5–8 Nachweis von überexprimiertem PGRMC-1/myc als Monomer und in den quervernetzten Porteinlysaten Nachweis möglicher PGRMC-1/myc-Dimere und -Trimere bei 56 bzw. 84 kDa.

In den Lysaten der untransfizierten, nicht quervernetzten Zellen waren auf der erwarteten Höhe von endogenem PGRMC-1-Monomer und dem -Dimer (22 bzw. 56 kDa) mit dem S1-Antikörper Banden nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war in den quervernetzten Lysaten die Bande auf Höhe eines möglichen PGRMC-1-Dimers schwächer ausgeprägt. Somit fehlt der Nachweis einer Quervernetzung von PGRMC-1 mit anderen Proteinen durch die DSS-Behandlung.

In den mit PGRMC-1/myc transfizierten Zelllysaten zeigte sich folgendes Bild: In den nicht quervernetzten Lysaten zeigte sich mit dem Myc-Antikörper eine starke Bande auf der erwarteten Höhe von monomerem PGRMC-1/myc, während bei mit DSS quervernetzten Lysaten weitere Banden auf der Höhe von 56 und 84 kDa sichtbar waren. Eine Quervernetzung durch DSS scheint somit stattgefunden zu haben. Da sich die detektierten Banden in dem Größenbereich von PGRMC-1-Multimeren befinden, könnte es sich um PGRMC-1-Homodi- und -trimere handeln. Die

Progesteronstimulation hatte keinen Einfluss auf die Wanderung und Intensität der detektierten Banden und scheint somit zu keiner veränderten Co-Lokalisationen geführt zu haben (Abb. 22).

3.2.4 Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildung durch die HaloLink Resin Methode

In den zuvor beschriebenen Versuchen zeigten sich eindeutige Hinweise für eine Homomerbildung von PGRMC-1. Jedoch konnten diese Beobachtungen in der Co-Immunpräzipitation nicht bestätigt werden. Deshalb sollte mit der neuartigen HaloLink Resin Methode untersucht werden, ob mit HaloTag markiertes PGRMC-1 mit PGRMC-1/myc interagiert. Der Vorteil dieser Methode besteht in der kovalenten Bindung von überexprimierten Proteinen auf der Oberfläche eines abzentrifugierbaren Trägermaterials und damit einem erleichterten Pulldown.

HEK293-Zellen wurden mit PGRMC-1/Halo und zusätzlich mit PGRMC-1/myc transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen und Zellen, welche mit nur einem Vektor (PGRMC-1/Halo oder PGRMC-1/myc) transfiziert waren. Mit den Proteinlysaten wurde ein HaloLink Resin Pulldown durchgeführt und die Proteine anschließend im Westernblot detektiert. Als Nachweis der Expression von PGRMC-1/Halo wurde zunächst ein Westernblot mit Halo-Antikörper durchgeführt (Abb. 23).

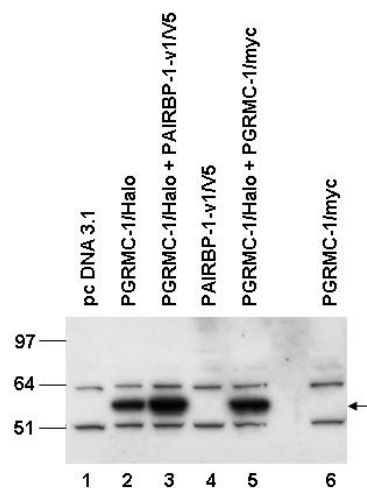


Abbildung 23: HaloLink Input.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 (Spur 1, 2, 4, 6), PGRMC-1/myc (Spur 5, 6), PGRMC-1/Halo (Spur 2, 3, 5), PAIRBP-v1/V5 (Spur 3, 4). Der Westernblot wurde mit dem Halo-Antikörper inkubiert. Nachweis von überexprimiertem PGRMC-1/Halo (57 kDa) in Spur 2, 3 und 5. Unspezifische Banden auf der Höhe von 51 und 64 kDa.

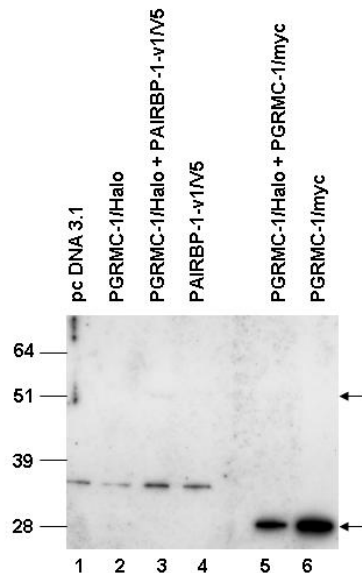


Abbildung 24: HaloLink Pulldown.

Die in Abb. 23 gezeigten Lysate wurden einem Pulldown mit HaloLink Resin unterzogen. Der Westernblot wurde mit dem V5-Antikörper (Spur 1–4) oder Myc-Antikörper (Spur 5, 6) inkubiert. Möglicher Nachweis eines Pulldowns von PAIRBP-1/V5 in Spur 3 durch PGRMC-1/Halo (Pfeil), kein unspezifischer Pulldown nachweisbar (Spur 4). Unspezifische Banden in Spuren 1–4 auf der Höhe von 35 kDa. Pulldown von PGRMC-1/myc durch PGRMC-1/Halo (Spur 5), jedoch auch unspezifischer Pulldown von PGRMC-1/myc in Spur 6 (Pfeil).

3.2.5 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 durch Halo Link Resin

In dem im vorigen Absatz beschriebenen Versuch wurde nicht nur eine Homodimerisierung von PGRMC-1, sondern gleichzeitig auch eine mögliche Interaktion zwischen PGRMC-1 and PAIRBP-1 untersucht, indem Zellen mit PGRMC-1/Halo und PAIRBP-1-v1/V5 cotransfiziert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen untransfiziert belassen oder nur mit jeweils einem der Vektoren transfiziert. Bei der Westernblot-Immundetektion mit dem V5-Antikörper ist in dem PGRMC-1/Halo und PAIRBP-1-v1/V5 enthaltenden Lysat eine schwache Bande auf der erwarteten Höhe von PAIRBP-1-v1/V5 zu sehen, während in den Kontrolllysaten mit entweder nur PGRMC-1/Halo oder PAIRBP-1-v1/V5 sowie dem untransfiziertem Zelllysate keine Bande auf dieser Höhe zu sehen ist. Auf der Höhe von 35 kDa ist in allen mit V5-Antikörper inkubierten Bahnen eine unspezifische Bande sichtbar (Abb. 24). Der Nachweis einer Interaktion zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 scheint in diesem Versuch zunächst möglich.

3.2.6 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen PGRMC-1- und PAIRBP-1-Varianten durch HaloLink Resin unter Progesteron-Stimulation

In einem weiteren Versuch wurde die Interaktion zwischen PGRMC-1/Halo und den mit V5-Tag markierten PAIRBP-1-Varianten überprüft. HEK293-Zellen wurden mit PGRMC-1/Halo und den PAIRBP-1-Varianten cotransfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen untransfiziert belassen oder mit jeweils nur einem Vektor transfiziert. Die Lysate wurden für den HaloLink Resin Pulldown verwendet und die Proteine anschließend im Westernblot nachgewiesen. Mit dem V5-Antikörper sind weder in den cotransfizierten Lysaten, noch in den Kontrollen spezifische Banden auf der erwarteten Höhe der

PAIRBP-1-Varianten zu erkennen (Abb. 26). Die Expression von PGRMC-1/Halo in den Lysaten wurde mit einem Westernblot und Detektion mit dem Halo-Antikörper überprüft (Abb. 25). Es ergab sich in diesem Versuchsansatz jedoch kein Anhalt für eine Interaktion zwischen PGRMC-1/Halo und den PAIRBP-Isoformen mit V5-Tag.

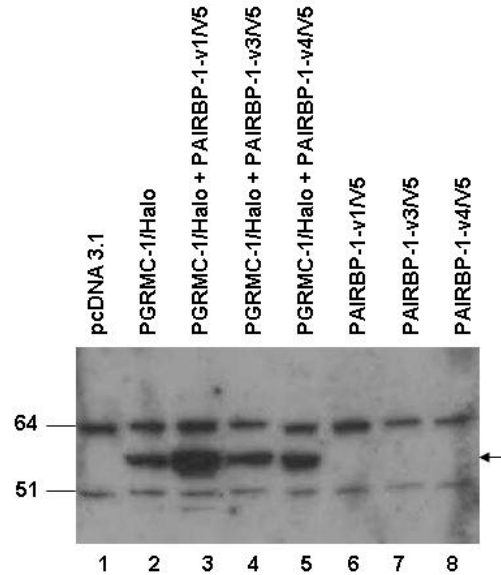


Abbildung 25: HaloLink Input.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 (Spur 1, 2, 6-8), PGRMC-1/Halo (Spur 2-5), PAIRBP-v1/v3/v4/V5 (Spur 3-8). Der Westernblot wurde mit dem Halo-Antikörper inkubiert. Nachweis einer PGRMC-1/Halo-Expression in Spur 2-5 (57 kDa), unspezifische Banden auf der Höhe von 51 und 61 kDa.

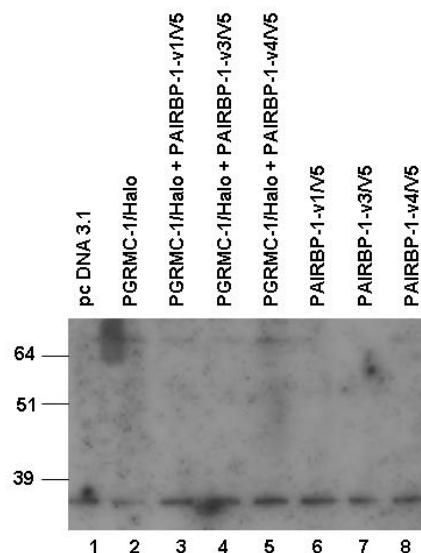


Abbildung 26: HaloLink Pulldown.

In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 (Spur 1), PGRMC-1/Halo (Spur 2-5), PAIRBP-v1/v3/v4/V5 (Spur 3-8). Anschließend erfolgte der HaloLink Pulldown. Der Westernblot wurde mit dem V5-Antikörper inkubiert. Kein spezifischer Pulldown der PAIRBP-1/V5-Isoformen in Spur 3-5. Unspezifische Bande in allen Spuren auf der Höhe von 30 kDa.

Nach den erfolglosen Versuchen im vorherigen Abschnitt änderten wir mehrere Aspekte der Methodik. Anstelle von PGRMC-1/Halo verwendeten wir PAIRBP-1/Halo als den Köder. Wir verwendeten HepG2 statt HEK293-Zellen und unterzogen die Zellen einer Stimulation mit Progesteron. Die Umstellung des Zelltypus erfolgte, da Beobachtungen einer PGRMC-1-Homomerbildung in Lebergewebe gemacht worden waren. Außerdem wurden die Zellen mit 1 μ M Progesteron vor der Proteinernie behandelt, da ein Einfluss von Progesteron auf die subzelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 vermutet wird. HepG2-Zellen wurden mit PGRMC-1/Halo oder PAIRBP-1/Halo sowie PGRMC-1/myc oder PAIRBP-1-v1/V5 cotransfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen untransfiziert belassen oder nur mit jeweils einem der Vektoren transfiziert.

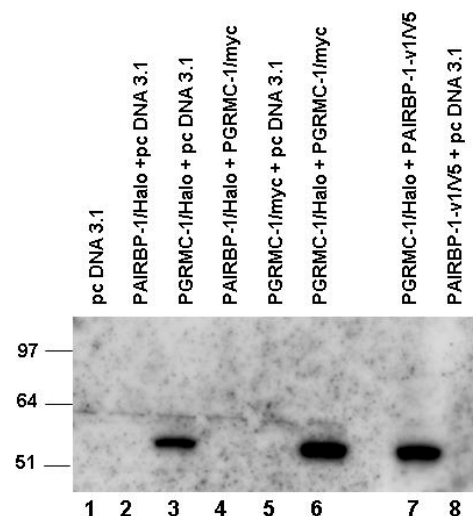


Abbildung 27: HaloLink Input.

In die Zelllinie HepG2 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 (Spur 1–3, 5, 8), PGRMC-1/Halo (Spur 3, 6, 7), PGRMC-1/myc (Spur 4–6), PAIRBP-v1/V5 (Spur 7, 8), PAIRBP-v1/Halo (Spur 2, 4). Der Westernblot wurde mit dem Halo-Antikörper inkubiert. Nachweis einer PGRMC-1/Halo-Expression in Spur 3, 6 und 7 (57 kDa). Kein Nachweis von PAIRBP-1/Halo in Spur 2 oder 4 (80 kDa). Unspezifische Banden auf der Höhe von 60 kDa.

Im Westernblot des Inputs ist bei dem Nachweis von PGRMC-1/Halo und PAIRBP-1/Halo mit dem Halo-Antikörper sind nur in den mit PGRMC-1/Halo transfizierten Lysaten spezifische Banden zu detektieren (Abb. 27). Eine mögliche Erklärung wäre eine mangelnde Fähigkeit des Halo-Antikörpers in der Detektion von PAIRBP-1/Halo.

Nach dem HaloLink Resin Pulldown wurden PGRMC-1/myc mit dem myc-Antikörper und PAIRBP-1-v1/V5 mit dem V5-Antikörper nachgewiesen. Sowohl in dem mit nur PGRMC-1/myc transfizierten als auch in den PAIRBP-1/Halo und PGRMC-1/myc sowie PGRMC-1/Halo und PGRMC-1/myc cotransfizierten Lysaten ist auf der erwarteten Höhe von PGRMC-1/myc eine Bande zu sehen. Somit ist am ehesten von einem unspezifischen Pulldown von PGRMC-1/myc durch das Halo-Resin auszugehen, da es auch ohne ein Protein mit HaloTag zu einem Pulldown von PGRMC-1/myc kommt.

Bei der Cotransfektion von PGRMC-1/Halo und PAIRBP-1-v1/V5 ist mit dem V5-Antikörper keine Bande auf der errechneten Höhe von PAIRBP-1-v1/V5 nachzuweisen und auch in der Kontrolle ist

keine spezifische Bande sichtbar. Es ist also zu keinem Pulldown von PAIRBP-1-v1/V5 durch PGRMC-1/Halo gekommen (Abb. 28).

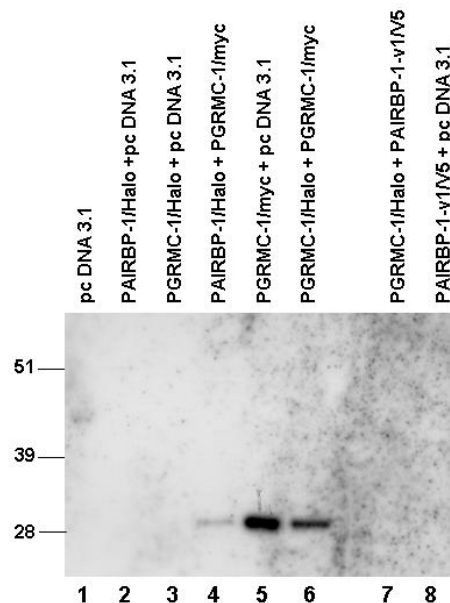


Abbildung 28: HaloLink Pulldown.

In die Zelllinie HepG2 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: pcDNA3.1 (Spur 1–3, 5, 8), PGRMC-1/Halo (Spur 3, 6, 7), PGRMC-1/myc (Spur 4–6), PAIRBP-v1/V5 (Spur 7, 8), PAIRBP-v1/Halo (Spur 2, 4). Der Westernblot wurde mit dem Myc-Antikörper (Spuren 1–6) oder V5-Antikörper (Spuren 7 und 8) inkubiert. Pulldown von PGRMC-1/myc durch PGRMC-1/Halo in Spur 6 (25 kDa), jedoch auch unspezifischer Pulldown in Spur 4 (bei nicht nachweisbarer PAIRBP-1/Halo-Expression (siehe Abb. 27)) und 5. Kein Pulldown von PAIRBP-1-v1/V5 durch PGRMC-1/Halo in Spur 7.

Zusammenfassend konnte durch das HaloLink Resin Verfahren auch nach Progesteronstimulation keine Interaktion zwischen PAIRBP-1 und PGRMC-1 nachgewiesen werden, während die Multimerbildung von PGRMC-1 durch eine unspezifische-Bindung von PGRMC-1/myc an das HaloLink Resin nicht verifiziert werden konnte.

3.3 Das Expressionsmuster von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1

Einen wichtigen Hinweis auf die Funktion von Proteinen kann das Expressionsmuster geben. PGRMC-1 wurde über viele unterschiedliche Herangehensweisen in zahlreichen Geweben nachgewiesen. In der menschlichen Niere und Leber wird PGRMC-1 reichlich exprimiert.

PAIRBP-1 wurde in einer Northern-Blot-Analyse an humanen Gewebeproben mit absteigender Intensität im Herzen, Skelettmuskel, Niere, Plazenta, Leber und dem Gehirn nachgewiesen (Lemos *et al.* 2003). Die beiden zuletzt genannten Proteine und PGRMC-2 wurden im menschlichen Spermium (Losel *et al.* 2005) sowie im Ovar der Ratte detektiert (Nilsson *et al.* 2006). Um die Expression in den hier verwendeten Zelltypen darzulegen, wurden Gesamtzelllysate untransfizierter Zellen in einem Westernblot eingesetzt. Die jeweiligen Proteine wurden mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Wie in Abb. 29 zu sehen, wird PGRMC-1 in den Zelllinien COS-7, MDA-MB-231, Skut-1B, HEK293 sowie in myometrialen Primärzellen exprimiert. PAIRBP-1 kann in allen zuvor genannten Zelllinien außer COS-7 und in myometrialen Primärzellen nachgewiesen werden (Abb. 30). In einem früheren Versuch waren die PAIRBP-1-Isoformen mit V5-Tag in COS-7-Zellen transfiziert

und im Westernblot mit dem PAIRBP-1-Antikörper detektiert worden. Hierbei hatte sich auf der errechneten Höhe der endogenen PAIRBP-1-Isoformen (42–45 kDa) eine deutliche Bande in transfizierten und untransfizierten Zelllysaten gezeigt. Somit scheinen auch COS-7-Zellen endogenes PAIRBP-1 zu exprimieren (siehe Abb. 15).

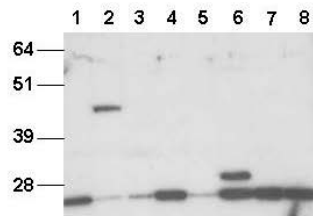


Abbildung 29: Expressionsmuster von PGRMC-1.

Aufgetragen sind Proteinlysate von myometrialen Primärzellen (Spur 1), COS-7 (Spur 2), MDA-MB-231 (Spur 4), HEK293 (Spur 4), Skut-1B (Spur 5). In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/Halo und PGRMC-1/myc (Spur 6), PGRMC-2/myc und PGRMC-2/Halo (Spur 7), PAIRBP-v1/V5 und PAIRBP-v1/Halo (Spur 8). Der Westernblot wurde mit dem S1-Antikörper gegen PGRMC-1 inkubiert. Nachweis von endogenem PGRMC-1 als Mono- und Dimer (Spur 2) sowie überexprimiertem PGRMC-1/myc (Spur 6).

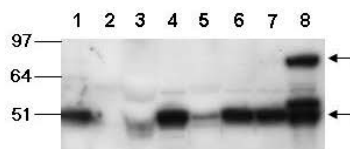


Abbildung 30: Expressionsmuster von PAIRBP-1.

Aufgetragen sind Proteinlysate von myometrialen Primärzellen (Spur 1), COS-7 (Spur 2), MDA-MB-231 (Spur 4), HEK293 (Spur 4), Skut-1B (Spur 5). In die Zelllinie HEK293 wurden die folgenden Konstrukte transfiziert: PGRMC-1/Halo und PGRMC-1/myc (Spur 6), PGRMC-2/myc und PGRMC-2/Halo (Spur 7), PAIRBP-v1/V5 und PAIRBP-v1/Halo (Spur 8). Der Westernblot wurde mit dem PAIRBP-1-Antikörper inkubiert. Erkennung von endogenem PAIRBP-1 bei 50 kDa (alle Spuren außer 2; unterer Pfeil) und überexprimiertem PAIRBP-1 mit V5- bzw. Halo-Tag (55 bzw. 80 kDa; Spur 8; oberer Pfeil für Halo-Fusionsprotein).

3.4 Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1

Um die Lokalisation von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1 im Myometrium bestimmen zu können, wurde eine gleichzeitige Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen spezifische Organellmarker und dem Tag-Antikörper des jeweiligen überexprimierten Proteins durchgeführt. Bei einer Co-Lokalisation kann so auf das entsprechende Zellkompartiment geschlossen werden. Als Organellmarker wurde Cadherin für die Plasmamembran, Caveolin für Caveolae, Lamp als Marker des Lysosoms und Calretikulin als spezifischer Kompartimentmarker für das endoplasmatische Retikulum eingesetzt. Zunächst wurden myometriale Primärzellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert. Hiernach erfolgte die duale Immunfluoreszenz. Für die Organellmarker wurde der Fluoreszenz-Sekundärantikörper AlexaFluor-568 und für die Tags der Fluoreszenz-Sekundärantikörper AlexaFluor-488 verwendet. Eine Co-Lokalisation wäre durch eine Gelbfärbung bei Überlagerung der Fluoreszenzen von AlexaFluor-488 und -568 sichtbar.

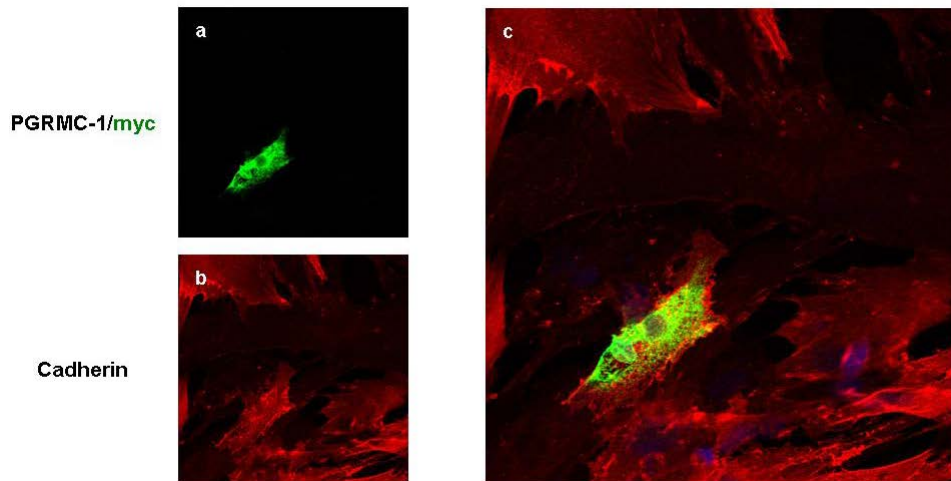


Abbildung 31: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und der Plasma-Membran.

Myometriale Primärzellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenz-färbung mit dem Myc-Antikörper (a) und Cadherin-Antikörper (b) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot). Anfärbung des Zellkerns durch DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 40x.

a) PGRMC-1/myc, b) Cadherin, c) Überlagerung. Bei intrazellulärer Lokalisation von PGRMC-1 keine Co-Lokalisation mit Cadherin. Dies spricht gegen eine Lokalisation von PGRMC-1 auf der Zelloberfläche.

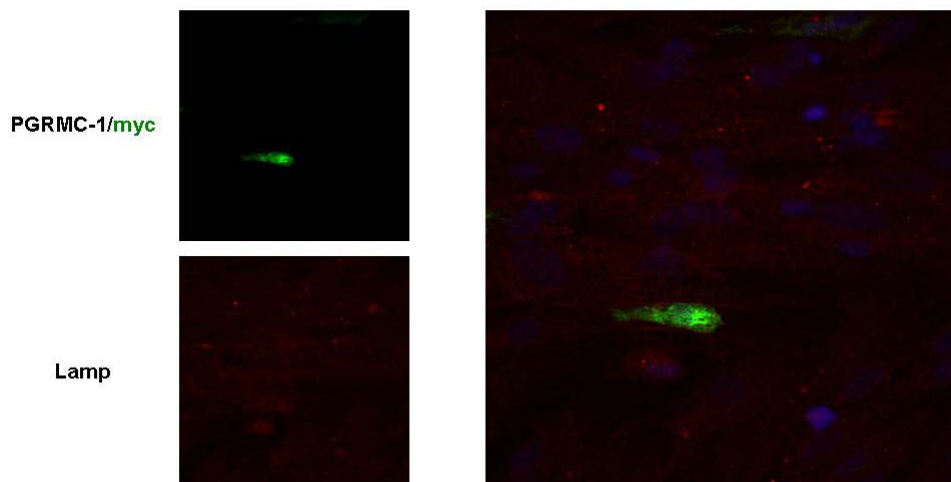


Abbildung 32: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und lysosomalen Strukturen.

Myometriale Primärzellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenz-färbung mit dem Myc-Antikörper (a) und Lamp-Antikörper (b) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot). Anfärbung des Zellkerns durch DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 40x.

a) PGRMC-1/myc, b) Lamp, c) Überlagerung. Keine Co-Lokalisation von PGRMC-1 mit dem Lamp-Signal. Dies spricht gegen die Lokalisation von PGRMC-1 in lysosomalen Strukturen.

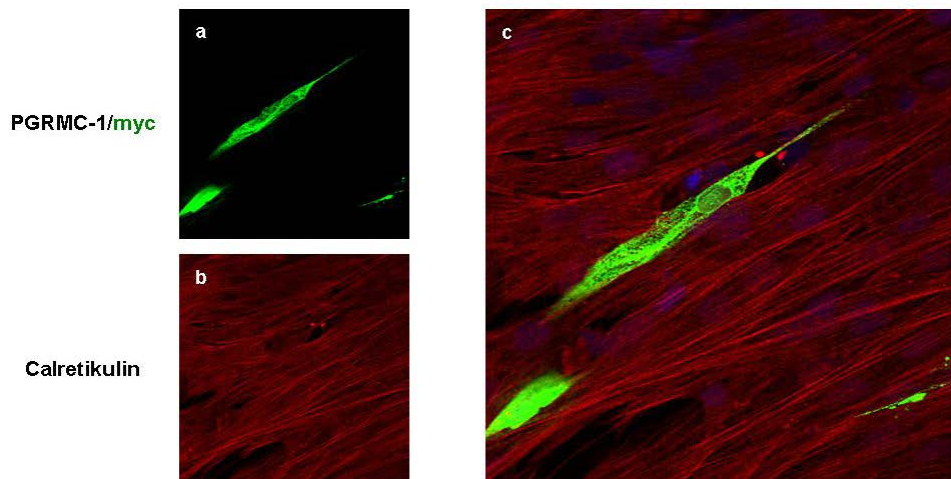


Abbildung 33: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und endoplasmatischem Retikulum.

Myometriale Primärzellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenz-färbung mit dem Myc-Antikörper (a) und Calretikulin-Antikörper (b) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot). Anfärbung des Zellkerns durch DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 40x.

a) PGRMC-1/myc, b) Calretikulin, c) Überlagerung. Keine Co-Lokalisation von PGRMC-1 mit Calretikulin. Dies spricht gegen die Lokalisation von PGRMC-1 im endoplasmatischen Retikulum.

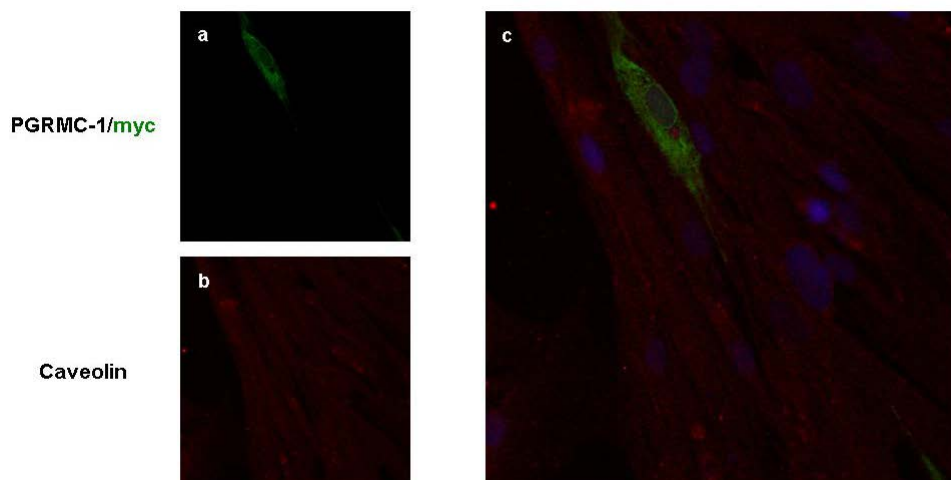


Abbildung 34: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und Caveolae.

Myometriale Primärzellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenz-färbung mit dem Myc-Antikörper (a) und Caveolin-Antikörper (b) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot). Anfärbung des Zellkerns durch DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 40x.

a) PGRMC-1/myc, b) Caveolin, c) Überlagerung. Keine Co-Lokalisation von PGRMC-1 mit Caveolin. Dies spricht gegen die Lokalisation von PGRMC-1 in Caveolae.

Die Plasmamembran ist durch die Immunfärbung von Cadherin klar abzugrenzen. Weder PGRMC-1, PGRMC-2 noch PAIRBP-1 zeigen eine Co-Lokalisation mit Cadherin (Abb. 31 und weitere Versuche, nicht abgebildet). Calretikulin als Marker für das endoplasmatische Retikulum hat vom Lokalisationsmuster innerhalb der Zelle keinerlei Übereinstimmung mit dem Lokalisationsmuster von

transfizierten PGRMC-1, PGRMC-2 oder PAIRBP-1 (Abb. 33 und weitere Versuche, nicht abgebildet). Auch eine Co-Lokalisation von PGRMC-1, PGRMC-2 oder PAIRBP-1 mit den zwei weiteren Organellmarkern, dem Lamp- und dem Caveolin-Antigen wurde nicht beobachtet (Abb. 32 und 34, weitere Versuche nicht abgebildet).

Somit konnte eine eindeutige Beziehung zwischen Organellstrukturen, wie der Plasmamembran, Caveolae, Lysosomen oder dem endoplasmatischen Retikulum, für die drei genannten Proteine nicht gestellt werden.

3.4.1 Überprüfung einer möglichen Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen und der COS-7-Zelllinie

Ein wichtiger Hinweis für eine mögliche gemeinsame Funktion von PGRMC-1 und PAIRBP-1 als Progesteronrezeptor ist die Tatsache, dass eine Co-Lokalisation der beiden Proteine durch Co-Immunpräzipitation und auch in der Immunfluoreszenz in humanen Granulosazellen nachgewiesen werden konnte (Peluso *et al.* 2005, Engmann *et al.* 2006).

Um die Lokalisation der Proteine in myometrialen Primärzellen und COS-7-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen in Kammerobjektträgern ausgesät und am nachfolgenden Tag mit PGRMC-1/myc und PAIRBP-1v1/V5 transfiziert. Danach erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Mikroskopiert wurde mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 Meta.

Zur quantitativen Bemessung der Co-Lokalisation zwischen PGRMC-1/myc und PAIRBP-1/V5 wurde das zum Mikroskop gehörige Computerprogramm zur Berechnung des Pearson Colokalisationsparameters genutzt. Dieser Parameter gibt Aufschluss über den linearen Zusammenhang zweier Merkmale. Im Falle der Co-Immunfluoreszenz stellen die beiden Kanäle die Merkmale dar. Der Parameter kann Werte von -1 bis + 1 annehmen. Dabei beschreiben Werte unter 0 eine negative Korrelation, während der Wert 1 den vollständigen linearen Zusammenhang darstellt. Bei Messungen der Fluoreszenzen von überexprimiertem PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5 ergaben sich Werte zwischen 0,76 und 0,81 als Zeichen einer stark übereinstimmenden Lokalisation der beiden Proteine innerhalb der Zelle (Abb. 35).

Auch in der COS-7-Zelllinie zeigte sich eine starke intrazelluläre Co-Lokalisation von PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5 intrazytoplasmatisch entlang einer fibrösen Struktur mit einer zusätzlich bestehenden Lokalisation von PGRMC-1 intranukleär (Abb. 36).

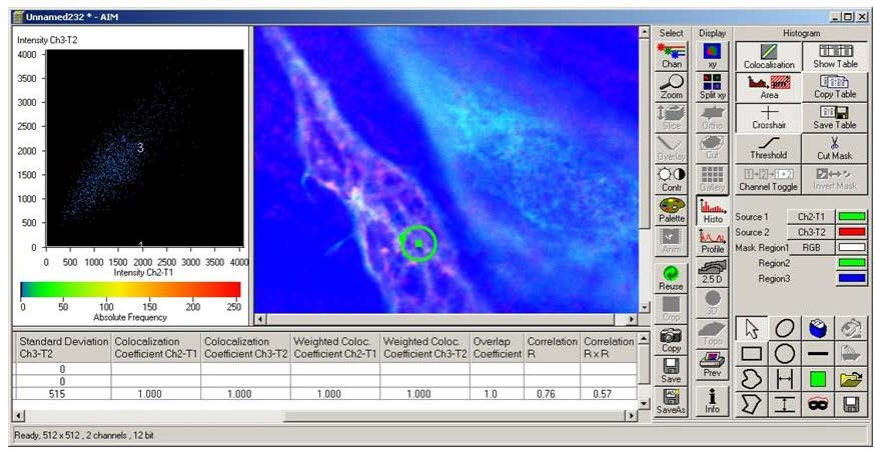
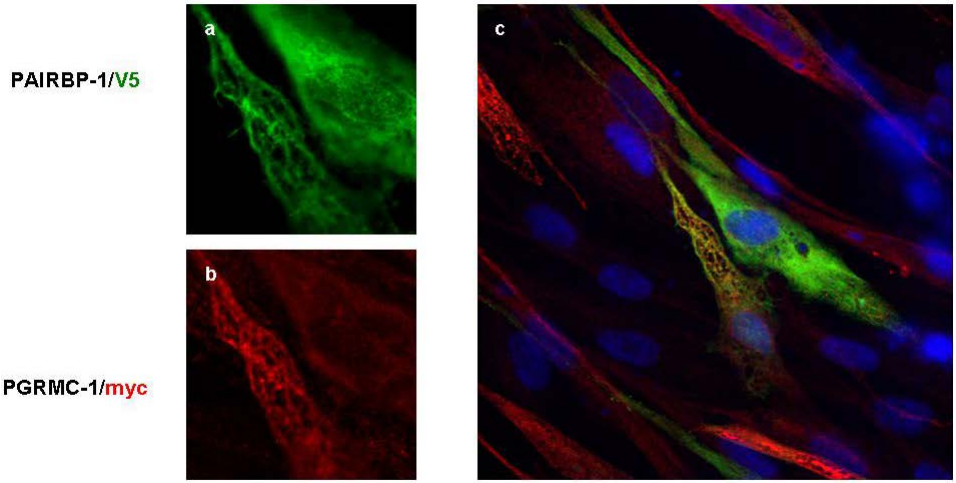


Abbildung 35: Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen.
 Im oberen Abschnitt: Myometriale Primärzellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert: PGRMC-1/myc und PAIRBP-1/V5. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem V5- und Myc-Antikörper und den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot) durchgeführt. Anfärbung des Zellkerns mit DAPI. Konfokalmikroskopie, Objektiv 63x.
 a) PAIRBP-1/V5, b) PGRMC-1/myc, c) Überlagerung. Deutliche Co-Lokalisation von überexprimiertem PGRMC-1/myc und PAIRBP-1/V5 (Gelbfärbung in c).
 Unterer Abschnitt: Berechnung des Korrelationskoeffizienten.

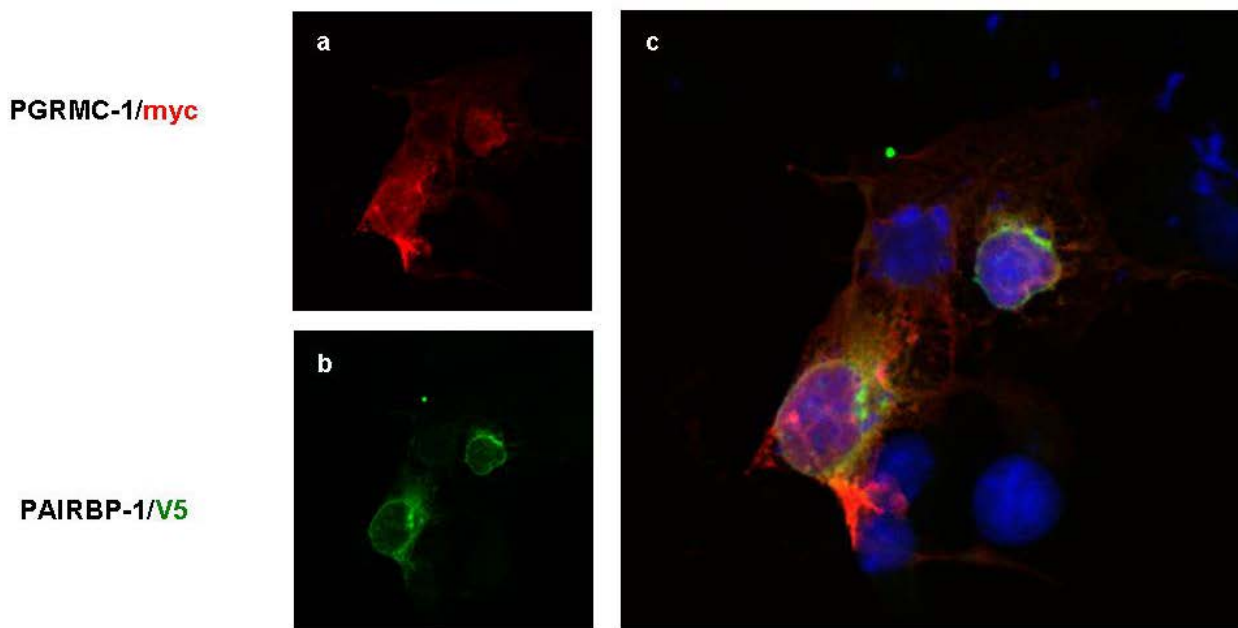


Abbildung 36: Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert: PGRMC-1/myc und PAIRBP-1/V5. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem V5- und Myc-Antikörper und den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot) durchgeführt. Anfärbung des Zellkerns mit DAPI. Konfokalmikroskopie: Zeiss, Objektiv 63x.

a) PGRMC-1/myc, b) PAIRBP-1/V5, c) Überlagerung. Deutliche Co-Lokalisation von überexprimiertem PGRMC-1/myc und PAIRBP-1/V5 (Gelbfärbung in c).

3.4.2 Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1, und PAIRBP-1 unter dem Einfluss von Progesteron und cAMP

Die erste Beschreibung einer Translokation von PGRMC-1 durch endokrine Faktoren wurde in Granulosazellen der Ratte beobachtet. Die Arbeitsgruppe um Peluso zeigte, dass sich durch In-vivo-Stimulation mit equinem Choriongonadotropin (eCG) für 24 h die intrazelluläre PGRMC-1-Lokalisation innerhalb der Zelle von nukleär zu Regionen an oder nahe der Plasmamembran veränderte (Peluso *et al.* 2006).

Einer der möglichen Signalwege nach Bindung von CG an seinen Rezeptor ist die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Eine CG-Stimulation ruft in vivo eine erhöhte Progesteron-Ausschüttung hervor. Um eine mögliche Änderung der Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 unter dem Einfluss von Progesteron oder 8-Bromo-cAMP untersuchen zu können, wurden myometriale Primärzellen in Kammerobjektträgern ausgesät, mit PGRMC-1/Halo oder PAIRBP-1/Halo transfiziert und am folgenden Tag mit dem fluoreszierenden HaloTag-Liganden markiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit 100 nm Progesteron oder 0,5 mM 8-bromo-cAMP stimuliert. Als Kontrolle wurden parallele Kulturen unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert. Weder die Stimulation mit Progesteron noch mit 8-Bromo-cAMP führt zu einer nachweisbaren Lageänderung von PGRMC-1/Halo oder PAIRBP-1/Halo innerhalb der Zelle (Abb. 37 und 38).

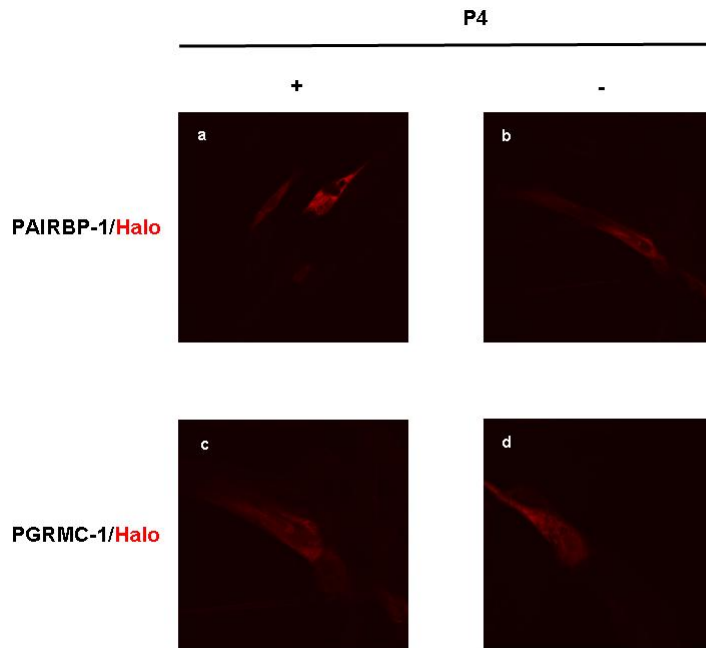


Abbildung 37: Änderung der Lokalisation von PAIRBP-1 und PGRMC-1 durch Progesteron.

Myometriale Primärzellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert: PAIRBP-1/Halo (a und b), PGRMC-1/Halo (c und d). Anschließend erfolgte die Bindung des HaloTag-TMR-Liganden (rot) und Stimulation mit 100 nm P4 (a und c). Die Kontrollen blieben unbehandelt (b und d). Es kam zu keiner intrazellulären Translokation von PGRMC-1 oder PAIRBP-1. Konfokalmikroskop Zeiss, Objektiv 40x.

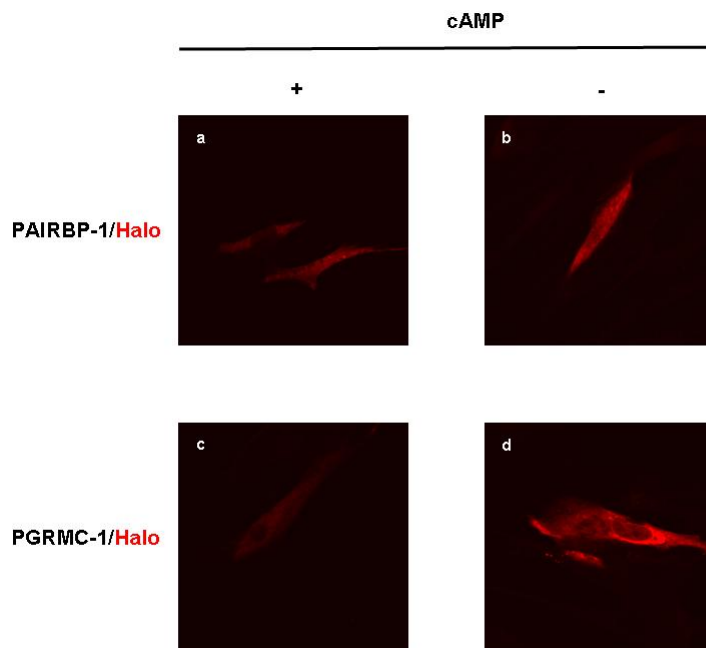


Abbildung 38: Änderung der Lokalisation von PAIRBP-1 oder PGRMC-1 durch cAMP.

Myometriale Primärzellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert: PAIRBP-1/Halo (a und b) oder PGRMC-1/Halo (c und d). Anschließend erfolgte die Bindung des HaloTag-TMR-Liganden (rot) und Stimulation mit 0,5 mM 8-Br-cAMP (a und c). Die Kontrollen blieben unbehandelt (b und d). Keine Veränderung der intrazellulären Lokalisation von PAIRBP-1 oder PGRMC-1 durch cAMP-Stimulation. Konfokalmikroskop Zeiss, Objektiv 40x.

In einem weiteren Versuch wurden myometriale Primärzellen für den Zeitraum von 3 Tagen stimuliert. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit PGRMC-1/myc transfiziert und 4 h später für 3 Tage mit Progesteron behandelt oder als Kontrolle unbehandelt belassen.

Auch durch die längere Stimulation der myometrialen Primärzellen über 3 Tage zeigte sich konfokalmikroskopisch keinerlei Effekt auf die Lage von PGRMC-1/myc innerhalb der Zellstruktur (Abb. 39).

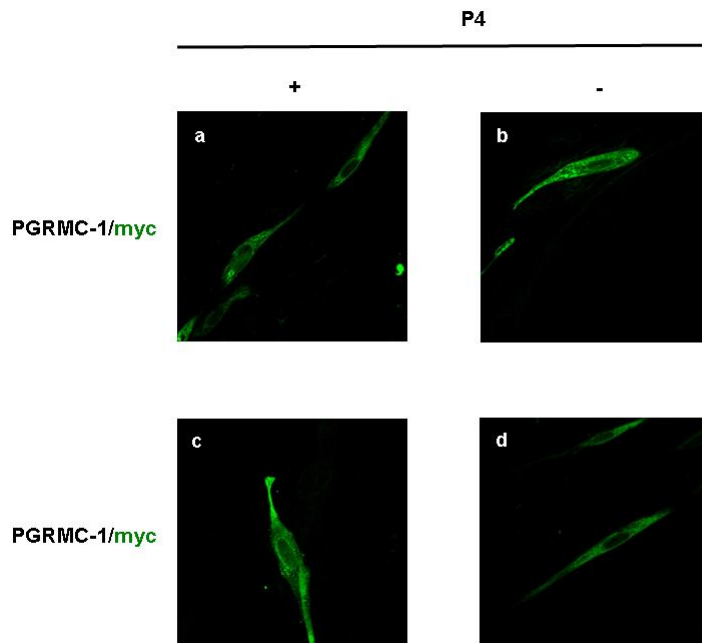


Abbildung 39: Änderung der Lokalisation von PGRMC-1/myc durch Progesteron.

Myometriale Primärzellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit 1 μ m P4 für 3 Tage (a und c). Die Kontrolle blieb unbehandelt (b und d). In der Immunfluoreszenzfärbung wurde mit dem Myc-Antikörper und dem Sekundär-Antikörper 488 (grün) inkubiert. Auch durch eine längere Stimulation kam es zu keiner Änderung der intrazellulären Lokalisation von PGRMC-1. Objektiv 40x.

3.4.3 Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 nach Änderung der Plasmamembranstruktur und Progesteronstimulation

Für die Signaltransduktion von nicht-genomischen Progesteronantworten über PGRMC-1 und PAIRBP-1 wird angenommen, dass sich Teile des gebildeten Komplexes innerhalb der Plasmamembran befinden. Es scheinen neben bestimmten Ionenkanälen auch einige Moleküle der Signaltransduktion in Lipidmikrodomänen der Plasmamembran lokalisiert zu sein (Brown and London 2000). Diese Lipidmikrodomänen sind Regionen mit einer besonders hohen Konzentration an Cholesterol und Sphingolipiden (Dykstra *et al.* 2003). Durch Integration des Caveolin-Moleküls nimmt die Lipidmikrodomäne eine flaschenförmige Morphologie an. Diese Invaginationen werden Caveolae genannt (Anderson 1998). PGRMC-1 besitzt eine membranspannende Domäne (Falkenstein *et al.* 1996) mit der eine Assoziation an die Plasmamembran möglich wäre.

Zur Untersuchung einer möglichen Änderung der Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 durch die Zersetzung caveolärer Mikrodomänen wurden myometriale Primärzellen mit PGRMC-1/myc oder PAIRBP-1v1/V5 transfiziert und anschließend mit 15 mM M- β -CD für 20 min behandelt. M- β -CD führt durch eine reversible Cholesterol-Extraktion zu einer solchen Desintegration der lipidreichen

Caveolae. Danach folgte eine 15-minütige Stimulation mit 1 μ M Progesteron. Als Kontrolle dienten Zellen, welche unstimuliert blieben und mit einem M- β -CD-Cholesterol-Komplex mit Cholesterol aufgesättigt wurden.

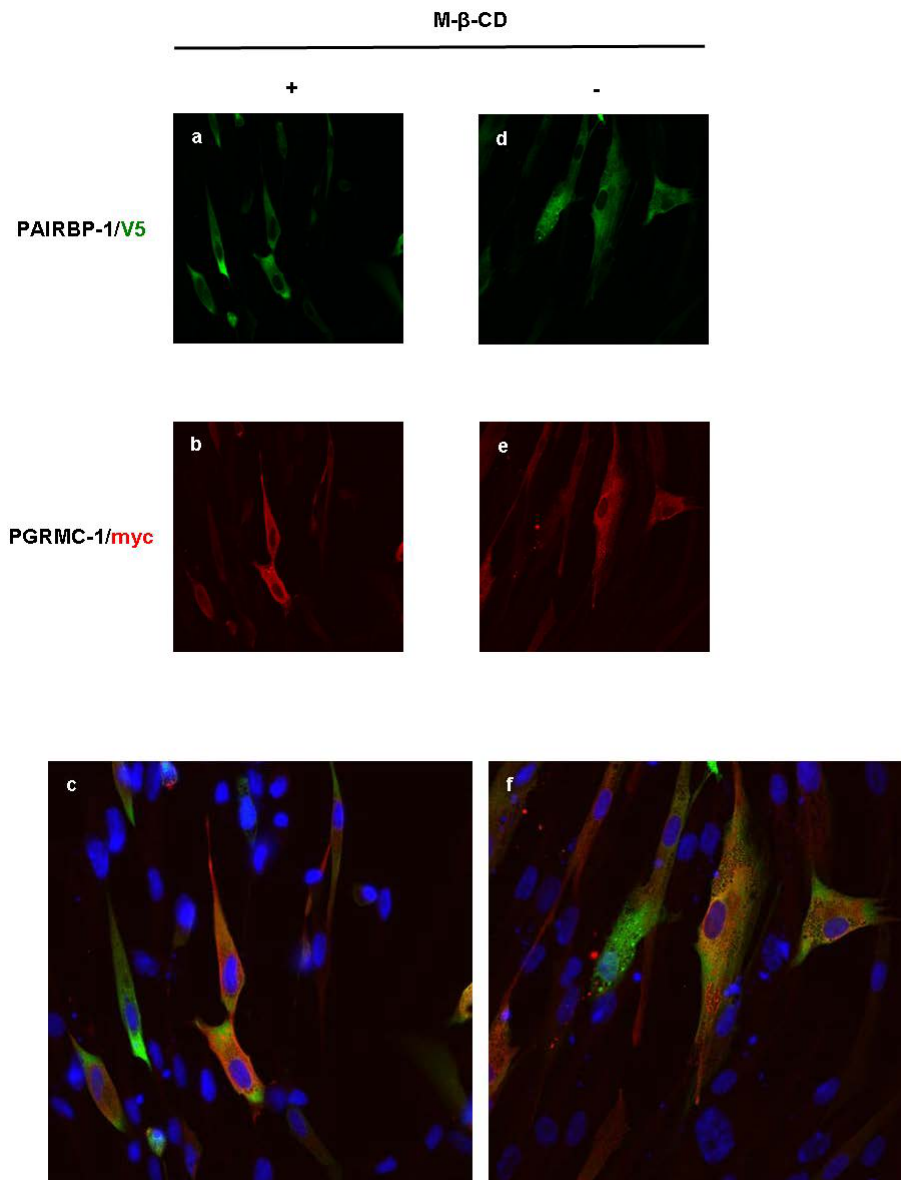


Abbildung 40: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und PAIRBP-1 nach Cholesterol-Depletion.

Myometriale Primärzellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert: PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5. Anschließende Cholesterol-Depletion mit 15 mM M- β -CD (a-c). Die Kontrollen blieben ohne Cholesterol-Depletion (d-f). Immunfluoreszenzfärbung mit dem Myc-Antikörper (b, e) und V5-Antikörper (a, d) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) (a, d) und 568 (rot) (b, e). Anfärbung des Zellkerns mit DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 62x.

Mit Cholesterol-Depletion: a) PAIRBP-1-v1/V5, b) PGRMC-1/myc, c) Überlagerung.

Ohne Cholesterol-Depletion: d) PAIRBP-1-v1/V5, e) PGRMC-1/myc, f) Überlagerung.

Vor wie nach Cholesterol-Depletion kommt es zu einer Co-Lokalisation von überexprimiertem PAIRBP-1 und PGRMC-1. Die Proteine sind intrazellulär lokalisiert und die Depletion führt zu keiner Translokation.

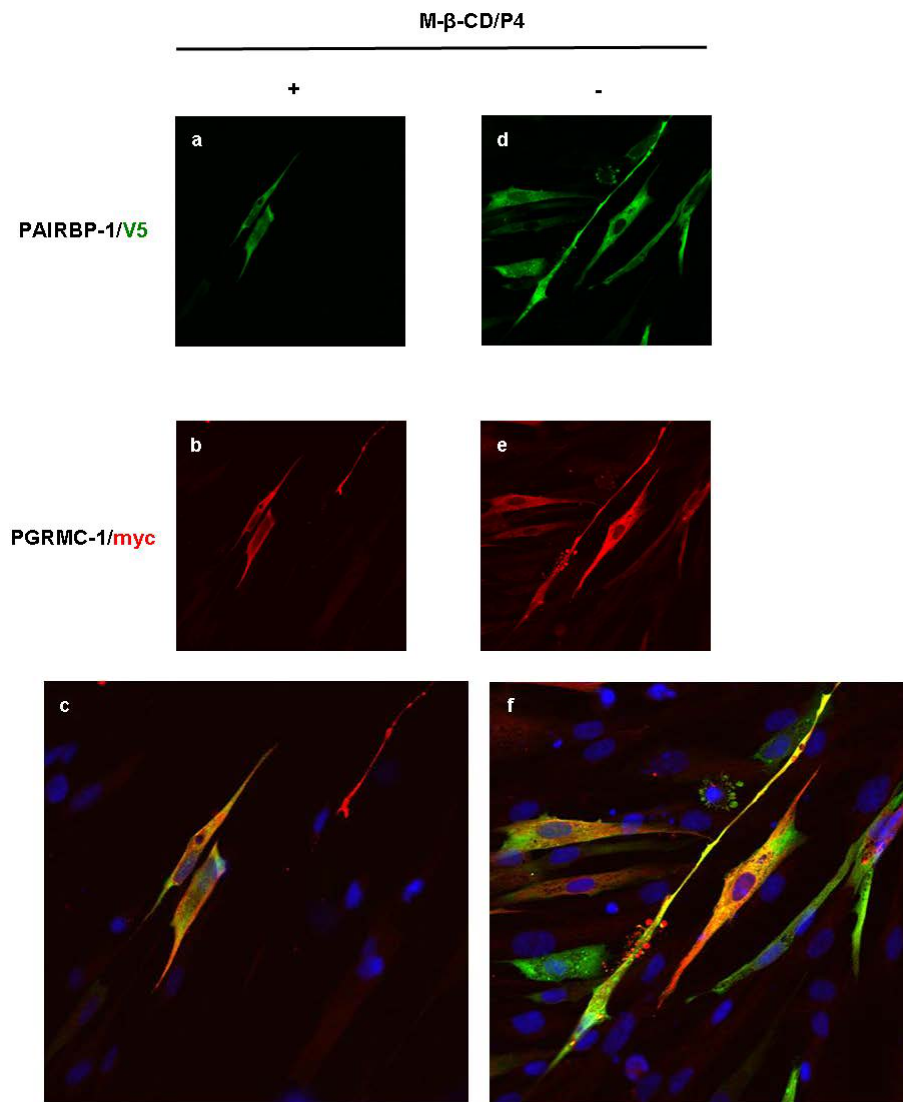


Abbildung 41: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und PAIRBP-1 nach Cholesterol-Depletion und anschließender Progesteronstimulation.

Myometriale Primärzellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert: PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5. Anschließend Cholesterol-Depletion mit 15 mM M-β-CD (a-c). Die Kontrollen blieben ohne Cholesterol-Depletion (d-f). Anschließend folgte eine Stimulation mit 1 μM Progesteron (a-f). Immunfluoreszenzfärbung mit dem Myc-Antikörper (b, e) und V5-Antikörper (a, d) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) (a, d) und 568 (rot) (b, e). Anfärbung des Zellkerns mit DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 40x.

Mit Cholesterol-Depletion: a) PAIRBP-1-v1/V5, b) PGRMC-1/myc, c) Überlagerung.

Ohne Cholesterol-Depletion: d) PAIRBP-1-v1/V5, e) PGRMC-1/myc, f) Überlagerung.

Vor wie nach Cholesterol-Depletion zeigt sich eine Co-Lokalisation von überexprimiertem PAIRBP-1 und PGRMC-1. Die Proteine sind intrazellulär lokalisiert und weder die Depletion von Cholesterol noch die Progesteronbehandlung führen zu einer Translokation.

Ein Vergleich der mit Progesteron-stimulierten Zellen mit den unstimulierten Zellen zeigt, dass sich die intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5 durch die Progesteron Stimulation nicht verändert (Vergleich Abb. 40 und 41).

Auch eine gleichzeitige Cholesterol-Depletion führt zu keiner Änderung der Lokalisation von PGRMC-1/myc oder PAIRBP-1v1/V5 (Abb. 41). Eine alleinige Cholesterol-Depletion führt zu einem veränderten Zellbild (Abb. 40). Die Zellen nehmen eine spindelförmige Form an. Insgesamt wirkt das

Zellinnere dichter. Dieses Zellbild bleibt auch nach der 15-minütigen Cholesterol-Repletion bestehen (nicht abgebildet). Somit scheint es zu einer unvollständigen Cholesterol-Repletion gekommen zu sein. Diese könnte durch die Menge an Cholesterol oder die Dauer der Inkubation bedingt sein. Die Verteilung von PGRMC-1/myc und PAIRBP-1-v1/V5 innerhalb der Zelle bleibt dabei unverändert.

3.4.4 Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und Caveolin nach Änderung der Plasmamembranstruktur und Progesteronstimulation

Die Beobachtung, dass mit der Immunpräzipitation nach der Behandlung mit dem Cholesterol-komplexierenden Agens Digitonin eine Interaktion zwischen Caveolin und PGRMC-1 detektiert werden konnte (Bramley *et al.* 2002), führte zu der Fragestellung, ob in der Immunfluoreszenz durch Cholesterol-Depletion eine Änderung der Lokalisation von PGRMC-1 und Caveolin zu beobachten sei. Dazu wurden myometriale Primärzellen mit PGRMC-1/myc transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 15 mM M- β -CD für 20 min behandelt, anschließend mit 1 μ M Progesteron für 15 min stimuliert und mit 4% PFA fixiert. Als Kontrolle dienten M- β -CD unbehandelte, unstimulierte Zellen.

Die Cholesterol-Komplexierung durch M- β -CD scheint keinen Einfluss auf die Lokalisation von PGRMC-1/myc und Caveolin zueinander zu haben. Das Muster der Verteilung von PGRMC-1 und Caveolin innerhalb der Zelle bleibt gleich. Des Weiteren ist weder vor noch nach der M- β -CD Behandlung eine Co-Lokalisation der beiden Proteine ersichtlich. Auch eine gleichzeitige Stimulation mit Progesteron hat keinen Effekt auf die Lokalisation von PGRMC-1/myc und Caveolin (Abb. 42 und 43).

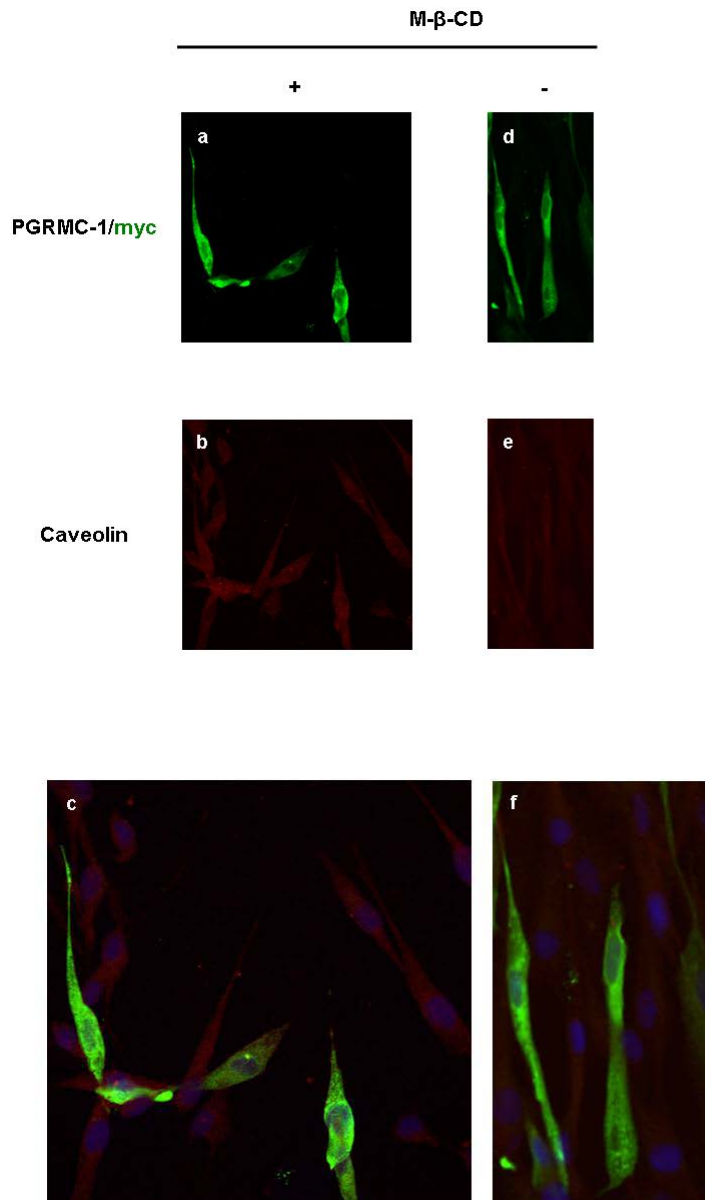


Abbildung 42: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und Caveolae nach Cholesterol-Depletion.

Myometriale Primärzellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert. Anschließend erfolgte eine Cholesterol-Depletion mit 15 mM M-β-CD (a–c). Die Kontrollen blieben ohne Cholesterol-Depletion (d–f). Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Myc-Antikörper (a, d) und Caveolin-Antikörper (b, e) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot). Anfärbung des Zellkerns mit DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 40x.

Mit Cholesterol-Depletion: a) PGRMC-1/myc, b) Caveolin, c) Überlagerung.

Ohne Cholesterol-Depletion: d) PGRMC-1/myc, e) Caveolin, f) Überlagerung.

Weder vor noch nach Cholesterol-Depletion kommt es zu einer Co-Lokalisation von überexprimiertem PGRMC-1 und Caveolin.

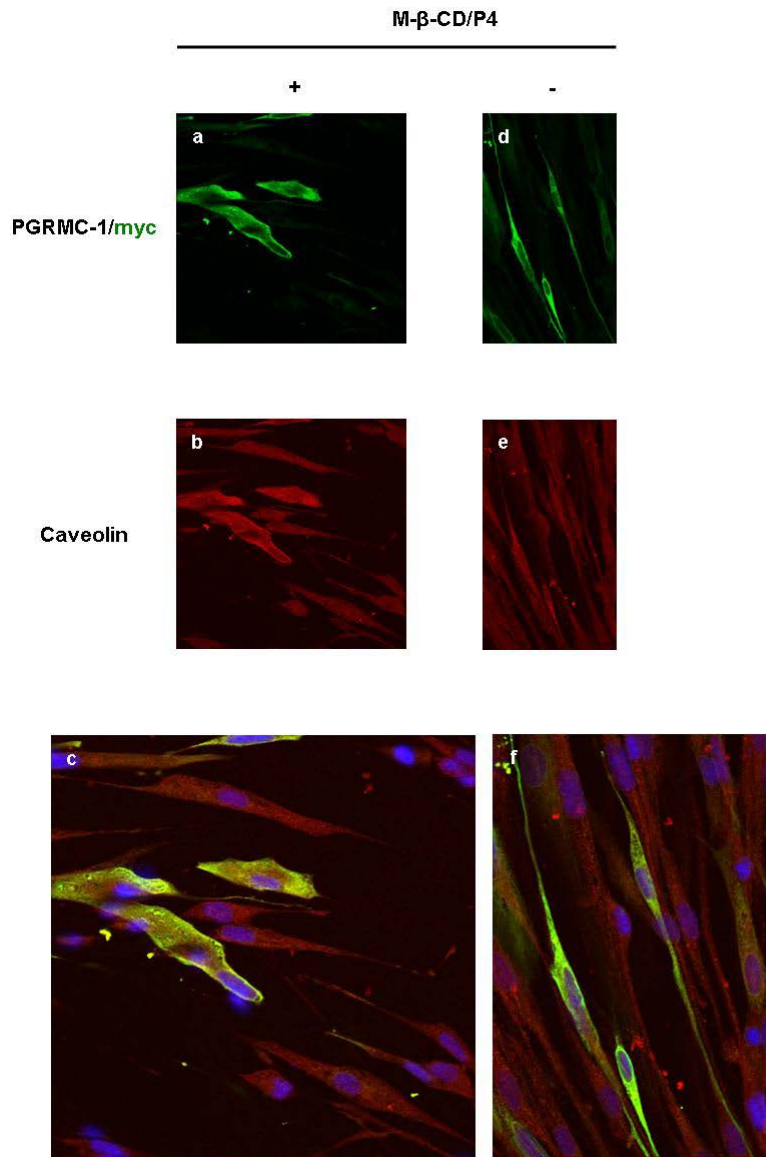


Abbildung 43: Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und Caveolae nach Cholesterol-Depletion und Progesteron-Stimulation.

Myometriale Primärzellen wurden mit PGRMC-1/myc transfiziert. Anschließend erfolgte eine Cholesterol-Depletion mit 15 mM M-β-CD (a–c) und Stimulation mit 1 μM Progesteron (a–f). Die Kontrollen blieben ohne Cholesterol-Depletion (d–f). Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Myc-Antikörper (a, d) und Caveolin-Antikörper (b, e) sowie den Sekundär-Antikörpern 488 (grün) und 568 (rot). Anfärbung des Zellkerns mit DAPI. Konfokalmikroskopie Zeiss, Objektiv 40x.

Mit Cholesterol-Depletion: a) PGRMC-1/myc, b) Caveolin, c) Überlagerung.

Ohne Cholesterol-Depletion: d) PGRMC-1/myc, e) Caveolin, f) Überlagerung.

Weder vor noch nach Cholesterol-Depletion kommt es zu einer Co-Lokalisation von überexprimiertem PGRMC-1 mit Caveolae. Es kommt zu keiner Translokation von PGRMC-1/myc, weder durch Cholesterol-Depletion noch durch Progesteron-Stimulation.

4. DISKUSSION

Wichtige physiologische Rollen von Progesteron im Säugetier sind die Vorbereitung des Uterus auf die Schwangerschaft und deren Aufrechterhaltung sowie die Proliferation und Ausbildung von alveolären Strukturen in der weiblichen Brust.

Das Bestehen von schnellen, nicht-genomischen Wirkungen von Steroiden ist seit einigen Jahren bekannt. Die Rezeptoren und nachfolgenden Signalkaskaden konnten bislang jedoch nicht vollständig entschlüsselt werden. Auf der Suche nach Rezeptorkandidaten stießen verschiedene Gruppen auf PGRMC-1 und PAIRBP-1. Vermutet wurde die Bildung eines Rezeptorkomplexes für Progesteron, lokalisiert an der Zelloberfläche.

Im Anbetracht der Relevanz des Progesteroneinflusses auf seine Zielgewebe, wie z.B. auf den menschlichen Uterus, ist eine Aufklärung einer möglichen Funktion von PAIRBP-1 und PGRMC-1 als Rezeptorkomplex für die Vermittlung der nicht-genomischen Progesteronwirkung von Bedeutung. Über die intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 und eine mögliche Progesteron-abhängige Änderung dieser Lokalisation im Myometrium ist bislang nichts bekannt.

Studien zur Funktion von PGRMC-1 und PAIRBP-1 als Progesteronrezeptor fokussierten sich bisher auf Granulosazellen. Es konnte gezeigt werden, dass PGRMC-1 und PAIRBP-1 maßgeblich an der antiapoptotischen Wirkung von Progesteron in Granulosazellen beteiligt sind (Engmann *et al.* 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher beantwortet werden, wo PAIRBP-1 und PGRMC-1 intrazellulär lokalisiert sind und ob es möglicherweise unter zu einer Co-Lokalisation der beiden Proteine kommt.

4.1 Antikörper-Validierung

In einem ersten Schritt sollte eine Validierung der zum Nachweis von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1 vorwiegend verwendeten Antikörper erfolgen. Entscheidend war hierbei der Ausschluss einer Kreuzreaktivität der PGRMC-1- und PGRMC-2-Antikörper, welche aufgrund bestehender Strukturähnlichkeiten der beiden Proteine vermutet werden könnte.

Bei der Validierung der gegen PGRMC-1 gerichteten Antikörper konnte eine ausreichende Sensitivität und Spezifität des 7860- und T2-Antikörpers nachgewiesen werden. Der S1-Antikörper zeigte eine leichte Kreuzreaktivität mit überexprimiertem PGRMC-2. Während der 7860- und T2-Antikörper gegen bestimmte Abschnitte von PGRMC-1 gerichtet sind, in welchen sich PGRMC-1 und PGRMC-2 stark unterscheiden, ist der S1-Antikörper gegen das gesamte PGRMC-1-Protein erzeugt worden. Dies könnte die Kreuzreaktion dieses polyklonalen Antikörpers erklären.

Während der Abnova-Antikörper zur Erkennung von PGRMC-2 eine geringe Sensitivität gegenüber endogen exprimiertem PGRMC-2 aufwies, wurde durch den 395-Antikörper eine hinreichende Sensitivität gegenüber endogenem und überexprimiertem PGRMC-2 erreicht. Beide PGRMC-2-Antikörper erwiesen sich als spezifisch. Der untersuchte PAIRBP-1-Antikörper wies eine hinreichende Sensitivität und Spezifität auf.

Die Validierung konnte anhand guter Kontrollen durchgeführt werden, da für alle Antigene Expressionskonstrukte vorlagen, die für Fusionsproteine mit Myc- oder V5-Epitop kodieren. So konnte jeweils parallel ein Nachweis mit dem zu testenden Antikörper und einem Antikörper gegen das Tag-Epitop erfolgen.

Nach der eingehenden Überprüfung der zuvor genannten Antikörper erwiesen sich insbesondere der PGRMC-1-Antikörper 7860, der PGRMC-2-Antikörper 395, der PAIRBP-1-Antikörper und die Antikörper gegen Myc- und V5-Epitope als sensitiv und spezifisch und wurden für die folgenden Experimente angewendet. Mit der Prüfung der Antikörper auf Spezifität und Sensitivität erfolgte die Validierung der vorhandenen Mittel zur Erforschung von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1.

4.2 Interaktion von PGRMC-1 und PAIRBP-1 und PGRMC-1-Homomerbildung

Zur Untersuchung einer möglichen PGRMC-1-Homomerbildung oder der Interaktion zwischen PAIRBP-1 und PGRMC-1 wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt.

4.2.1 Untersuchung der PGRMC-1-Homodimerbildung unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen

Zunächst sollte die Art der Bindung, welche die Bildung von PGRMC-1-Multimeren ermöglicht, untersucht werden. Vermutet wird eine Multimerbildung durch Disulfidbrücken (Falkenstein *et al.* 2001). Unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wurden Proteinlysate mit endogenem und überexprimiertem PGRMC-1 im Westernblot elektrophoretisch aufgetrennt. Durch eine Reduktion sollte es zu einer Auftrennung bestehender Disulfidbrücken kommen.

Während unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Dimerbildung von überexprimiertem PGRMC-1/myc nachgewiesen werden konnte, kam es zu keiner endogenen PGRMC-1-Dimerbildung. Ein möglicher Grund für das Fehlen von endogenen PGRMC-1-Dimeren könnte die geringe endogene Expression dieses Proteins darstellen.

Unter reduzierenden Umständen wurde endogenes und überexprimiertes PGRMC-1 lediglich als monomere Form detektiert. Weder unter reduzierenden noch unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde eine Dimerisierung von PGRMC-1/Halo beobachtet. Bei dem HaloTag handelt es sich um ein ca. 35 kDa großes Molekül, welches eine Dimerisierung von PGRMC-1 sterisch behindern könnte. Möglicherweise ist insbesondere das C-terminale Ende von PGRMC-1, an welchem sich der Halo-Tag befindet, entscheidend für die Homomerbildung. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte zunächst mit dem Halo-Antikörper die Expression von PGRMC-1/Halo nicht nachgewiesen werden. Mit dem S1-Antikörper gelang jedoch der Nachweis von PGRMC-1/Halo. Eine geänderte Konformation im nicht reduzierten Zustand könnte die Anbindung des Halo-Antikörpers an sein Epitop erschwert haben.

Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung einer Dimerisierung durch Disulfidbrücken, da nur unter nicht reduzierenden Umständen PGRMC-1-Multimere detektiert werden konnten. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass die Progesteronbindungsfähigkeit von Lebermembranen durch reduzierende Agenzien vermindert wurde (Falkenstein *et al.* 2001). Somit könnte gerade dimerisiertes PGRMC-1 bedeutsam für die Progesteronbindungsfähigkeit sein.

In einer 2010 veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe um Peluso wurde konträr zu diesen Ergebnissen auch unter reduzierenden Umständen die dimerisierte Form von PGRMC-1 beobachtet. Außerdem schien die dimerisierte Form von PGRMC-1 in SIGC der Ratte vermehrt nukleär lokalisiert

zu sein, während sich PGRMC-1-Monomere im Zytosol befanden. Es bleibt zu klären, inwieweit die intrazelluläre Lokalisation abhängig vom Zelltypus ist (Falkenstein *et al.* 2001).

4.2.2 Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildungen durch Co-Immunpräzipitation und reversible chemische Quervernetzung

In der durchgeführten Co-Immunpräzipitation mit vorheriger reversibler Quervernetzung konnte keine Interaktion von endogenem PGRMC-1 und überexprimiertem PGRMC-1/myc nachgewiesen werden. Möglicherweise kommt es bei einer Überexpression von PGRMC-1/myc nur zu einer Dimerisierung zwischen transfiziertem PGRMC-1 mit Myc-Tag und nicht mit endogenem PGRMC-1. Homodimere können mit dieser Methodik nicht nachgewiesen werden. Um das Ungleichgewicht zwischen überexprimiertem PGRMC-1/myc und endogenem PGRMC-1 auszugleichen, könnte man Wildtyp-PGRMC-1 (ohne Tag) cotransfizieren. Ein solches Konstrukt stand jedoch nicht zur Verfügung.

4.2.3 Untersuchung der PGRMC-1-Multimerbildung durch irreversible chemische Quervernetzung

In einem weiteren Versuch erfolgte vor der Proteinernte eine irreversible Quervernetzung von Proteinen durch DSS. Außerdem wurden die Zellen kurz vor der Proteinernte mit Progesteron stimuliert, um die Auswirkung einer Progesteronstimulation auf die Interaktionspartner und eine Homodimerbildung von PGRMC-1 zu testen. In den untransfizierten Zelllysaten ließ sich durch den S1-Antikörper endogenes PGRMC-1 als Monomer und Dimer nachweisen; dabei war der Nachweis von Dimeren in den Zelllysaten ohne Quervernetzung erstaunlicherweise stärker ausgeprägt als in den Zelllysaten mit Quervernetzung. Möglicherweise könnte die irreversible Quervernetzung die Dimerisierung von endogenem PGRMC-1 zerstört haben.

In den Zelllysaten mit überexprimiertem PGRMC-1/myc stellte sich durch den Myc-Antikörper in den Banden ohne Quervernetzung PGRMC-1 als Monomer dar, während sich in den Proben mit Quervernetzung Banden auf der errechneten Höhe von PGRMC-1-Di- und -Trimeren zeigten. Diese Ergebnisse sprechen erneut für die Bildung von PGRMC-1-Di- und eventuell -Trimeren. Eine Abhängigkeit der PGRMC-1-Homomerbildung von einer Progesteronstimulation wurde nicht beobachtet.

Wie auch in dem beschriebenen Versuch des Nachweises von PGRMC-1-Homomeren unter nicht reduzierenden Bedingungen ist weiterhin nicht abschließend geklärt, ob es sich bei den auf der Höhe von 56 und 84 kDa beschriebenen Banden um PGRMC-1-Homomere oder Interaktionen mit anderen Proteinen handelt. Die Banden stimmen jedoch mit der errechneten Höhe von PGRMC-1-Di- bzw. Trimeren überein. Durch die Verwendung von Antikörpern gegen weitere mögliche Interaktionspartner könnte dieser Verhalt weiter verifiziert werden.

4.2.4 Untersuchung möglicher PGRMC-1-Homomerbildungen durch die HaloLink Resin Methode

In einem weiteren neuartigen Versuchsansatz, dem HaloLink Resin Pulldown, in welchem die Interaktion zwischen PGRMC-1/Halo und PGRMC-1/myc untersucht werden sollte, kam es zu einem unspezifischen Pulldown von PGRMC-1/myc. Verursacht sein könnte dies durch eine unspezifische, aber starke Interaktion des Myc-Tags mit den Bindungsstellen des HaloLink Resins, wodurch ein

Pulldown in dieser Anordnung leider unmöglich gemacht wurde. Um zu verifizieren, ob tatsächlich eine Bindung des Myc-Epitops an das HaloLink Resin erfolgt, könnte ein anderes Protein mit Myc-Tag dieser Pulldown-Methode unterzogen werden. Andernfalls findet die unerwünschte Interaktion möglicherweise zwischen dem PGRMC-1-Anteil unseres Fusionsproteins und dem HaloLink statt.

4.2.5 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 durch HaloLink Resin

Da es in einer Immunpräzipitation mit SIGC-Lysaten zu dem Nachweis einer Interaktion zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 gekommen war (Peluso *et al.* 2005), sollte eine mögliche Interaktion nun in weiteren Zellsystemen geprüft werden. Angewandt wurde die HaloLink Resin Methode in Proteinlysaten von HEK293- und HepG2-Zelllinien.

In Proteinlysaten von HEK293-Zellen konnte keine Interaktion zwischen PGRMC-1/Halo und PAIRBP-1-v1/V5 oder der anderen PAIRBP-1-Isoformen nachgewiesen werden. Auch nach vorheriger Progesteronstimulation kam es in den Proteinlysaten von HepG2-Zellen zu keiner Interaktion zwischen überexprimiertem PGRMC-1/Halo und PAIRBP-1-v1/V5. In dem Versuchsansatz des PGRMC-1/myc Pulldowns durch PAIRBP-1/Halo kam es zu einem unspezifischen Pulldown von PGRMC-1/myc in der Kontrolle, d.h. in Abwesenheit von PAIRBP-1/Halo als dem Köder.

Der fehlende Nachweis einer Interaktion könnte einerseits in der Methodik begründet sein. So ist es möglich, dass eine Interaktion von PGRMC-1/Halo und den PAIRBP-1-Isoformen durch das 35 kDa messende HaloTag verhindert wurde. So konnte auch in unseren Versuchen keine Bildung eines PGRMC-1/Halo-Dimers nachgewiesen werden.

Auf der anderen Seite könnte besonders der Zelltypus maßgeblich sein für die Interaktionspartner von PGRMC-1. So wurde in einer anderen Studie in COS7-Zelllysaten eine Interaktion zwischen PGRMC-1, SCAP und Insig-1 beschrieben (Suchanek *et al.* 2005). Hierbei handelt es sich um Schlüsselenzyme der Cholesterolverregulation. In einer weiteren Studie konnte in neuronalen Zellen eine Interaktion des PGRMC-1 Orthologs VEM-1 mit einem wichtigen Vermittler der Axonformation, UNC-40, gezeigt werden (Runko and Kaprielian 2004). Abhängig von der Funktion von PGRMC-1 innerhalb des Zellsystems wären somit unterschiedliche Interaktionspartner denkbar und einer der Gründe für die variablen beschriebenen Funktionen des Proteins.

Außerdem ist denkbar, dass der in Granulosazellen beobachtete PGRMC-1/PAIRBP-1-Komplex durch weitere, zellspezifische Interaktionspartner ermöglicht oder stabilisiert wird, die in den von uns verwendeten Zellsystemen fehlten.

4.3 Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1

Im Gegensatz zu der vermuteten Lokalisation von PGRMC-1, -2 und PAIRBP-1 an oder nahe der Zellmembran, zeigte sich in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen eine klare intrazelluläre Lokalisation. In der Co-Immunfluoreszenz mit dem Marker der Zellmembran, Cadherin, zeigte sich keinerlei Übereinstimmung der Lokalisation. Bei Caveolin handelt es sich um einen spezifischen Marker der Caveolae, welche lipidreiche Domänen innerhalb der Plasmamembran darstellen. Auch mit diesem Marker eines Zellkompartiments konnte keine Co-Lokalisation aufgezeigt werden. Die in unseren Experimenten beobachtete Lokalisation von PGRMC-1, -2 und PAIRBP-1 scheint am ehesten

zytoplasmatisch zu sein, auffallend ist die Verteilung der drei Proteine entlang eines fibrösen Netzwerks. Eine vermehrte perinukleäre oder perimembranöse Verteilung lässt sich nicht feststellen. Untersucht wurde die Co-Lokalisation mit lysosomalen Strukturen und dem endoplasmatischen Retikulum. Hierbei zeigte sich keinerlei Übereinstimmung mit den genannten Organellmarkern. Die Aussparung von fluoreszierenden Signalen in der nukleären Region (eine Kernfärbung mit DAPI wurde durchgeführt, nicht abgebildet) der konfokalmikroskopischen Aufnahmen spricht außerdem gegen ein Bestehen von PGRMC-1, -2 oder PAIRBP-1 innerhalb des Zellkerns. Erwähnenswert sind hier neueste Veröffentlichungen von der Arbeitsgruppe um Peluso. Nach Auftrennung der Proteinlysate von SIGC in zytosolische und nukleäre Extrakte wurde eine Häufung der dimerisierten Form von endogenem PGRMC-1 im Nukleus beobachtet, während sich die Monomerform im Zytosol befand. Überexprimiertes PGRMC-1 mit GFP-Tag konnte hingegen nicht nukleär bzw. als dimerisierte Form nachgewiesen werden (Peluso *et al.* 2010). Somit könnte auch in den hier beschriebenen Versuchen das V5- oder Myc-Tag die nukleäre Lokalisation verhindert haben. Jedoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass überexprimiertes PGRMC-1 mit Myc-Tag Dimere bildet.

Die genaue intrazelluläre Lokalisation konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht vollends geklärt werden, da es zu keiner Co-Lokalisation mit den ausgewählten Organellmarkern kam. Die beobachtete intrazelluläre Lokalisation könnte spezifisch für das myometriale Gewebe sein. Wie vormals beschrieben sind, abhängig vom Zelltypus, unterschiedliche Lokalisationen von PGRMC-1 und PAIRBP-1 beobachtet worden.

In mehreren Studien wurde eine Co-Lokalisation von PGRMC-1 und dem endoplasmatischen Retikulum in Leberzellen gezeigt (Falkenstein *et al.* 1998, Nolte *et al.* 2000), während in SIGC ein Großteil des detektierten PGRMC-1 an der Zellmembran, mit teilweise extrazellulär gelegenen Domänen, nachgewiesen werden konnte (Peluso *et al.* 2006).

In der Zelllinie eines ovariellen Karzinoms, Ovar-3, zeigte sich eine variable Verteilung von PGRMC-1 im Nukleus und Zytoplasma, was eine Zellzyklus-abhängige Lokalisation vermuten lässt (Losel *et al.* 2007). Als möglicher Hinweis für eine durch Phosphorylierung gesteuerte Translokation konnte phosphoryliertes PGMRC-1 innerhalb des Nukleus bei der HeLa-Zelllinie nachgewiesen werden (Beausoleil *et al.* 2004).

Der Nachweis der 28 kDa PGRMC-1-Form innerhalb von mikrosomalen Zellfraktionen und der 58-kDa-Form innerhalb der zytosolischen Fraktion von Lysaten der Nebenniere legt des Weiteren eine Änderung der Lokalisation von PGRMC-1 nach Homomerbildung nahe (Raza *et al.* 2001).

Auch für PAIRBP-1 sind verschiedene intrazelluläre Lokalisationen beschrieben. In Granulosazellen konnte PAIRBP-1 an der extrazellulären Membran detektiert werden, während eine nachgewiesene Interaktion mit dem im Nukleus lokalisierten Protein CHD-3 durch eine weitere Arbeitsgruppe auf eine nukleäre Lokalisation schließen lässt (Peluso *et al.* 2004, Lemos *et al.* 2003). In humanen Spermien wurde PAIRBP-1 überwiegend in der Mikrosomen-Fraktion beobachtet (Luconi *et al.* 1998).

Über die biologische Funktion und intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-2 ist bislang wenig bekannt. Eine Expression von PGRMC-1 und PGRMC-2 in humanen Spermatozoen ließ eine Beteiligung bei der Akrosomenfunktion vermuten (Losel *et al.* 2005).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass es sich bei dem von uns untersuchten Gewebe um Myometrium außerhalb der Schwangerschaft handelte. Eine Translokalisierung von PAIRBP-1 und PGRMC-1 an die

Zelloberfläche oder in andere Zellkompartimente während der Schwangerschaft ist nicht auszuschließen.

Weitere Studien in peripartalem myometrialen Gewebe könnten über die genaue Lokalisation von PAIRBP-1 und PGRMC-1 und -2 in der Schwangerschaft Aufschluss geben. Außerdem sollte durch weitere proteinbiochemische Methoden u.a. der Auftrennung der Proteine nach Zellkompartimenten eine genauere Einordnung der Lokalisation von PGRMC-1, -2 und PAIRBP-1 erfolgen.

4.3.1 Überprüfung einer möglichen Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen und der COS-7 Zelllinie

In der Co-Immunfluoreszenz von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in humanen Granulosazellen wurde durch die Arbeitsgruppe um Peluso eine Co-Lokalisation der beiden Proteine nahe der Plasmamembran sowie entlang eines fibrösen Netzwerkes im Zytoplasma nachgewiesen. PGRMC-1 wurde außerdem innerhalb des Nukleus und an Stellen des Zell-Zell-Kontakts beobachtet (Engmann *et al.* 2006).

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Co-Lokalisation von überexprimiertem PGRMC-1 und PAIRBP-1 in COS-7-Zellen in der Co-Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche intrazytoplasmatische Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1. Hiernach folgte die Co-Immunfluoreszenz der beiden überexprimierten Proteine in myometrialen Primärzellen. Es zeigte sich eine klare Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 innerhalb der Zelle entlang eines fibrösen Netzwerkes, ohne den Nachweis von PGRMC-1 oder PAIRBP-1 im Bereich des Nukleus. Als Maßstab für die Co-Lokalisation wurde ein Korrelationswert berechnet. Der Pearson Index lag bei 0,74–0,81 als Zeichen einer starken Übereinstimmung in der Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1. Diese eindeutige Co-Lokalisation lässt eine gemeinsame Funktion der beiden Proteine vermuten. Wie bei den Granulosazellen handelt es sich auch bei den myometrialen Primärzellen um reproduktives Gewebe, sodass eine Funktion als Progesteronrezeptor oder eine Beteiligung an der Signaltransduktion von Hormonen nicht unwahrscheinlich scheint. Neuere Veröffentlichungen wiesen weiterhin eine Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in bestimmten Anteilen der Plazenta nach (Zhang *et al.* 2008).

4.3.2 Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 unter dem Einfluss von Progesteron und cAMP in myometrialen Zellen

Eine In-vivo-Stimulation mit eCG für 24 h führte in humanen Granulosazellen zu einer Änderung der Lokalisation von PGRMC-1 (Peluso *et al.* 2006). Untersucht werden sollte nun der Einfluss einer Progesteronstimulation auf die Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1. Da PAIRBP-1 und PGRMC-1 möglicherweise vielfältige Funktionen besitzen, könnte die Bildung eines Progesteronrezeptorkomplexes durch einen endokrinen Stimulus gesteuert sein. Bei diesem Stimulus könnte es sich um Progesteron handeln. Diese Hypothese sollte überprüft werden.

Die Stimulation mit cAMP sollte die Beobachtung der Translokation von PGRMC-1 durch eCG in Granulosazellen der Ratte prüfen. Bei dem CG-Rezeptor handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, durch welchen es unter anderem zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung kommt (Ascoli *et al.* 2002). Überprüft werden sollte, ob die Stimulation mit einem der wichtigsten sekundären Signaltransduktoren von CG, cAMP, zu einer intrazellulären Translokation führt.

Unter der kurzzeitigen Stimulation von myometrialen Primärzellen mit 100 nM Progesteron für 15 min kam es zu keiner intrazellulären Translokation von überexprimiertem und mit Halo-Tag versehenem PGRMC-1 oder PAIRBP-1 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Auch die Stimulation mit cAMP führte zu keiner intrazellulären Translokation von PGRMC-1 und PAIRBP-1. Gründe für dieses Ergebnis könnten der Zeitraum der Stimulation sowie die Konzentration von Progesteron und cAMP darstellen.

Während die serologisch gemessenen Progesteronwerte *in vivo* zyklusabhängig zwischen 3–40 nmol/l liegen, steigen diese zum Ende der Schwangerschaft auf Werte zwischen 150–1000 nmol/l an. Außerdem könnte es sich um eine spezifische Progesteronwirkung abhängig vom Zelltypus handeln.

Möglich wäre außerdem eine veränderte Fähigkeit zur Translokation der mit dem Halo-Liganden versehenen Proteine. In einem weiteren Versuchsansatz wurden myometriale Primärzellen für 3 Tage mit einer höheren Progesteronkonzentration von 1 μ M stimuliert. Anschließend wurde das überexprimierte PGRMC-1/myc durch eine Immunfluoreszenz mit dem Myc-Antikörper dargestellt. Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zeigte sich auch hierbei keine intrazelluläre Translokation des Proteins.

Kürzlich wies die Forschungsgruppe um Peluso nach, dass die Expression von PGRMC-1 und -2 *in vivo* in Mäusen durch Progesteron und mögliche weitere endokrine Faktoren reguliert wird. Dies zeigte sich in der variablen Expression der beiden Proteine während des Zyklus und durch *In-vivo*-Stimulationen mit Progesteron kam es zu einer Hochregulation von PGRMC-1. In der genannten Studie wurde ovariectomierten Mäusen 1 mg Progesteron injiziert und 24 h später erfolgte die Histologie (Zhang *et al.* 2008).

4.3.3 Intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 nach Cholesterol-Depletion in myometrialen Zellen

Der Nachweis von membranständigem PGRMC-1 und PAIRBP-1 führte zu der Annahme, dass die Vermittlung von nicht-genomischen Progesteronantworten über einen durch PGRMC-1 und PAIRBP-1 gebildeten Komplex innerhalb der Plasmamembran stattfindet (Peluso *et al.* 2006, Peluso *et al.* 2005). Durch die membranspannende Domäne von PGRMC-1 ist eine Assoziation an die Plasmamembran möglich (Falkenstein *et al.* 1996). Eine Assoziation von PGRMC-1 mit lipidreichen Domänen in der Plasmamembran, Caveolae, wurde durch die Immunpräzipitation von PGRMC-1 durch Caveolin in bovinen Lutealzellen aufgezeigt. Dabei war diese Interaktion abhängig von der Vorbehandlung mit dem Cholesterol-komplexierenden Agens Digitonin (Bramley *et al.* 2002).

Die Auswirkung des Cholesterol-komplexierenden Agens M- β -CD auf die Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 wurde in dieser Arbeit untersucht. In der Co-Immunfluoreszenz von myometrialen Primärzellen, in welche PGRMC-1/myc und PAIRBP-1/V5 transfiziert und die anschließend mit M- β -CD behandelt worden waren, zeigte sich keine Änderung der intrazellulären Lokalisation im Vergleich zu den Kontrollen ohne M- β -CD-Behandlung (Abb. 40). Außerdem erfolgte eine Progesteronstimulation, welche ebenfalls keinerlei Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation der beiden Proteine hatte.

In einem weiteren Versuch konnte nach M- β -CD-Behandlung in der Immunfluoreszenz keine Co-Lokalisation von überexprimiertem PGRMC-1/myc und Caveolin in myometrialen Primärzellen

beobachtet werden. Auch hier zeigte die Progesteronstimulation keinen Effekt auf die Lokalisationen von PGRMC-1 und Caveolin zueinander.

Offen bleibt, ob es durch M- β -CD zu einer ausreichenden Cholesterol-Depletion gekommen ist. In beiden Versuchen jedoch zeigte sich eine morphologische Veränderung der Zellstruktur durch M- β -CD mit einer insgesamt Verkleinerung und Verdichtung der Zellen.

Wie vormals beschrieben, scheinen PGRMC-1 und PAIRBP-1 in unseren durchgeführten konfokalmikroskopischen Aufnahmen nicht membranständig lokalisiert zu sein. Bei einer membranständigen Lokalisation in anderen Zelltypen oder in anderen myometrialen Stadien ist eine Interaktion von Caveolin mit PGRMC-1 nicht auszuschließen. Die in bovinen Lutealzellen gemachten Beobachtungen könnten einen stoffspezifischen Effekt von Digitonin darstellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Steroidhormon Progesteron spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung der reproduktiven Vorgänge im weiblichen Organismus. Neben dem wohlbekanntem klassischen genomischen Signalweg, bei welchem es intrazellulär zur Anbindung des Progesterons an den nukleären Progesteronrezeptor (PR) und nachfolgend zu einer Veränderung der Genexpression kommt, sind weitere nicht-genomische Steroidwirkungen bekannt. Bei der peripartalen myometrialen Relaxation durch Progesteron scheinen sowohl längerfristige genomische als auch nicht-genomische Effekte eine Rolle zu spielen.

Mehrere Rezeptorkandidaten kommen für die Vermittlung der nicht-genomischen Wirkung von Progesteron in Betracht. Das *Progesterone Receptor Membrane Component-1* (PGRMC-1) Protein kommt als möglicher Bindungspartner infrage, wie in tierexperimentellen Experimenten mit Schweinehepatozyten gezeigt werden konnte. Neben einer möglichen Rolle bei der Progesteronvermittelten Signaltransduktion ist PGRMC-1 mit vielfältigen biologischen Funktionen, unter anderem der Steroidgenese, der Homöostase und dem Zellüberleben in Verbindung gebracht worden. Über die physiologische Rolle des dem PGRMC-1 strukturell sehr verwandten Proteins PGRMC-2 ist bislang noch wenig bekannt.

Die Verwendung eines etablierten Antikörpers gegen den nukleären PR führte zur Isolierung von *Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor RNA-binding Protein* (PAIRBP-1), einem möglichen Interaktionspartner von PGRMC-1. Benannt wurde PAIRBP-1 nach seiner Funktion als RNA-stabilisierendes Protein des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI-1).

Durch Antikörper gegen PGRMC-1 und PAIRBP-1 konnte die anti-apoptotische Wirkung von Progesteron in Granulosazellen blockiert werden. Die membranständige Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 führte zu der Hypothese eines durch PGRMC-1 und PAIRBP-1 gebildeten, membranständigen Progesteronrezeptorkomplexes. Peripartal ist insbesondere Progesteron entscheidend für die myometriale Relaxation. Dabei scheinen sowohl längerfristige genomische, als auch nicht-genomische Effekte eine Rolle zu spielen.

Während bei vielen Spezies vor dem Eintritt der Geburt ein Abfall des Progesteronspiegels beobachtet wird, bleibt beim Menschen der hohe Progesteronwert bis zum Ende der Schwangerschaft bestehen. Es wird angenommen, dass es durch eine veränderte Progesteronwirkung zu einem sogenannten funktionellen Progesteronentzug kommt. Über die Mechanismen, welche diesen funktionellen Progesteronentzug bewirken könnten, gibt es bislang nur Spekulationen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen untersucht werden. Zunächst wurden bestehende Antikörper gegen PAIRBP-1, PGRMC-1 und PGRMC-2 auf ihre Sensitivität und Spezifität hin überprüft. Weiterhin wurde dann durch verschiedene Methoden eine mögliche Interaktion zwischen PAIRBP-1 und PGRMC-1 mittels der Co-Immunpräzipitation, der chemischen Quervernetzung und dem „state of the art“ Halo-Link Resin-Verfahren beleuchtet. Außerdem sollte eine mögliche PGRMC-1- oder PGRMC-2-Homodimerbildung durch Disulfidbrücken untersucht werden. Zuletzt wurde in der Co-Immunfluoreszenz die intrazelluläre Lokalisation von PGRMC-1, PGRMC-2 und PAIRBP-1 unter dem Einfluss einer Progesteronstimulation oder der Veränderung der Plasmamembran erforscht.

Während durch proteinbiochemische Methoden keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen gezeigt werden konnte, wurde in der dualen Immunfluoreszenz eine eindeutige Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 detektiert. Dabei bleibt das Zellkompartiment, in welchem PGRMC-1 und PAIRBP-1 lokalisiert sind, weiterhin ungeklärt. Weder eine Progesteronstimulation noch die Veränderung der Plasmamembran durch Cholesterolkomplexierung führte zu einer Translokation der beiden Proteine. Die Vermutung einer PGRMC-1-Homodimerbildung durch Disulfidbrücken wurde innerhalb dieser Arbeit bestätigt.

Zusammenfassend zeigt sich eine klare intrazytoplasmatische Co-Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen ohne einen proteinbiochemischen Nachweis der direkten Interaktion der beiden Proteine. Eine Abhängigkeit der Lokalisation von PGRMC-1 und PAIRBP-1 von einer Progesteronstimulation konnte nicht nachgewiesen werden.

Neben der Entschlüsselung einer möglichen Rolle von PGRMC-1 und PAIRBP-1 als membranöser Progesteronrezeptorkomplex könnte die Entwicklung von Knock-out-Mäusen Aufschluss geben über die mannigfaltigen physiologischen Funktionen der genannten Proteine.

6. AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels der Co-Immunfluoreszenz erstmalig die Co-Lokalisation der putativen Progesteronrezeptoren PGRMC-1 und PAIRBP-1 in humanen myometrialen Primärzellen nachgewiesen werden. Entgegen der vermuteten Lokalisation an oder nahe der Plasmamembran befanden sich die beiden Proteine intrazytoplasmatisch. Eine Co-Lokalisation zur Plasmamembran wurde nicht beobachtet. Es ergab sich kein Hinweis für eine progesteronabhängige Translokation von PGRMC-1 und PAIRBP-1. Trotz dieser klaren Co-Lokalisation konnte durch verschiedenste proteinbiochemische Methoden keine direkte Interaktion zwischen PGRMC-1 und PAIRBP-1 nachgewiesen werden.

Unsere Arbeit ergab nicht, dass PGRMC-1 und PAIRBP-1 in myometrialen Primärzellen als membranständiger Komplex auftritt und somit für membraninitiierte Progesteron-Effekte verantwortlich sein könnte. Es bleibt weiterhin zu klären, ob es im Rahmen der Schwangerschaft zu einer Translokation der beiden Proteine an oder nahe der Plasmamembran kommt und PAIRBP-1 mit PGRMC-1 peripartal als nicht-genomischer Progesteronrezeptor fungieren.

Die Erforschung der vielfach unterschiedlich beschriebenen intrazellulären bzw. intrazytoplasmatischen Lokalisationen von PGRMC-1 und PAIRBP-1 und insbesondere der Mechanismen, welche zu der Translokation der beiden Proteine führen, könnte weitere Aufschlüsse geben über die bislang rätselhafte Funktion der beiden Proteine.

Nach Abschluss dieser Arbeit wurden 2010 durch die Forschungsgruppe um Peluso Studien in Granulosazellen veröffentlicht, welche eine Beteiligung von PGRMC-1 an der antiapoptotischen Progesteronwirkung durch die Regulation auf sowohl genomischer als auch nicht-genomischer Ebene vermuten lassen (Peluso *et al.* 2010). Für die genomische Antwort soll insbesondere die dimerisierte, zumeist nukleär lokalisierte Form von PGRMC-1 verantwortlich sein. Neben einer Attenuierung der antiapoptotischen Wirkung von Progesteron durch Proteinbiosynthesehemmer kam es durch die Blockierung der PGRMC-1-Expression mittels RNA-Interferenz zu einem veränderten mRNA-Expressionsprofil der Zellen (Peluso *et al.* 2010) möglichen Funktion von PGRMC-1 als Teil eines Progesteronrezeptorkomplexes stellt die Überexpression des Proteins in Karzinomen sowie der Einfluss auf die Suszeptibilität für Chemotherapeutika ein Forschungsansatz mit klinischer Relevanz dar.

Die Ausschaltung von PAIRBP-1 und PGRMC-1 auf RNA-Ebene mittels siRNA und auf DNA-Ebene durch Knock-out-Mäuse werden in der Zukunft Möglichkeiten zur Erforschung der genauen physiologischen Funktion sein.

7. ABKÜRZUNGEN

AS	Aminosäure
8-Bromo-cAMP	8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3' 5'-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3': 5'-Monophosphat
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
Dap1p	<i>damage response protein related to membrane-associated progesterone receptors</i>
DCC	<i>dextrane coated charcoal</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Dithiobis-succinimidylpropionat
DSS	Disuccinimidyl-suberat
eCG	equines Choriongonadotropin
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GABA	γ -Aminobuttersäure
hCG	humanes Choriongonadotropin
HRE	hormonresponsives Element
IZAg	<i>inner zone antigens</i>
kDa	Kilodalton
M	molar
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
M- β -CD	Methyl- β -Cyclodextrin
ME	Mercaptoethanol
MMZ	myometriale glatte Muskelzellen
mM	millimolar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
mPR	membranständiger Progesteronrezeptor
NGS	<i>normal goat serum</i>
NHS-Ester	<i>N-Hydroxysuccinimide Ester</i>
OTXR	Oxytoxinrezeptor
P	Progesteron
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1</i>
PAIRBP-1	<i>Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor RNA-binding Protein</i>
PAQR	Progesteron- und Adiponectin-Rezeptoren
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm

PGRMC-1/2	<i>Progesterone Receptor Membrane Component-1/2</i>
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid-Immobilon-P Transfermembran
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SERBP-1	<i>serpine mRNA binding protein 1</i>
SIGC	<i>spontaneously immortalized granulosa cell</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (<i>Units</i>)
V	Volt
VEMA	<i>ventral midline antigen</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

8. LITERATUR

- Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL (2002) The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23:141-174
- Baulieu EE (1978) Cell membrane, a target for steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol* 12:247-254
- Bayaa M, Booth RA, Sheng Y, Liu XJ (2000) The classical progesterone receptor mediates Xenopus oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12607-12612
- Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP (2004) Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12130-12135
- Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N (1990) Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 265:1376-1380
- Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ (1991) Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* 266:18655-18659
- Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 8:269-280
- Bramley TA, Menzies GS, Rae MT, Scobie G (2002) Non-genomic steroid receptors in the bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 23:3-12
- Brown DA, London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221-17224
- Buddhikot M, Falkenstein E, Wehling M, Meizel S (1999) Recognition of a human sperm surface protein involved in the progesterone-initiated acrosome reaction by antisera against an endomembrane progesterone binding protein from porcine liver. *Mol Cell Endocrinol* 158:187-193
- Cahill MA (2007) Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review. *J Steroid Biochem Mol Biol*
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ (2000) Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 21:514-550
- Clarke CL, Sutherland RL (1990) Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev* 11:266-301
- Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Wilson JW, Mendelson CR (2003) A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9518-9523
- Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR (2006) Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol* 20:764-775
- Crudden G, Loesel R, Craven RJ (2005) Overexpression of the cytochrome p450 activator hpr6 (heme-1 domain protein/human progesterone receptor) in tumors. *Tumour Biol* 26:142-146
- Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK (2003) Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* 21:457-481
- Edwards DP (2005) Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67:335-376
- Engmann L, Losel R, Wehling M, Peluso JJ (2006) Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4962-4968

- Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M (1996) Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229:86-89
- Falkenstein E, Schmieding K, Lange A, Meyer C, Gerdes D, Welsch U, Wehling M (1998) Localization of a putative progesterone membrane binding protein in porcine hepatocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:571-578
- Falkenstein E, Heck M, Gerdes D, Grube D, Christ M, Weigel M, Buddhikot M, Meizel S, Wehling M (1999) Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca²⁺-fluxes in sperm. *Endocrinology* 140:5999-6002
- Falkenstein E, Norman AW, Wehling M (2000a) Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 85:2072-2075
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000b) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513-556
- Falkenstein E, Eisen C, Schmieding K, Krautkramer M, Stein C, Losel R, Wehling M (2001) Chemical modification and structural analysis of the progesterone membrane binding protein from porcine liver membranes. *Mol Cell Biochem* 218:71-79
- Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, Astle S, Thornton S, Peltoketo H, Lam EW, Gellersen B, Huhtaniemi I, Allen J, Brosens JJ (2005) Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J Endocrinol* 187:89-101
- Fernandes MS, Brosens JJ, Gellersen B (2008) Honey, we need to talk about the membrane progestin receptors. *Steroids* 73:942-952
- Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ (2009) Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update* 15:119-138
- Gerdes D, Wehling M, Leube B, Falkenstein E (1998) Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol Chem* 379:907-911
- Ghosh K, Thompson AM, Goldbeck RA, Shi X, Whitman S, Oh E, Zhiwu Z, Vulpe C, Holman TR (2005) Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p. *Biochemistry* 44:16729-16736
- Hand RA, Jia N, Bard M, Craven RJ (2003) *Saccharomyces cerevisiae* Dap1p, a novel DNA damage response protein related to the mammalian membrane-associated progesterone receptor. *Eukaryot Cell* 2:306-317
- Heaton JH, Dlakic WM, Dlakic M, Gelehrter TD (2001) Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. *J Biol Chem* 276:3341-3347
- Hirai Y, Utsugi K, Takeshima N, Kawamata Y, Furuta R, Kitagawa T, Kawaguchi T, Hasumi K, Noda T (2004) Putative gene loci associated with carcinogenesis and metastasis of endocervical adenocarcinomas of uterus determined by conventional and array-based CGH. *Am J Obstet Gynecol* 191:1173-1182
- Kakucs R, Varbiro S, Szekacs B, Nadasy GL, Acs N, Monos E (1998) Direct relaxing effect of estradiol-17beta and progesterone on rat saphenous artery. *Microvasc Res* 56:139-143
- Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK (1992) Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 46:208-219
- Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34:13784-13793
- Krietsch T, Fernandes MS, Kero J, Losel R, Heyens M, Lam EW, Huhtaniemi I, Brosens JJ, Gellersen B (2006) Human homologs of the putative G protein-coupled membrane progestin receptors (mPRalpha, beta, and gamma) localize to the endoplasmic reticulum and are not activated by progesterone. *Mol Endocrinol* 20:3146-3164

- Leel V, Elrick LJ, Solares J, Ingram N, Charlton KA, Porter AJ, Wright MC (2004) Identification of a truncated ratp28-related protein expressed in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 316:872-877
- Lemos TA, Passos DO, Nery FC, Kobarg J (2003) Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3. *FEBS Lett* 533:14-20
- Liu L, Wang J, Zhao L, Nilsen J, McClure K, Wong K, Brinton RD (2009) Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. *Endocrinology* 150:3186-3196
- Losel R, Breiter S, Seyfert M, Wehling M, Falkenstein E (2005) Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm Metab Res* 37:10-14
- Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M (2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 83:965-1016
- Losel RM, Besong D, Peluso JJ, Wehling M (2007) Progesterone receptor membrane component 1- Many tasks for a versatile protein. *Steroids*
- Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, Pecchioli P, Krausz C, Forti G, Baldi E (1998) Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 83:877-885
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266-2278
- Mallory JC, Crudden G, Johnson BL, Mo C, Pierson CA, Bard M, Craven RJ (2005) Dap1p, a heme-binding protein that regulates the cytochrome P450 protein Erg11p/Cyp51p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 25:1669-1679
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839
- Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW, Clark JH (1994) Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 135:1409-1414
- Marks MS, Ohno H, Kirchnausen T, Bonracino JS (1997) Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores. *Trends Cell Biol* 7:124-128
- Martinez S, Grandy R, Pasten P, Montecinos H, Montecino M, Olate J, Hinrichs MV (2006) Plasma membrane destination of the classical *Xenopus laevis* progesterone receptor accelerates progesterone-induced oocyte maturation. *J Cell Biochem* 99:853-859
- Masters JR, Drife JO, Scarisbrick JJ (1977) Cyclic Variation of DNA synthesis in human breast epithelium. *J Natl Cancer Inst* 58:1263-1265
- Menzies GS, Howland K, Rae MT, Bramley TA (1999) Stimulation of specific binding of [3H]-progesterone to bovine luteal cell-surface membranes: specificity of digitonin. *Mol Cell Endocrinol* 153:57-69
- Merlino AA, Welsh TN, Tan H, Yi LJ, Cannon V, Mercer BM, Mesiano S (2007) Nuclear progesterone receptors in the human pregnancy myometrium: evidence that parturition involves functional progesterone withdrawal mediated by increased expression of progesterone receptor-A. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1927-1933
- Mesiano S, Welsh TN (2007) Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. *Semin Cell Dev Biol* 18:321-331
- Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M (1996) Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* 239:726-731
- Meyer C, Schmid R, Schmieding K, Falkenstein E, Wehling M (1998) Characterization of high affinity progesterone-binding membrane proteins by anti-peptide antiserum. *Steroids* 63:111-116

- Mifsud W, Bateman A (2002) Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol* 3:RESEARCH0068
- Min L, Takemori H, Nonaka Y, Katoh Y, Doi J, Horike N, Osamu H, Raza FS, Vinson GP, Okamoto M (2004) Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (inner zone antigen) and its role in the steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215:143-148
- Min L, Strushkevich NV, Harnastai IN, Iwamoto H, Gilep AA, Takemori H, Usanov SA, Nonaka Y, Hori H, Vinson GP, Okamoto M (2005) Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein. *Febs J* 272:5832-5843
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289:1751-1754
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9744-9749
- Nakamura TKaH (2008) Embryology of the uterus. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC eds. *The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*. 2nd ed: Informa Healthcare; 1-19
- Nilsson EE, Stanfield J, Skinner MK (2006) Interactions between progesterone and tumor necrosis factor-alpha in the regulation of primordial follicle assembly. *Reproduction* 132:877-886
- Nolte I, Jeckel D, Wieland FT, Sohn K (2000) Localization and topology of ratp28, a member of a novel family of putative steroid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1543:123-130
- Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 186:17-22
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S (1989) Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160:828-833
- Passos DO, Bressan GC, Nery FC, Kobarg J (2006) Ki-1/57 interacts with PRMT1 and is a substrate for arginine methylation. *Febs J* 273:3946-3961
- Peluso JJ, Pappalardo A (1998) Progesterone mediates its anti-mitogenic and anti-apoptotic actions in rat granulosa cells through a progesterone-binding protein with gamma aminobutyric acidA receptor-like features. *Biol Reprod* 58:1131-1137
- Peluso JJ, Pappalardo A (2004) Progesterone regulates granulosa cell viability through a protein kinase G-dependent mechanism that may involve 14-3-3sigma. *Biol Reprod* 71:1870-1878
- Peluso JJ, Pappalardo A, Fernandez G, Wu CA (2004) Involvement of an unnamed protein, RDA288, in the mechanism through which progesterone mediates its antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology* 145:3014-3022
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M (2005) Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability. *Biol Reprod* 73:261-270
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M (2006) Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology* 147:3133-3140
- Peluso JJ, Liu X, Saunders MM, Claffey KP, Phoenix K (2008a) Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1592-1599
- Peluso JJ, Romak J, Liu X (2008b) 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* 149:534-543
- Peluso JJ, Gawkowska A, Liu X, Shioda T, Pru JK (2009) Progesterone receptor membrane component-1 regulates the development and Cisplatin sensitivity of human ovarian tumors in athymic nude mice. *Endocrinology* 150:4846-4854
- Peluso JJ, Liu X, Gawkowska A, Lodde V, Wu CA (2010) Progesterone inhibits apoptosis in part by PGRMC1-regulated gene expression. *Mol Cell Endocrinol*

- Rae MT, Menzies GS, McNeilly AS, Woad K, Webb R, Bramley TA (1998) Specific non-genomic, membrane-localized binding sites for progesterone in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 58:1394-1406
- Raza FS, Takemori H, Tojo H, Okamoto M, Vinson GP (2001) Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor. *Eur J Biochem* 268:2141-2147
- Runko E, Wideman C, Kaprielian Z (1999) Cloning and expression of VEMA: a novel ventral midline antigen in the rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 14:428-443
- Runko E, Kaprielian Z (2002) Expression of Vema in the developing mouse spinal cord and optic chiasm. *J Comp Neurol* 451:289-299
- Runko E, Kaprielian Z (2004) Caenorhabditis elegans VEM-1, a novel membrane protein, regulates the guidance of ventral nerve cord-associated axons. *J Neurosci* 24:9015-9026
- Salamonsen LA (2008) Menstrual and estrous cycles. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC eds. *The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*. 2nd ed: Informa Healthcare; 25-46
- Samalecos A, Gellersen B (2008) Systematic expression analysis and antibody screening do not support the existence of naturally occurring progesterone receptor (PR)-C, PR-M, or other truncated PR isoforms. *Endocrinology* 149:5872-5887
- Schiebler TH, Schmidt W (2002) Innere weibliche Geschlechtsorgane. In: *Anatomie*. 8th ed. Berlin: Springer 660-666
- Selmin O, Lucier GW, Clark GC, Tritscher AM, Vanden Heuvel JP, Gastel JA, Walker NJ, Sutter TR, Bell DA (1996) Isolation and characterization of a novel gene induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis* 17:2609-2615
- Selmin O, Thorne PA, Blachere FM, Johnson PD, Romagnolo DF (2005) Transcriptional activation of the membrane-bound progesterone receptor (mPR) by dioxin, in endocrine-responsive tissues. *Mol Reprod Dev* 70:166-174
- Sirotkin AV, Mlynec J, Lavrincik J, Bulla J, Hetenyi L (1995) The ability of steroid hormones to control cAMP and cGMP production by human granulosa cells in culture. *Cell Signal* 7:61-65
- Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, Hoang LK, Maina AS, Regalla LM, Lyons TJ (2008) Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids* 73:1160-1173
- Smith R (2007) Parturition. *N Engl J Med* 356:271-283
- Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C (2005) Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2:261-267
- Tai CJ, Chang SJ, Chien LY, Leung PC, Tzeng CR (2005) Adenosine triphosphate induces activation of caspase-3 in apoptosis of human granulosa-luteal cells. *Endocr J* 52:327-335
- Thomas P (2008) Characteristics of membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterone actions. *Front Neuroendocrinol* 29:292-312
- Tian J, Kim S, Heilig E, Ruderman JV (2000) Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for Xenopus oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14358-14363
- Topper YJ, Freeman CS (1980) Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60:1049-1106
- Wahli W, Martinez E (1991) Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *Faseb J* 5:2243-2249
- Wei LL, Gonzalez-Aller C, Wood WM, Miller LA, Horwitz KB (1990) 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol Endocrinol* 4:1833-1840
- Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL, Quinn PG (1996) An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progesterone-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10:1379-1387

- Wei LL, Norris BM, Baker CJ (1997) An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62:287-297
- Zhang L, Kanda Y, Roberts DJ, Ecker JL, Losel R, Wehling M, Peluso JJ, Pru JK (2008) Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpine 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. *Mol Cell Endocrinol* 287:81-89
- Zhu Y, Bond J, Thomas P (2003a) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2237-2242
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P (2003b) Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2231-2236

9. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. H. M. Schulte möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass mir die Möglichkeit gegeben wurde, meine Doktorarbeit am Endokrinologikum Hamburg durchzuführen.

Frau Dr. B. Gellersen danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die fachlich ausgezeichnete Betreuung und persönliche Unterstützung. Ihre fachliche Kompetenz und menschlichen Qualitäten werden mir stets in Erinnerung bleiben. Ihre Vorbildfunktion ist ein unersetzlicher Teil meines weiteren Werdeganges.

Katja Reimann und Annemarie Samalecos danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und den Spaß bei der Arbeit in unserem Labor und besonders herzlich möchte ich Annemarie Samalecos für ihre Unterstützung und ihre zahlreichen Ratschläge während meiner Laborarbeit danken.

Meinem Bruder Dr. Julian Schulze zur Wiesch und Frau Dr. B. Feldmann danke ich sehr herzlich für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. R. Reimers möchte ich für die Unterstützung bei der Arbeit am Konfokalmikroskop danken, durch dessen Hilfe die Arbeit mit dem Konfokalmikroskop sehr kurzweilig war.

Herrn PD H. K. Pauli und Herrn Prof. Dr. Lindner sowie ihren Mitarbeitern im Elim-Krankenhaus, Hamburg, gebührt mein Dank für die Bereitstellung des uterinen Gewebes.

Zu guter Letzt, aber mit besonderer Freude möchte ich meiner Familie und meinem Freund Tim danken, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit immer mit vollem Enthusiasmus und Liebe begleitet haben und mir ihr ganzes Vertrauen geschenkt haben.

10. LEBENS LAUF

Personalien

Name: Schulze zur Wiesch
Vorname: Clarissa Alexandra
Adresse: Eppendorfer Landstr. 152, 20251 Hamburg
Geburtsdatum: 20.09.1984
Geburtsort: Hamburg
Eltern: Dr. med. Pohl Schulze zur Wiesch, geb. Pohl und Anette Schulze zur Wiesch
Nationalität: deutsch

Schul Ausbildung

1990–1994: Grundschule Goosacker, Hamburg
1994–2003: Gymnasium Christianeum, Hamburg
2001: Auslandsaufenthalt England, Rochester
2003: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Examina

2003–2009: Studium der Humanmedizin an der Med. Hochschule Hamburg
2005: 1. Staatsexamen
2006: Auslandsaufenthalt Dänemark, Universität Kopenhagen
2009: 2. Staatsexamen

Berufliche Laufbahn

2009: Assistenzärztin in der dritten Med. Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Datum: