

Zyklusabhängige Expression und Lokalisation der Isoform C
des Progesteronrezeptors im humanen Endometrium
im Vergleich mit den Isoformen B und A

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Kira Hendricks

aus

München

Berichter: Frau Professorin
Dr. rer. nat. Irmgard Classen-Linke

Herr Universitätsprofessor

Dr. med. Joseph Neulen

Tag der mündlichen Prüfung: 13.Mai 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Material	9
2.1.1	Probengewinnung.....	9
2.1.2	Getrennte Zellen.....	10
2.1.3	Kontrolle: T47D-Zellen.....	10
2.2	Datierung des Zyklustages.....	11
2.2.1	Einteilung der Zyklusphasen.....	11
2.2.2	Immunhistochemische Methoden.....	12
2.2.3	Hormonbestimmungen	13
2.3	Aufarbeitung	13
2.4	Proteinbestimmung	15
2.5	SDS-Gelelektrophorese.....	15
2.6	Western Blot	17
2.7	Reaktionen am Western Blot	19
2.8	Densitometrische Messung der Banden.....	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Datierung des Zyklustages.....	25
3.2	Vergleich der Antikörper	27
3.3	Progesteronrezeptor-Isoformen.....	28
3.3.1	T47D-Zellen.....	28
3.3.2	Humanes Endometrium.....	30
3.3.3	Verteilung im Zyklus	31
3.3.4	Verteilung in den Zellkompartimenten	43
3.3.5	Verteilung in verschiedenen Zelltypen.....	45
3.4	Beeinflussung durch unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden	66
3.4.1	Endometrium.....	66
3.4.2	T47D-Zellen.....	69
4	Diskussion	72
4.1	Isoformen des Progesteronrezeptors	72
4.1.1	Spezifität der Antikörper.....	72
4.1.2	Nachweis des PR-C.....	73

4.1.3	Funktion der Isoform C	75
4.1.4	PR-C im humanen Endometrium	76
4.1.5	Unsere Ergebnisse der Regulation von PR-C	79
4.1.6	Wirkungsmechanismus von PR-C in humanen Geweben	80
4.1.7	PR-C in humanen Geweben	80
4.1.8	PR-C in anderen Spezies	81
4.1.9	Andere Thesen.....	82
4.1.10	Weitere verkürzte Progesteronrezeptor-Proteine in Brustkrebszellen	83
4.2	Regulation der Isoformen im Endometrium.....	83
4.2.1	Literaturvergleich	83
4.2.2	Unsere Ergebnisse	86
4.3	Mögliche klinische Relevanz	87
4.3.1	Endometriose.....	87
4.3.2	Endometriumkarzinom.....	89
4.3.3	Mammakarzinom	91
5	Zusammenfassung	94
6	Anhang	97
7	Literaturverzeichnis	103

1 Einleitung

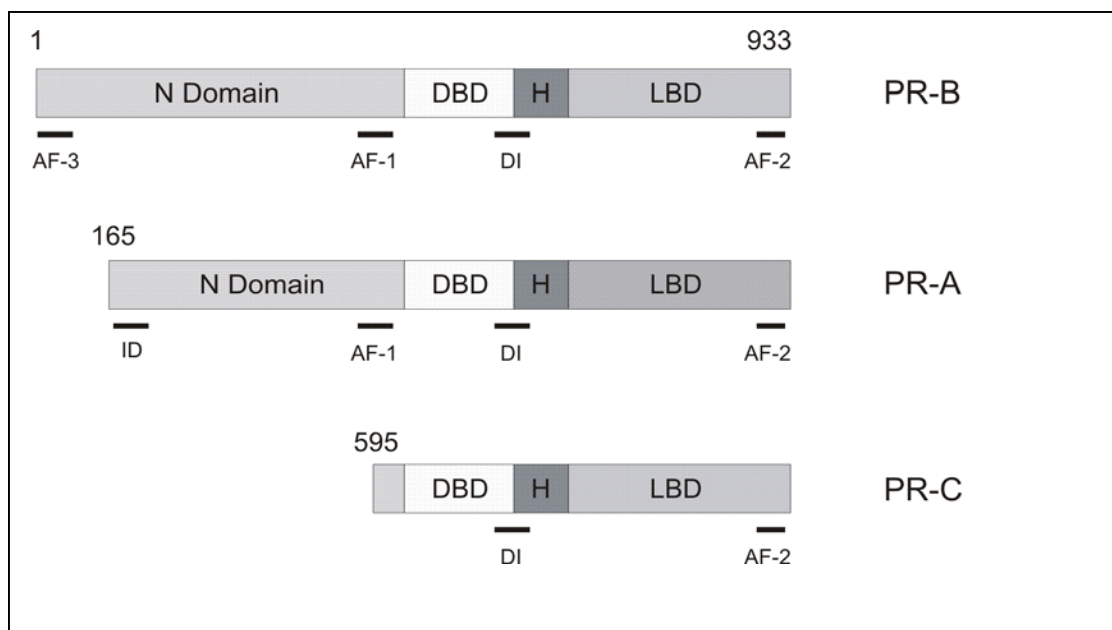
Es gibt viele verschiedene Faktoren, die die Entstehung und Austragung einer Schwangerschaft beeinflussen und mit denen sich die Reproduktionsmedizin beschäftigt. Einer der wichtigsten ist ein entsprechendes Endometrium, das eine erfolgreiche Implantation der Blastozyste und eine plazentare Umwandlung möglich macht. Mit der Zellbiologie des Endometriums, dessen Rezeptoren und spezifischen Proteinen wie zum Beispiel Uteroglobulin sowie Implantationsmarkern beschäftigt sich unser Institut schon seit Jahren. So wurden extrazelluläre Matrixbestandteile, Implantationsmarker und Hormonrezeptoren identifiziert und charakterisiert (Beier und Beier-Hellwig 1998; Classen-Linke et al. 1998; Hey et al. 1999; Classen-Linke et al. 2000; Alfer 2000).

Die zyklischen Veränderungen, denen das Endometrium unterliegt, werden durch die Hormone Östrogen und Progesteron gesteuert. Vor allem in der zweiten Zyklushälfte, in der die sekretorische Umwandlung und eventuell die Implantation erfolgt, überwiegt das Hormon Progesteron.

Um die Wirkung von Progesteron zu begreifen, muss man die Rezeptoren verstehen, über die dessen Wirkung vermittelt wird. Diese gehören zur Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren, welche im Zytoplasma lokalisiert sind und nach Bindung ihres Liganden die Gentranskription im Zellkern regulieren. Für den menschlichen Progesteronrezeptor sind zwei Isoformen beschrieben worden: PR-B und PR-A (Horwitz und Alexander 1983), die sich in ihrer Größe unterscheiden. PR-B besteht aus 933 Aminosäuren, während PR-A eine verkürzte Form ist, der die ersten 164 Aminosäuren am N-Terminus fehlen. PR-B und PR-A sind Produkte eines einzelnen Gens und werden unter der Kontrolle von eigenen Promotern von unterschiedlichen Messenger RNAs translatiert (Kastner et al. 1990b). Dieses Gen befindet sich auf dem Chromosom 11 q22-23 (Rousseau-Merck et al. 1987; Mattei et al. 1988).

In den letzten Jahren fanden sich vermehrt Publikationen, in denen weitere Isoformen des Progesteronrezeptors erwähnt wurden. So wurde zum Beispiel von Wei und Miner (1994) eine dritte Isoform - genannt PR-C - in T47D Zellen nachgewiesen. Diese hatte

ein Molekulargewicht von 60 kDa und war eine um 594 Aminosäuren am N-Terminus verkürzte Isoform. Für diese Isoform konnte eine Bindung von Progesteron und eine darauf folgende Lokalisation in den Zellkern nachgewiesen werden, wie auch für die beiden bekannten größeren Isoformen PR-B und PR-A (Wei et al. 1996). In weitergehenden Untersuchungen konnte eine Bildung von Dimeren mit PR-B sowie eine mit der von PR-B und PR-A vergleichbare Reaktion auf die Behandlung mit verschiedenen Hormonen nachgewiesen werden (Wei et al. 1997). Da dieses Protein eine am N-Terminus stark verkürzte Form des Progesteronrezeptors darstellt, kann es nur durch Antikörper erkannt werden, welche am C-Terminus binden. In den meisten Studien, die in den folgenden Jahren zu den Isoformen des Progesteronrezeptors veröffentlicht worden sind, wurden allerdings Antikörper verwendet, die am N-Terminus binden. Dies geschah vor allem deswegen, da es hierdurch möglich war, zwischen den Isoformen PR-B und PR-A zu unterscheiden und deren unterschiedliche Expressionen und auch Funktionen herauszuarbeiten.



DBD = DNA bindende Domäne

H = Hinge Region

LBD = Liganden bindende Domäne

AF = Aktivierungsfunktion

ID = Inhibierende Domäne

DI = Dimerisierungs Domäne

Abb. 1: Domänen des Progesteronrezeptors abgewandelt nach Leonhardt, Boonyaratanakornkit and Edwards (2003), Isoform C hinzugefügt nach Misao et al. (2000)

Ob die in T47D Zellen beschriebene Isoform PR-C auch in anderen Geweben vorkommt, in denen der Progesteronrezeptor exprimiert wird, ist bisher nicht ausreichend untersucht worden.

Bei der Verwendung von Antikörpern, welche am C-Terminus binden, wurden in anderen Studien zum Beispiel im Western Blot mehr als die beiden Isoformen PR-B und PR-A nachgewiesen. Die Expression von PR-C wurde durch Schams et al. (2003) im Brustgewebe und im Endometrium des Rindes beschrieben; Ogle (2002) führte genauere Untersuchungen zur Regulation dieser Isoform in Ovarien von Ratten durch. In anderen Studien, beispielsweise zur Regulation der Progesteronrezeptor-Isoformen in humaner Dezidua, wurden im Western Blot mehrere Banden nachgewiesen und alle als Isoformen des Progesteronrezeptors bezeichnet (Goldman et al. 2005).

Prinzipiell ist es durchaus vorstellbar, dass mehr als zwei Isoformen des Progesteronrezeptors existieren, da in verschiedenen Studien der Nachweis diverser mRNAs erbracht werden konnte und diese nach der Translation auch zu verkürzten Proteinen führen könnten (Misao et al. 1998). Zum anderen ist es möglich, dass Formen des Progesteronrezeptors existieren, die vom klassischen Typ des Steroidhormonrezeptors abweichen. Nicht alle beobachteten Wirkungen von Progesteron können durch die beiden Isoformen des Progesteronrezeptors erklärt werden. So konnte zum Beispiel eine schnellere Wirkung des Progesterons nachgewiesen werden, die nicht über den klassischen Weg laufen kann, da die Transkription von Zielgenen eine längere Zeit beansprucht als beispielsweise die Öffnung von Ionenkanälen. Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen wären membranständige Progesteronrezeptoren, wie sie inzwischen in der zytoplasmatischen Membran von Spermien nachgewiesen werden konnten (Luconi et al. 1998). Da der Isoform PR-C die DNA-Bindungsdomäne fehlt, kann man vermuten, dass diese ihre Wirkung über nicht-klassische Wege vermittelt.

Wenn in normalen Geweben mehr als die zwei Isoformen B und A exprimiert werden, könnte das zu veränderten Reaktionen auf Progesteron führen als normalerweise beobachtet. Eine detaillierte Analyse der exprimierten Isoformen könnte die verschiedenen Reaktionen der Gewebe auf Progesteron erklären.

In dieser Arbeit wurde deshalb die Expression der Isoform PR-C im humanen Endometrium untersucht und deren Regulation in verschiedenen Zellkompartimenten und Zelltypen über den Verlauf des Zyklus erforscht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte in Zusammenarbeit mit folgenden Frauenkliniken: Universitätsklinikum Aachen, Leitung: Prof. Dr. W. Rath, St. Antonius-Hospital Eschweiler, Leitung: Prof. Dr. C. Karl, Marienhospital, Leitung: Prof. Dr. M. Kusche, Luisenhospital, Leitung: Dr. D. Crommelinck. Hierdurch hatten wir die Möglichkeit, im Rahmen von Hysterektomien direkt nach der Entfernung aus dem Cavum uteri Endometrium zu gewinnen.

Die Endometriumproben stammen aus Uteri von Frauen mit regelmäßigem Zyklus, welche unter keinerlei hormoneller Therapie standen und sich seit mindestens einem Jahr keiner Abrasio unterzogen hatten. Die Entnahme der Gewebeproben zu Forschungszwecken aus den Uteri nach ihrer Entfernung wurde durch die Ethikkommission Nr. EK 347 genehmigt. Weiterhin wurde zur Bestimmung der Hormonwerte im Rahmen der Routinediagnostik eine Blutprobe entnommen. Die häufigsten Operationsindikationen waren ein Uterus myomatosus oder ein Descensus uteri.

Kurz nach der Hysterektomie wurde aus dem Bereich des Corpus bzw. Fundus uteri ein Gewebeblock von ungefähr 0,5 x 0,5 x 1,0cm (L x B x H) herausgeschnitten, der sowohl Endometrium als auch Myometrium enthielt. Dieser wurde sofort in Formalin fixiert und später in Paraffin eingebettet. Weiterhin wurde mit Hilfe eines Skalpells etwas Endometrium von dem darunterliegenden derberen Myometrium abgetrennt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Labor wurden die Proben bis zu ihrer Aufarbeitung bei -40°C aufbewahrt.

2.1.2 Getrennte Zellen

Diese Methode ermöglicht es, die Expression der Progesteronrezeptoren in Epithelzellen bzw. Fibroblasten zu vergleichen.

Das gewonnene Abradat wurde nicht eingefroren, sondern auf Eis aufbewahrt, bis es im Labor verarbeitet werden konnte. Hier wurde es zunächst mit Skalpellen auf einem Uhrgläschen zerkleinert, um dann mit einer Collagenase Lösung (32 mg Collagenase auf 25 ml DMEM:F12, CCpro GmbH) für 1h bei 37°C angedaut zu werden, was unter sterilen Bedingungen stattfand. Zur Vereinzelung der Zellmasse wurde das Abradat mit einer Stahlkanüle mehrfach umpipettiert, danach folgten Trennungsschritte mit Metallsieben unterschiedlicher Porengröße. Im ersten Schritt wurde ein Sieb mit einer Porengröße von 250 µm verwendet, bei dem sowohl Epithel- als auch Stromazellen filtriert wurden. Hierbei wurden größere Verbände extrazellulären Gewebes sowie Blutkoagel entfernt. Bei der Porengröße des zweiten Siebes von 35 µm verblieben nur noch die kleineren Stromazellen im Filtrat, während die größeren Epithelzellen im Sieb aufgefangen wurden. Bei Proben, die anamnestisch auf den 22. Zyklustag oder später datiert waren, erfolgte noch eine Abtrennung der dann vermehrt vorkommenden Lymphozyten. Im Folgenden wurden die vom Sieb gelösten Epithel- sowie die Stromazellen mit sterilem Medium (DMEM, CCpro GmbH) gespült und zentrifugiert, um Collagenasereste zu entfernen. Das Pellet wurde bei -40°C eingefroren.

2.1.3 Kontrolle: T47D-Zellen

Die T47D-Zellen sind eine menschliche Zelllinie, bei der es sich um Epithelzellen handelt, die aus einem duktalem Mammakarzinom gewonnen wurden; erworben wurden diese bei ATCC, Rockville, Maryland, USA. Diese Zellen sind als Kontrollzellen für Versuche zum Nachweis des Progesteronrezeptors sehr gut geeignet, da bekannt ist, dass sie alle Isoformen exprimieren. Die T47D-Zellen wurden in mit fetalem Kälberserum (FCS, Ccpro GmbH) versetzten Medium kultiviert, welches vor seiner Verwendung mit Sieben von 0,2 µm Porengröße steril filtriert wurde (Sartorius, Deutschland). Zum Abbruch einer Kultur wurde pro Kulturschale 2ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach 5 – 15 min unter mikroskopischer Kontrolle begannen die Zellen

sich zu lösen und die Reaktion des Trypsins wurde durch Zugabe von FCS gestoppt. Nach einer Zentrifugation wurde das Pellet bei -40°C eingefroren.

2.2 Datierung des Zyklustages

Zur Bestimmung des Zyklustages wurden drei Parameter herangezogen:

1. die anamnestischen Angaben der Patientinnen,
2. die Beurteilung histologischer Schnitte und
3. die Messergebnisse bestimmter Hormonwerte aus dem Serum der Patientinnen.

Die Proben, bei denen diese drei Werte nicht miteinander vereinbar waren oder die Histologie pathologisch erschien, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

2.2.1 Einteilung der Zyklusphasen

Nach Hendrikson und Kempson (1997) kann man die Unterteilung nach proliferativer und sekretorischer Phase noch in früh-, mittel- und spätproliferativ bzw. -sekretorisch präzisieren:

Frühe Proliferationsphase: 4.-7. Zyklustag

Mittlere Proliferationsphase: 8-10. Zyklustag

Späte Proliferationsphase: 11.-14. Zyklustag

Frühe Lutealphase: 15.-19. Zyklustag

Mittlere Lutealphase: 20.-23. Zyklustag

Späte Lutealphase: 24.-28. Zyklustag

Im Verlauf der Proliferationsphase entwickeln sich die zunächst kleinen und runden Drüsen zu langen und gewundenen Schläuchen, das Oberflächenepithel wird zunehmend zylindrisch. Das Stroma zeigt in der mittleren Proliferationsphase ein Ödem, nimmt aber zum Ende der Proliferationsphase an Dichte zu.

In der Sekretionsphase schlängeln sich die Drüsen vermehrt und es treten subnukleäre Vakuolen auf, welche Glykogen enthalten. Diese nehmen ab dem 18. Zyklustag wieder ab und ab dem 19. Zyklustag ist eine intraluminale Sekretion zu beobachten. Ab dem

21. Zyklustag findet sich im Stromakompartiment ein zunehmendes Ödem, welches am 22. Zyklustag sein Maximum erreicht und ab dem 23. Zyklustag als Prädezidua in Erscheinung tritt. In dieser Phase treten auch die Spiralarterien auf und die Drüsen erreichen ab dem 24. Zyklustag die typische Sägeblattform.

2.2.2 Immunhistochemische Methoden

Die histologischen Schnitte wurden HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt sowie mit Antikörpern gegen den Progesteronrezeptor und Ki67 (MIB) reagiert. Anhand der HE-Färbung ist es möglich, die Morphologie des Endometriums zu beurteilen.

Die Lokalisation des Progesteronrezeptors und die Verteilung auf Drüsen- und Stromagewebe erleichtert die Einordnung im Zyklus, ebenso der Nachweis von Ki67, einem Marker für Proliferation, der während der Proliferationsphase vor allem im Drüsengewebe eine stärkere Reaktion aufweist. Zwischen dem 11. und 14. Zyklustag erreicht die mitotische Aktivität und somit der Nachweis von Ki67 sein Maximum, in der späten Sekretionsphase ist dieser nur noch im Stroma und nicht mehr im Epithel nachweisbar.

Die immunhistochemische Reaktion erfolgte nach dem Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode. Die Gewebeschnitte wurden an einem Schlittenmikrotom der Firma Leica mit einer Dicke von 4-5 µm hergestellt und auf mit Aminopropyltriethoxysilane beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach der Entparaffinisierung in Xylol und der Rehydratisierung folgte ein Spülschritt in PBS (9,55 g ad 1l Aqua dest., pH 7,5). Die Freilegung der Bindungsstellen der Antigene erforderte eine Mikrowellenbehandlung in Citratpuffer (4,5 ml 0,1M Zitronensäure + 20,5 ml 0,1M Natriumcitrat auf 250 ml Aqua dest.) für 4 x 5 Minuten bei 600 Watt. Daraufhin wurde eine Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,3% Wasserstoffperoxyd in Methanol durchgeführt (30 Minuten bei Raumtemperatur), welche wie die nachfolgende Serumblockierung zur Vermeidung der unspezifischen Farbreaktionen dient. Für diese wurde Serum des Tieres, aus dem der Primärantikörper stammt, verwendet, in diesem Falle Serum der Maus, die Serumlösung 1A des Histostain Kits der Firma Zymed (San Francisco, USA). Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte in Verdünnung mit PBS + 1,5% BSA über Nacht, die der Sekundärantikörper, welche wiederum aus dem Zymed Kit stammten, bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Dieser an Biotin gekoppelte Antikörper reagiert mit

der im nächsten Schritt aufgebrauchten Streptavidinperoxidase, welche vier Moleküle Biotin binden kann und somit die Reaktion verstärkt. Das Enzym Peroxidase katalysiert die Reaktion mit AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Zymed), einer chromogenen Substanz, so dass ein Farbniederschlag entsteht und die durch den ersten Antikörper gebundene Struktur sichtbar wird.

Tab. 1: Liste der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Firma	Verdünnung
Progesteronrezeptor	PGR 636	Dako	1:50
Ki67	MIB-1	Dako	1:100

2.2.3 Hormonbestimmungen

Am Tag der Hysterektomie wurde bei der Blutentnahme ein zusätzliches Serumröhrchen abgenommen. Folgende Werte wurden durch das Labor der Frauenklinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Aachen (Prof. Dr. Neulen) bestimmt: Östradiol, Progesteron und LH. Anhand folgender Referenzwerte für Progesteron konnte eine Zuordnung zu den Zyklusphasen erfolgen:

Follikuläre Phase: 150-1.000 pg/ml, höchstens aber 2.000pg/ml

Luteale Phase: 5.000-18.000 pg/ml, mindestens aber 1.200pg/ml

2.3 Aufarbeitung

Die bei -40°C gelagerten Abradate wurden mit einer H-Nummer. versehen und in der Hand aufgetaut. Sofort erfolgte die Zugabe von Proteaseinhibitoren in einer fertigen Kombination (Complete mini - Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Um den größten Teil des NH_4HCO_3 entfernen zu können, wurde das aufgetaute Abradat bei 4°C und 400 g über 5 Minuten anzentrifugiert. Während des gesamten folgenden Aufarbeitungsprozesses wurden die Abradate sowie benötigte Puffer und Geräte auf Eis gelagert, um Degradationsprozesse zu verhindern.

Dem Abradat wurde TEDG Puffer hinzugegeben, welcher ebenfalls mit der entsprechenden Menge an Proteaseinhibitoren versetzt wurde. Daraufhin folgte ein

mechanischer Homogenisationsschritt zum Zerstören der Plasmamembran. Das Homogenat wurde im Folgenden bei 800 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt führte zu einer Trennung der Kerne, welche die Homogenatbestandteile sind, die am schnellsten sedimentieren und sich somit im Pellet (nuc) befanden (Cells, Kap.34, Subcellular Fractionation). Der entstehende Überstand enthielt also das Cytosol (cyt) mit den restlichen Zellkompartimenten, dieser wurde wiederum zentrifugiert, diesmal für 30 Minuten bei 4°C mit 104.000 g. Dabei wurde das Cytosol von allen anderen Kompartimenten befreit.

Das Pellet wurde in mit 0,5 Molarem Natriumchlorid versetztem TEDG Puffer gelöst und dann ebenfalls für 30 Minuten bei 4°C mit 104.000 g zentrifugiert. Bei diesem Schritt verbleiben nur noch die Moleküle im Überstand, der somit das Kernplasma darstellt.

Die Überstände des Ultrazentrifugationsschrittes (Beckmann Ultrazentrifuge) werden als Zytoplasma bzw. Nukleoplasma bei -40°C eingefroren.

TEDG Puffer: 10 mM Tris base, 1 mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, 10% Glycerol, 20 mM Natrium Molybdate, pH 7,4

Die Aufarbeitung der getrennten Zellen erfolgte nach einer anderen Methode. Dabei wurden direkt beim Auftauen des Pellets NH_4HCO_3 und Proteaseinhibitoren zugegeben. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren, was dreimal hintereinander geschah. Hier geht man von dem Prinzip aus, dass die Kristalle, die bei diesen schnellen Gefriervorgängen entstehen, die Cytoplasmamembranen der Zellen zerstören. Dann wurden die Zellen noch mechanisch homogenisiert und bei 10600 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Ü2) wurde bei - 40 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde in Lysispuffer (0,5% Triton, 300 mM NaCl und 50 mM Tris-HCl bei einem pH-Wert von 7,0 – 7,5) und Protease-Inhibitoren Complete mini (Roche) aufgenommen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand (Ü3) wurde ebenfalls bei - 40 °C eingefroren.

2.4 Proteinbestimmung

Um die Intensität der Banden im Western Blot vergleichen zu können, ist es erforderlich, von jeder Probe die exakt gleiche Menge an Protein aufzutragen. Daher schloss sich an die Aufarbeitung direkt eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) an.

Zunächst erfolgte die Erstellung einer Eichreihe, bei der man sich aufsteigender Konzentrationen von Bovinem Serumalbumin bediente. Dieses sowie 25µl der zu bestimmenden Proben wurden zunächst mit 125µl Lösung A vermischt (Bio Rad Dc Protein Assay). Hierbei verbinden sich die darin enthaltenen Kupferionen mit den Peptidbindungen der Proteine zu einem stabilen Komplex, der nach Zugabe von 1000µl Lösung B, einem Phenolreagenz, durch Reduktion eine Blaufärbung entwickelt. Die Intensität dieser Färbung korreliert direkt mit der in der Probe enthaltenen Menge an Protein und wurde bei 750 nm photometrisch gemessen (Platten Reader und Programm SLT Rainbow, beides Tecan, Crailsheim/D).

Zur Reduktion größerer Volumina wurden die entsprechenden Proben lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6, Christ, Osterode).

2.5 SDS-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte nach dem Prinzip von Laemmli (1970). Beim Herstellen eines Gels kann man durch Variation der Acrylamid-Konzentration die Auftrennung der geladenen Proteine verändern. Für die Beurteilung der Progesteronrezeptoren wurde ein 7,5%iges Gel verwendet, welches in diesem Bereich zwischen 120 und 60kDa die größten Abstände zwischen den aufzutrennenden Proteinbanden ermöglicht.

Die Trenngele wurden in einem Vertikalsystem polymerisiert, bei dem die Glasplatten einen Abstand von 750µm hatten. Sofort wurden die Gele mit Aqua dest. überschichtet, um bei der Polymerisation über Nacht keinen Sauerstoff an das Gel gelangen zu lassen; dies erfolgte bei Raumtemperatur. Danach wurde das Wasser entfernt und ein Sammelgel aufgebracht. In dieses wurde ein 15zähliger Kamm einpolymerisiert, so dass 15 Taschen zum Aufgeben der Proben entstanden.

Das sowohl im Gel als auch im Proben- sowie Elektrodenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) löst die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch Spaltung der Wasserstoffbrücken auf und führt zu einer ihrer Masse proportionalen negativen Beladung. Somit werden die Proteine ausschließlich entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Das im Probenpuffer befindliche Mercaptoethanol erzeugt durch Reduktion eine Spaltung der Disulfidbrücken in den Proteinen und führt damit zu einer Entfaltung. Zusätzlich wurden die Proben nach der Aufnahme in Probenpuffer 5 Minuten bei 100°C gekocht, wodurch ebenfalls eine Denaturierung erreicht wurde. Anschließend wurde mit einer Hamiltonspritze in jede Tasche die gleiche Menge an Protein eingefüllt. Bei jedem Gel wurde außerdem ein Bandenmarker verwendet, welcher bestimmte Moleküle enthält, deren Größe bekannt ist. Die Marker stammten von der Firma Amersham Biosciences (Rainbow Markers) bzw. Fermentas. Somit lassen sich die in der Antikörperreaktion nachgewiesenen Proteine einordnen.

Zur elektrophoretischen Trennung wurden die Gele in den Glasküvetten in die Pufferkammer eingesetzt, so dass sie unmittelbaren Kontakt zum Elektrodenpuffer hatten. Bei einer Spannung von 500 V und einer maximalen Stromstärke von 80 mA dauerte dies 1,5 bis 2 Stunden.

7,5% homogene SDS-Gele		Sammelgel		Stopgel	
40% Acrylamid	2250 µl	40% Acrylamid	800 µl	40% Acrylamid	100 µl
H ₂ O	6995 µl	H ₂ O	5570 µl		
Trenngel- puffer	2620 µl	Sammelgel- puffer	524 µl	Trenngel- puffer	400 µl
10% SDS	108 µl	10% SDS	57 µl		
Temed	9 µl	Temed	7 µl	Temed	2,5 µl
10 % Per**	20 µl	10% Per	35 µl	10% Per	10 µl

* Natriumdodecylsulfat

**Ammoniumperoxodisulfat

Trenngelpuffer	Probenpuffer	Elektrodenpuffer
20 g Tris (1,65 M)	0,378 g Tris (0,0625 M)	12,12 g Tris (0,025 M)
50ml H ₂ O	5,0 ml Glycerin (10%)	57,60 g Glycin (0,192 M)
mit 6 N HCL pH 8,8	2,5 ml Mercaptoethanol (5%)	4,0 g SDS (0,1%)
ad 100 ml H ₂ O	1,5 g SDS (3%)	ad 4000 ml H ₂ O
	pH 6,8	
	ad 50 ml H ₂ O	
	1 mg Bromphenolblau	

2.6 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots beruht darauf, die im Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine immobilisierende Membran zu transferieren. Auf der Oberfläche dieser Membran sind die Proteine für Antikörper frei zugänglich.

Hier wurde das Semidry-Blotting Verfahren mit einem diskontinuierlichen Puffersystem angewandt, bei dem zwei horizontal angeordnete Graphitplatten als Elektroden dienten. Das diskontinuierliche Puffersystem wurde mit Filterpapier hergestellt, das in den entsprechenden Pufferlösungen äquibriert wurde. Bei der Blotfolie handelte es sich um eine PVDF Membran (Immobilon-P, Porengröße 0,45µm, Millipore Corporation, USA). Diese wurde vor dem Aufbau des Blotters mit Methanol benetzt, um ihre Aufnahmefähigkeit für die Proteine zu erhöhen. Dabei wurden die Membran und die Filterpapiere auf die Größe des Gels zugeschnitten (ca. 13x17cm).

Zwischen den Elektrodenplatten gestaltete sich der Aufbau des Blots folgendermaßen: Auf die Anode wurden zwei in Anodenpuffer 1 (AP 1) getränkte Filterpapierblätter gelegt. Darauf folgte ein Blatt Filterpapier, welches zuvor in Anodenpuffer 2 (AP 2) eingelegt worden war und die Membran. Das Aufbringen des in Anodenpuffer 2 äquibrierten Gels erfolgte ohne Verschieben und unter der Vermeidung von Luftblasen. Zuletzt wurden auf dem Gel drei Blätter Filterpapier getränkt in

Kathodenpuffer (KP) sowie die als Kathode dienende zweite Graphitplatte angeordnet. Die Anodenpuffer 1 und 2 unterscheiden sich durch unterschiedliche Gehalte an Tris, der Kathodenpuffer enthält zusätzlich Capronsäure.

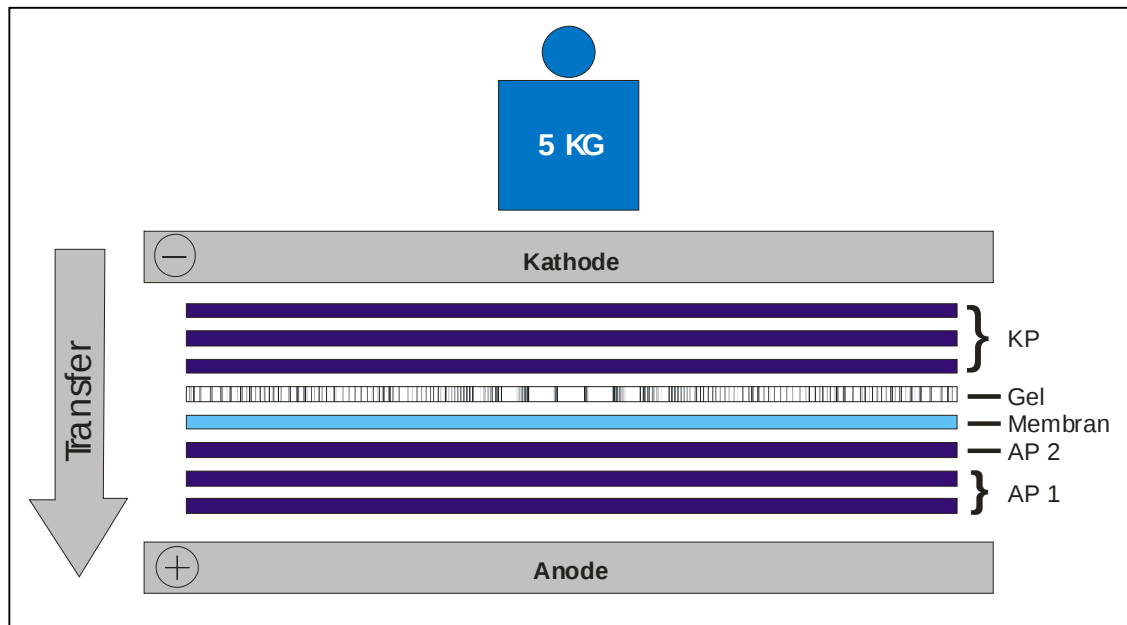


Abb. 2: Blotaufbau

Der Transfer dauerte 40 Minuten und wurde bei einer Spannung von 40 Volt und einer Stromstärke von 0,7-1,3 Ampère durchgeführt. Das Gewicht auf der Kathodenplatte verursachte ein seitliches Herausdrücken der Elektrolysegase; die Temperatur wurde bei 15°C gehalten.

Nach dem Blotting wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit Blockierungs-Puffer (TBS + 0,1% Tween + 5% Milcheiweiss) inkubiert, was erforderlich ist, um die unbesetzten Bindungsstellen zu blockieren, die nicht an der nachfolgenden Immunreaktion teilnehmen sollen.

Kathodenpuffer	Anodenpuffer 2	Anodenpuffer 1
3,03 g Tris (25mM)	3,03 g Tris (25mM)	36,34 g Tris (0,3M)
5,20 g ϵ -Amino-Caprinsäure (40mM)		
200 ml Methanol (20%)	200 ml Methanol (20%)	200 ml Methanol (20%)
ad 1000 ml H ₂ O	ad 1000 ml H ₂ O	ad 1000 ml H ₂ O

TBS + 0,1% Tween: 0,61g Tris (5mM) + 7,65g Natriumchlorid (0,13mM)

+ 1000ml Aqua dest. pH 7,6

+ 1ml Tween

2.7 Reaktionen am Western Blot

Nach einem kurzen Abspülen der Blockierungslösung unter gereinigtem Wasser wurde der 1. Antikörper, der in 5% Milchpulver TBS Tween gelöst wurde, aufgebracht. Diese Inkubation sowie die folgende mit dem Sekundärantikörper dauerte jeweils eine Stunde und erfolgte bei Raumtemperatur. Zwischen den Antikörperreaktionen sowie vor der Reaktion mit ECL wurde die Membran immer mindestens eine halbe Stunde mit TBS+0,1%Tween gespült. Der Sekundärantikörper wurde in 1% Milchpulver auf TBS+0,1%Tween gelöst und ist an Meerrettichperoxidase gekoppelt, die dann mit dem Substrat des Detektionsreagenz reagiert. Hierfür wurde ECL bzw. ECL plus verwendet (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Biosciences, USA). Das in ECL plus enthaltene Substrat ist PS-3 Acridan, welches durch die Meerrettichperoxidase (MRP) oxidiert wird und dazu führt, dass pro Minute tausende Acridiniumester entstehen. Die Acridiniumester produzieren ein sehr intensives Licht von längerer Dauer als bei der Luminolreaktion beim ECL.

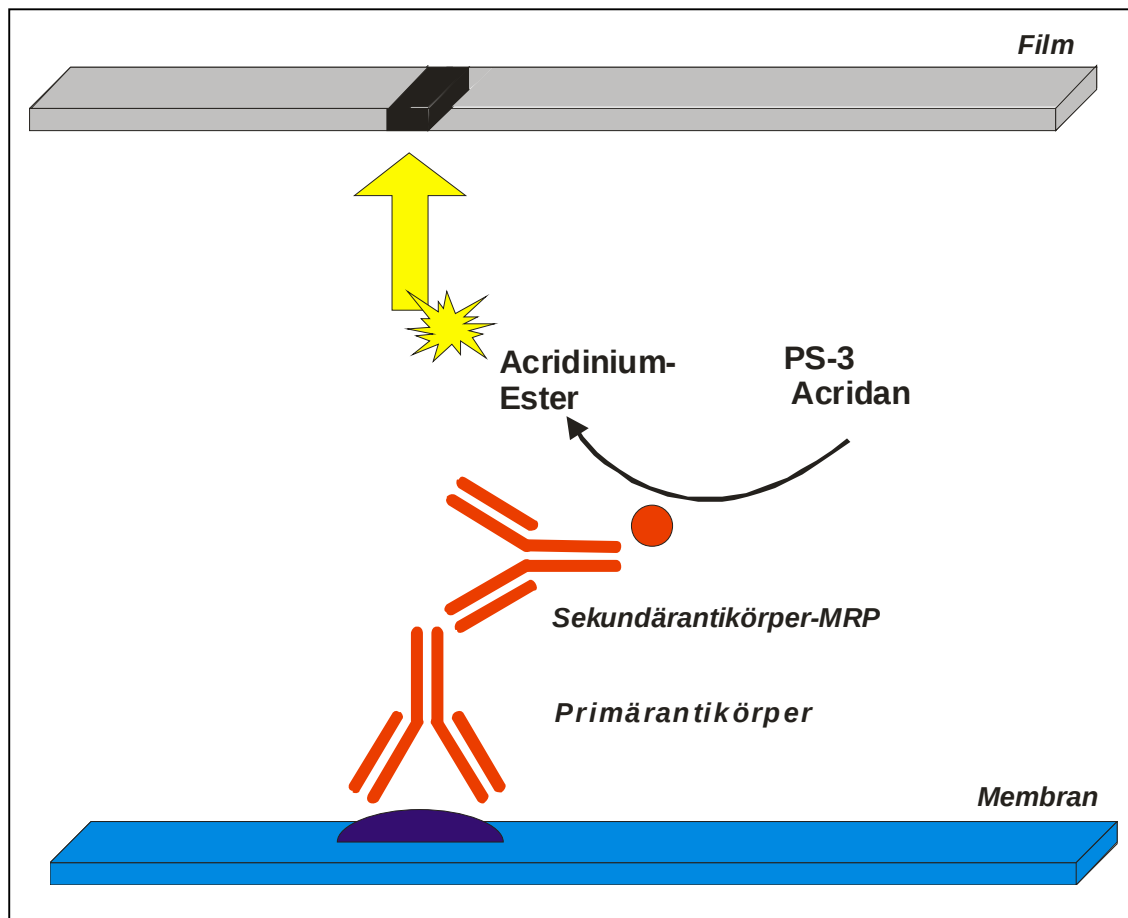


Abb. 3: ECL plus Reaktion

Die Membran wurde mit Saranfolie bedeckt und die Intensität der Lichtemission durch Auflage von Filmen (X-OMAT UV Film, Kodak, Frankreich) in einer Filmkassette (Hypercassette, Amersham, UK) gemessen. Diese korreliert dann mit der Menge an im aufgetragenen Abradat vorhandenen Progesteronrezeptors.

Zur Bestimmung der Beta-Aktin Menge in den aufgetragenen Proben wurde die Membran im Anschluss an die Detektion der Progesteronrezeptoren für 45 min mit dem Anti-Beta-Aktin Antikörper inkubiert. Dabei wurde eine Konzentration von 1:50.000 in TBS Tween verwendet. Der Sekundärantikörper Anti-Mouse wurde über eine Zeit von 25 min mit einer Konzentration von 1:5.000 aufgebracht. Beta-Aktin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, das einen Rückschluss auf die aufgetragene Menge erlaubt, da es eine gleichmäßige Verteilung aufweist. Diese ist im Gegensatz zur

Coomassie-Färbung densitometrisch messbar und somit mit den gemessenen Intensitäten des Progesteronrezeptors verrechenbar. Dadurch können Ungenauigkeiten in der Auftragung kompensiert werden.

Die Filme wurden entwickelt und eingescannt. Die Membran wurde mit Coomassie gefärbt, um die gesamten Proteine sowie die nicht farbigen Marker sichtbar zu machen. Zuletzt wurde die Membran noch kurz entfärbt, um das nicht an Protein gebundene Coomassie zu entfernen.

Coomassie für Membranen

2,5 g Coomassie G (Serva Blue G)
454 ml Methanol
454 ml Essigsäure
92 ml H₂O

Entfärber für Membranen

490 ml Methanol
490 ml H₂O
20 ml Essigsäure

Tab. 2: *Verwendete Antikörper im Western Blot*

Primärantikörper	Klon	Terminus	Spezies	Firma	Verdünnung
Monoklonal					
Progesteronrezeptor	PR10A9	C	Mouse	Coulter Immunotech	1: 6000
Progesteronrezeptor	MAB462	C	Mouse	Chemicon	1: 4000
Progesteronrezeptor, Isoform B+A, Ab-8	hPRa2+ hPRa3	N	Mouse	NeoMarkers, USA	1:200
Progesteronrezeptor, Isoform B, PR Ab 6	hPRa 6	N	Mouse	NeoMarkers, USA	1:200
Progesteronrezeptor, Isoform A, PR Ab 7	hPRa 7	N	Mouse	NeoMarkers, USA	1: 100
Beta-Aktin	Ab6276	N	Mouse	Abcam, UK	1:50.000
Sekundärantikörper					
goat anti mouse				DAKO	1: 10.000

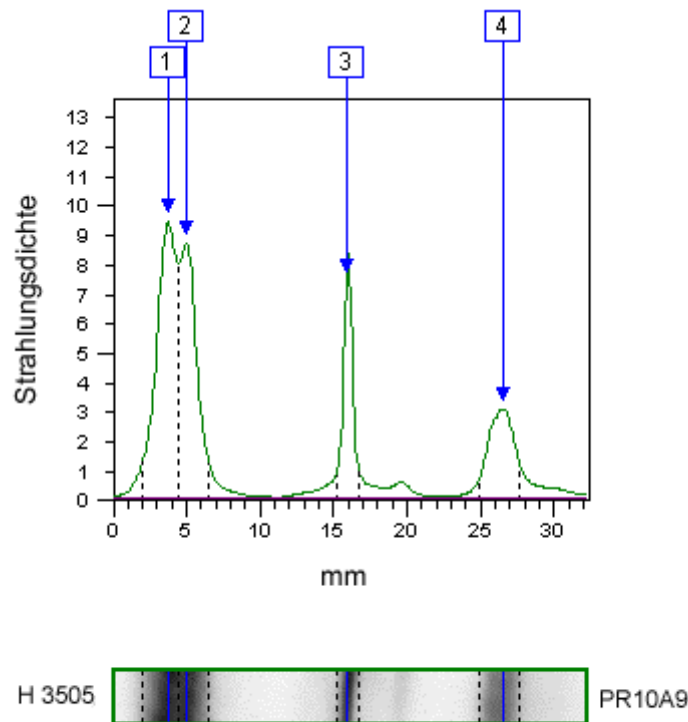
Die Antikörper PR10A9 und MAB462 binden an die identische Sequenz am Progesteron Rezeptor: 922AGMVKPLLFHKK933.

2.8 Densitometrische Messung der Banden

Um die Intensität der Banden und damit die Menge an exprimiertem Progesteronrezeptor quantitativ auswerten zu können, erfolgte eine densitometrische Messung. Dabei kann man immer nur Banden auf einem Film miteinander vergleichen. Daher wurden zu jedem untersuchten Merkmal Gele erstellt, auf denen maximal zwölf Proben beispielhaft das Ergebnis darstellen.

Die entwickelten Filme wurden mit dem Programm Labscan eingescannt. Dazu wurde ein Scanner der Firma Amersham Biosciences verwendet.

Die densitometrische Messung der Banden erfolgte mit dem Programm Image Master 1D Elite, Version 4.20 von Amersham Biosciences. Die gemessenen Daten wurden zur Veranschaulichung mit Microsoft Excel graphisch dargestellt.



Die Abbildung zeigt die erste Spur aus dem Gel zum Vergleich der Antikörper. Auf dieser wurde der Antikörper PR10A9 verwendet. Über die zu messende Spur wurde ein Fenster gelegt, in dem das Programm Image Master 1D automatisch die Banden erkennt. Die photometrisch gemessene Dichte wird graphisch dargestellt und das Volumen unter der Kurve ausgerechnet. Dieses korreliert direkt mit der Menge an nachgewiesenem Protein.

1+2 PR-B bei 114 kDa

3 PR-A bei 94 kDa

4 PR-C bei 65 kDa

Abb. 4: Densitometrische Messung der Banden

3 Ergebnisse

3.1 Datierung des Zyklustages

Zur endgültigen Festlegung des Zyklustages einer Probe wurden neben den anamnestischen Angaben der Patientin die Serumwerte für LH, Östradiol und Progesteron herangezogen. Diese wurden durch das Labor der Frauenklinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Aachen (Prof. Dr. Neulen) bestimmt. Die Liste mit den Messwerten der Hormone für die einzelnen Proben findet sich im Anhang. Außerdem wurde eine immunhistochemische Reaktion mit Antikörpern gegen den Progesteronrezeptor und den Proliferationsmarker MiB sowie eine HE-Färbung erstellt. Dabei handelt es sich um eine erweiterte histologische Bestimmung nach Noyes et al. (1950). Die eingefügten Bilder sind beispielhafte Ergebnisse der histologischen Färbungen. Auf diese Art ist durch erfahrene Untersucher eine Datierung der Proben mit einer Genauigkeit von ± 1 Zyklustag möglich (Classen-Linke, Habilitation 2000).

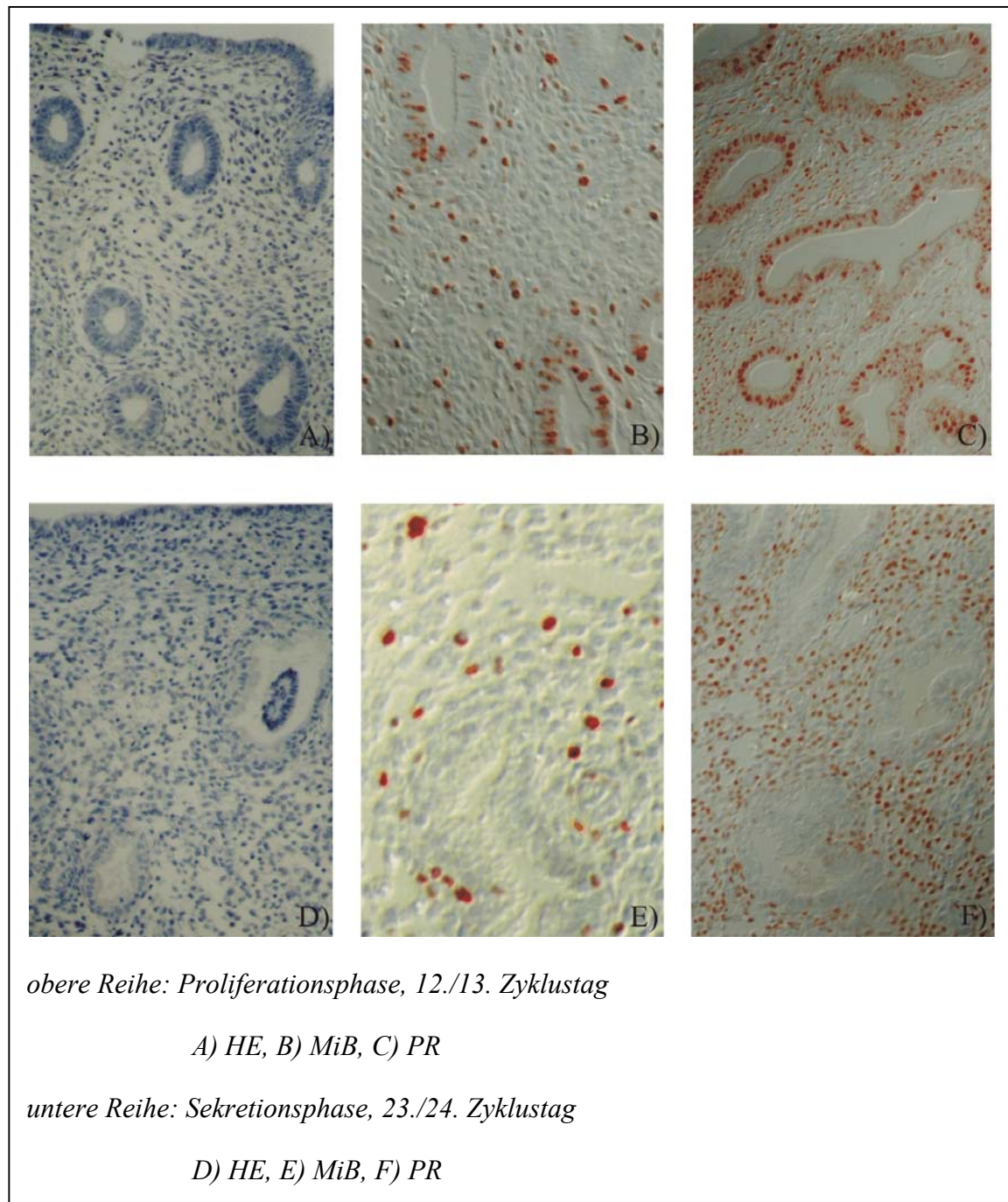


Abb. 5: verwendete Färbungen zur Datierung des Zyklustages

Anhand der HE-Färbung lässt sich schon erkennen, wie weit das Endometrium aufgebaut ist und ob sich schon Merkmale der Sekretionsphase zeigen, wie zum Beispiel Spiralarterien oder die Präzidualisierung. In der Proliferationsphase zeigt die Reaktion mit dem Antikörper gegen den Proliferationsmarker MiB sowohl in den Epithelzellen als auch in den Stromazellen eine starke Anfärbung. In der

Sekretionsphase findet sich eine deutliche Verschiebung der Anfärbung für diesen Proliferationsmarker zugunsten der Stromazellen. Der Progesteronrezeptor zeigt in der Proliferationsphase eine deutliche Expression in den Epithelzellen, in der Sekretionsphase werden diese negativ, in den Stromazellen ist der Progesteronrezeptor jedoch weiterhin stark exprimiert.

3.2 Vergleich der Antikörper

Für die Immunreaktion am Western Blot wurden verschiedene Antikörper verwendet. Zum direkten Vergleich wurden alle monoklonalen Antikörper an jeweils einer Spur der Abradatprobe vom 19. Zyklustag (H3505) verwendet, welche auf einem Gel mehrfach aufgetragen und demnach unter den gleichen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet wurde.

Der Antikörper PR10A9 ist gegen die letzten zwölf Aminosäuren am Carboxyterminus des menschlichen Progesteronrezeptors gerichtet: 922AGMVKPLL FHKK933. Daher ist er fähig, alle am N-Terminus verkürzten Isoformen zu erkennen. Auf dem Immunoblot sind drei Banden sichtbar: Die Isoform B bei 114 kDa, die Isoform A bei 94 kDa (Horwitz und Alexander 1983) und ein Protein zwischen 60 und 70 kDa. Diesen Antikörper haben wir im Folgenden für die Analyse der Progesteronrezeptor-Isoformen verwendet.

Der Antikörper MAB462, der in der zweiten Spur verwendet wurde, hat am C-Terminus exakt die gleiche Bindungssequenz wie der Antikörper PR10A9. Er lässt das gleiche Bandenmuster erkennen. Die Intensität ist zwar schwächer, dies lässt sich aber durch andere Konzentrationen des Antikörpers und die Verwendung von ECL anstelle von ECL plus erklären.

Der Antikörper Ab-8 bindet am N-Terminus des Proteins und erkennt die beiden Progesteronrezeptor-Isoformen B (bei 114 kDa) und A (bei 94 kDa).

Der Antikörper Ab-6 erkennt spezifisch die Isoform B. Die Bindungsstelle ist am N-Terminus und befindet sich innerhalb der ersten 164 Aminosäuren, da die Isoform A um diese verkürzt ist (Kastner et al. 1990b).

Der Antikörper Ab-7 erkennt in immunhistochemischen Untersuchungen spezifisch nur die Isoform A des Progesteronrezeptors (Clarke et al. 1987). Dabei bindet er an ein Epitop, das laut Mote et al. (1999) bei PR-B aufgrund einer unterschiedlichen Konformation dieses Bereiches durch die zusätzliche N-terminale Sequenz, die PR-A fehlt, dem Antikörper nicht zugänglich ist. Die Fähigkeit, spezifisch PR-A zu erkennen, ist bei der Anwendung im Western Blot nicht mehr gegeben, da die ursprüngliche Konformation des Proteins durch verschiedene Reaktionsschritte verändert wurde und die Aminosäuresequenz identisch ist. Somit erkennt der Antikörper auch die Isoform B, da er an den N-terminalen Bereich des Progesteronrezeptor-Proteins bindet.

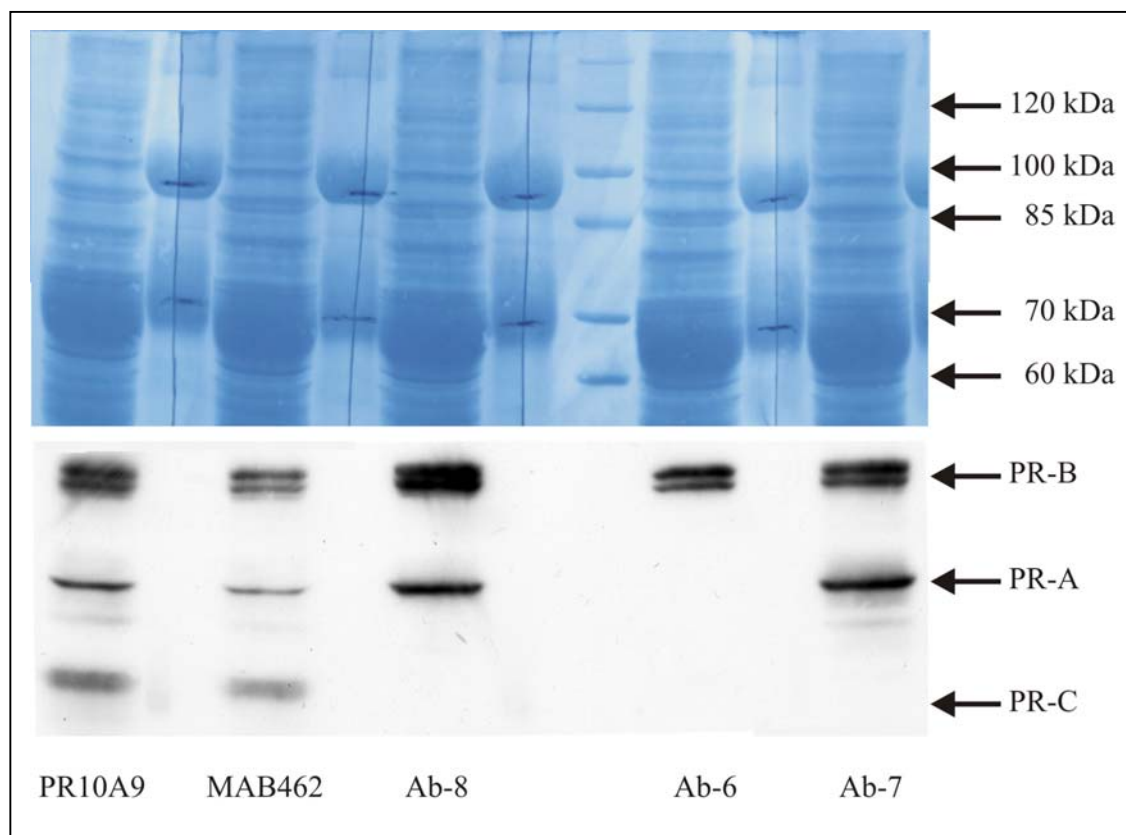


Abb. 6: Vergleich der Antikörper am Abradat H3505 vom 18./19. Zyklustag

3.3 Progesteronrezeptor-Isoformen

3.3.1 T47D-Zellen

Zu Beginn der Untersuchungen wurden als Untersuchungsmaterial T47D-Zellen herangezogen. Diese Zellen werden als Kontrollzellen verwendet, da sie die

verschiedenen Isoformen des Progesteronrezeptors in hohen Konzentrationen exprimieren. Die Methode der Aufarbeitung folgt dem Protokoll von Weigel et al. (1992), welches auch Wei und Miner (1994) zum Nachweis des PR-C in T47D-Zellen verwendet haben. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit reproduziert werden.

Rechts von dem Marker erkennt man einen Kultur-Abbruch, der wie die Abradate mit der Methode nach Weigel et al. (1992) in Zytosol und Nukleosol aufgetrennt wurde. Zwischen 60 und 70 kDa erkennt man die Bande für die Isoform C (Wei und Miner 1994). Bei der Angabe des Molekulargewichtes für diese Isoform C finden sich in der Literatur häufig voneinander abweichende Ergebnisse. Die Zahlen schwanken in einem Bereich von ca. 5 kDa. Dies könnte zum Beispiel an unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden bei unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden, der Verwendung unterschiedlicher Antikörper und auch unterschiedlicher Marker liegen. Die Intensität der Banden zeigt, dass PR-C eindeutig im Zytosol stärker exprimiert ist. Dies ist auch bei Wei und Miner (1994) derart beschrieben worden.

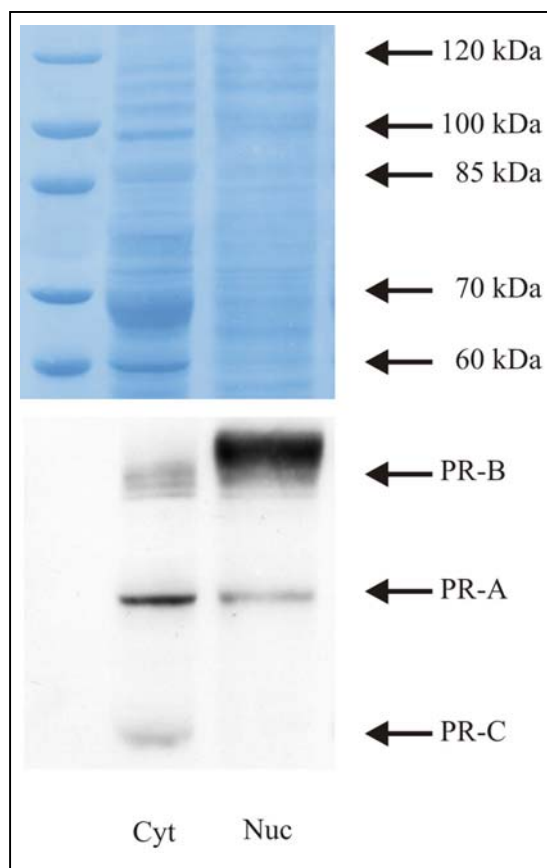


Abb. 7: T47D Zellen

3.3.2 Humanes Endometrium

Die Isoform C des Progesteronrezeptors wurde in T47D-Zellen nachgewiesen (Wei und Miner 1994). So wie diese Brustkrebszellen ist auch das Endometrium ein progesteronabhängiges Gewebe. Bisher war nicht bekannt, ob die Isoform C im menschlichen Endometrium exprimiert wird. Bereits beim Vergleich der Antikörper an einem Abradat vom 19. Zyklustag lässt sich eine Bande im Bereich von 60 bis 70 kDa nachweisen. Dies ist nur bei der Verwendung von Antikörpern möglich, die am C-Terminus des Proteins binden. Die Bande befindet sich auf der gleichen Höhe wie der PR-C, der in den T47D-Zellen nachgewiesen wurde.

Somit ist die Aussage möglich, dass sich im humanen Endometrium im Western Blot eine Bande nachweisen lässt, die der des PR-C in T47D-Zellen entspricht.

Die Möglichkeit, dass die Bande bei 65 kDa durch eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers hervorgerufen wurde, konnten wir durch einen Western Blot, bei dem der Inkubationsschritt mit dem ersten Antikörper ausgelassen wurde, ausschließen. Auch eine unspezifische Reaktion des ersten Antikörpers mit anderen Proteinen als dem Progesteronrezeptor in dem Bereich zwischen 60 und 70 kDa konnten wir durch eine Auftragung von humanem Serum ausschließen.

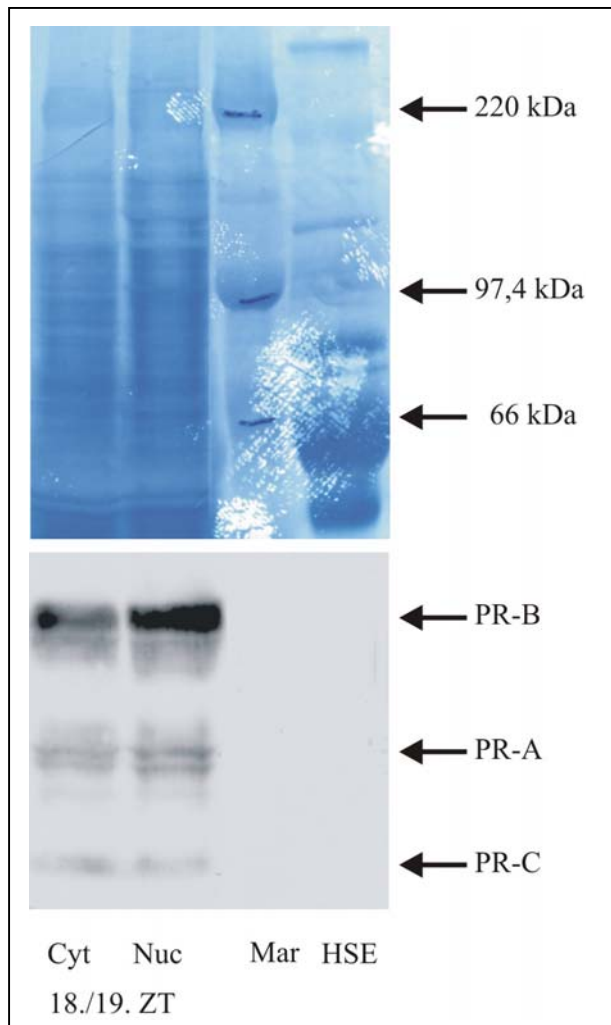


Abb. 8: Reaktion Humanes Serum (HSE), Mar=Marker

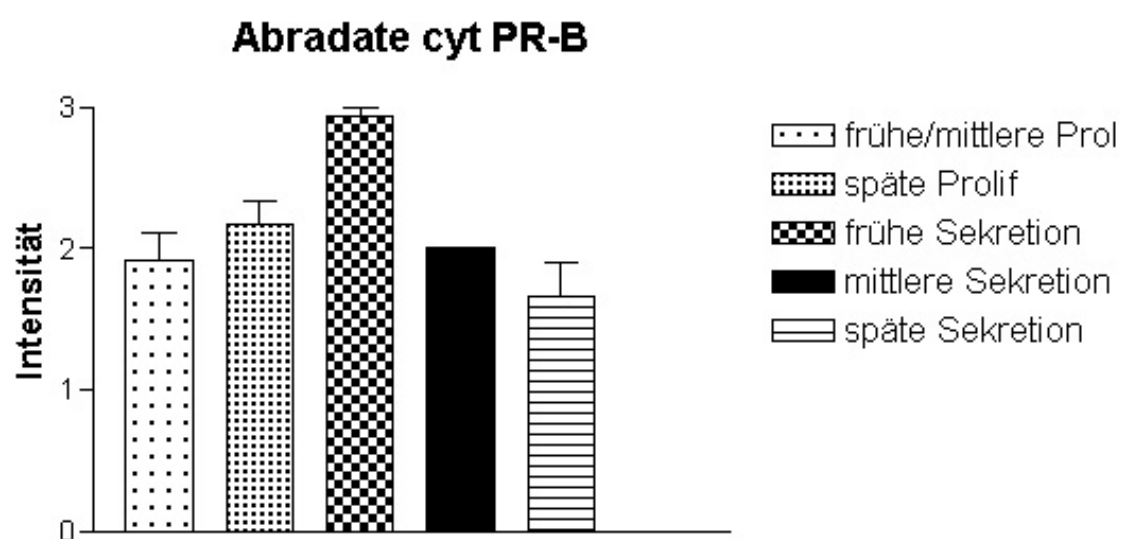
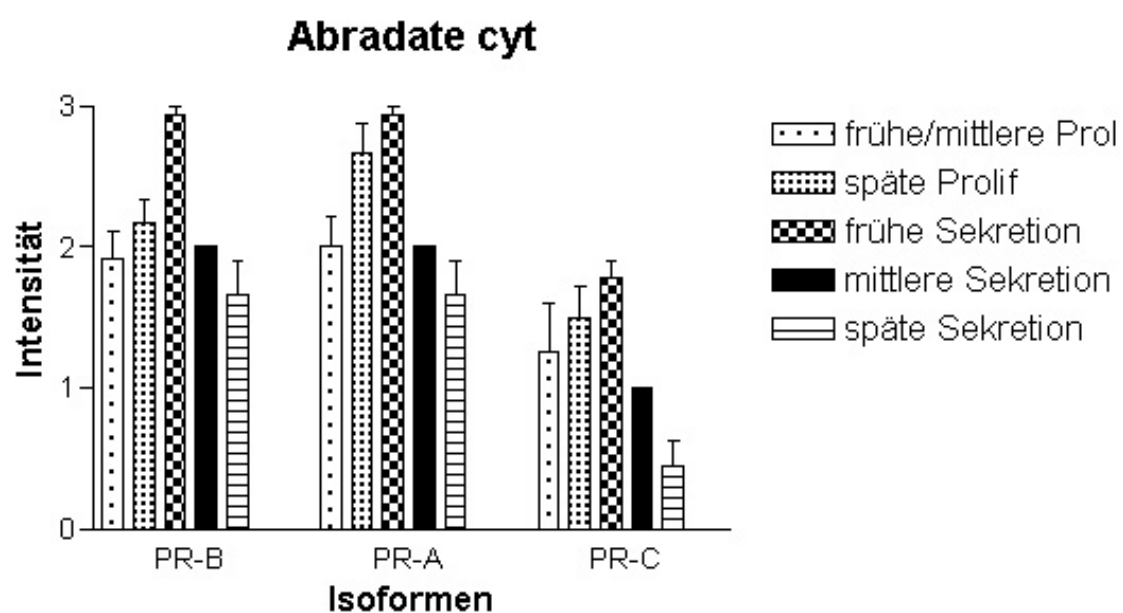
3.3.3 Verteilung im Zyklus

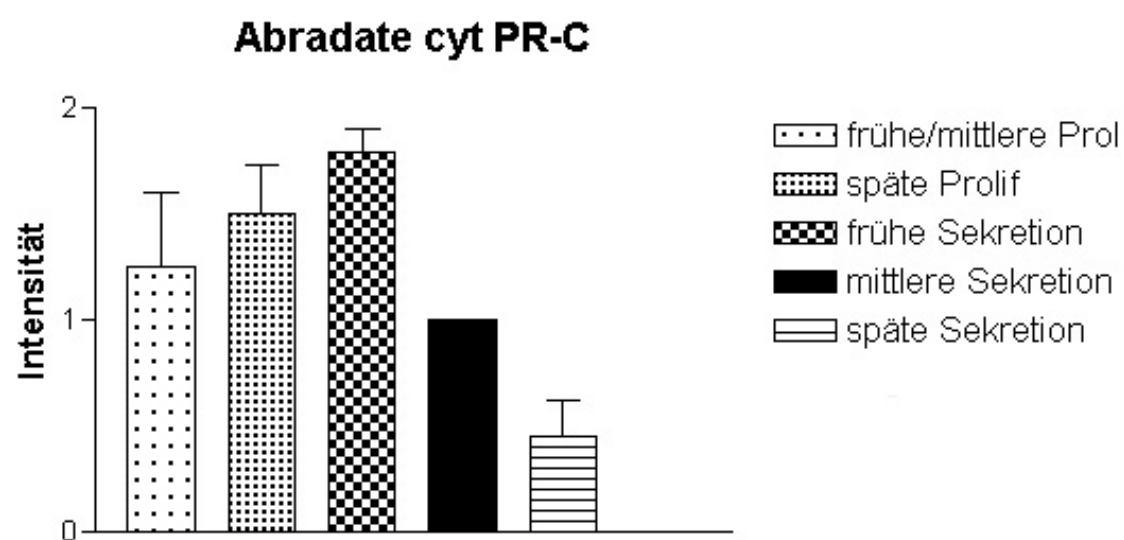
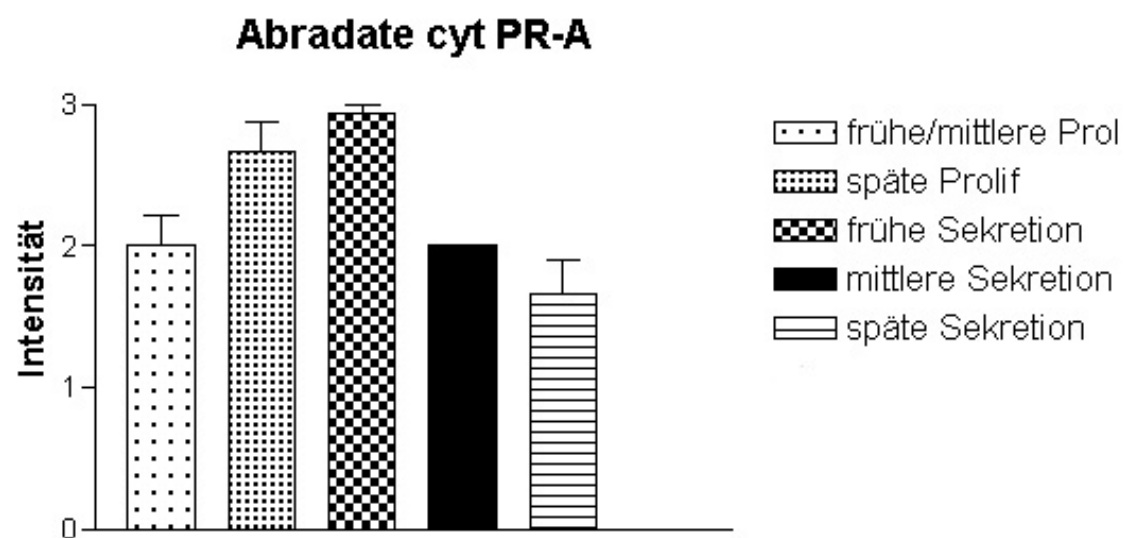
Nach Ausschluss der pathologischen Proben wurden insgesamt 46 Abradatproben in die zytosolische und die nukleäre Fraktion aufgetrennt und im Western Blot mit dem Antikörper PR10A9 untersucht. Beim Vergleich der Banden auf verschiedenen Filmen, kann man nur eine Aussage über stärkere oder schwächere Intensitäten machen. Diese Art der Beurteilung ist subjektiv und somit durch den Untersucher beeinträchtigt. Daher wurde in unserer Auswertung nur eine Skala von 0-3 verwendet. Eine 0 wurde vergeben, wenn kein Rezeptor nachweisbar war, eine 1, wenn eine schwache Bande nachweisbar war, eine 2 bei einer Bande mittlerer Intensität und eine 3 bei einer starken Bande. Bei dieser Auswertung lässt sich ein Trend erkennen, feine Unterschiede in der

Expression lassen sich nur durch eine densitometrische Messung der Banden auf einem einzelnen Gel nachweisen.

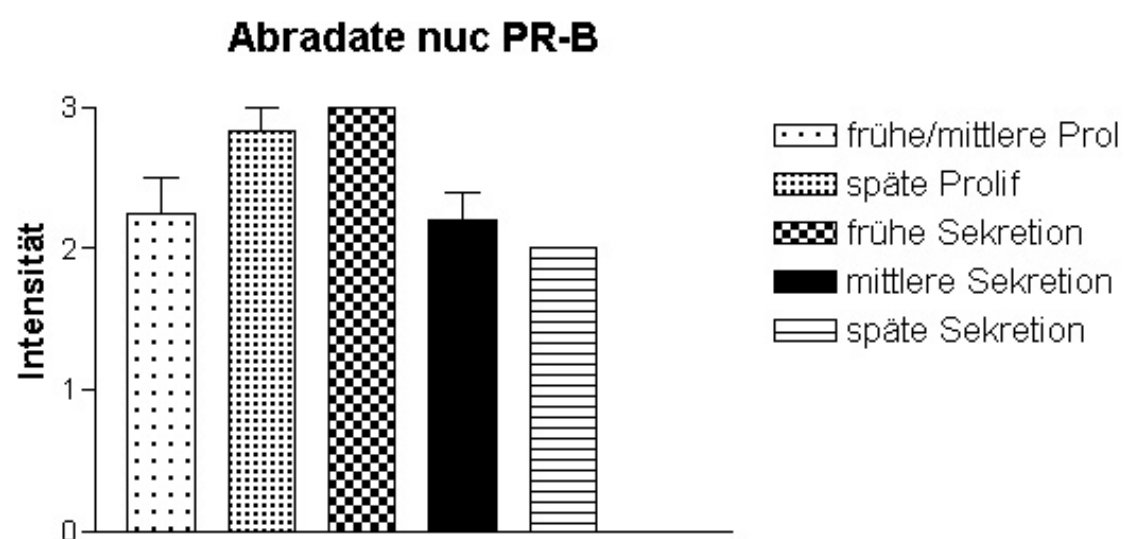
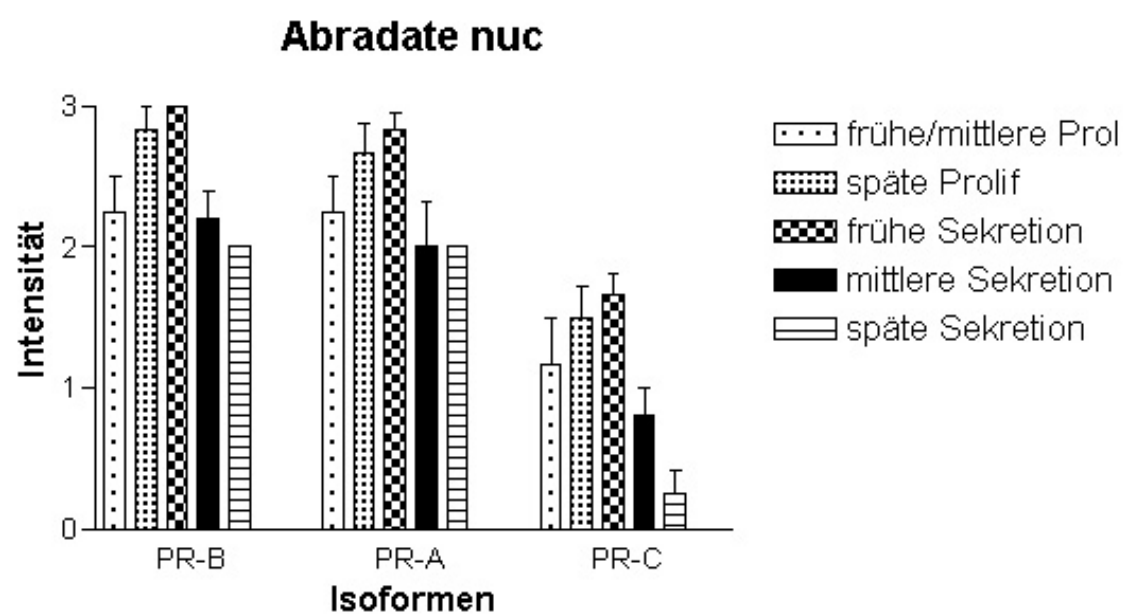
Die Ergebnisse für jede einzelne Probe sind der Tabelle Nr. 8 im Anhang zu entnehmen. Hier werden zur besseren Darstellung Graphen gezeigt, welche den Verlauf der Expression der Isoformen in den verschiedenen Fraktionen veranschaulichen. Die Abradate wurden für die graphische Darstellung in Gruppen entsprechend der verschiedenen Zyklusphasen aufgeteilt und Mittelwert sowie Standardabweichung ausgerechnet.

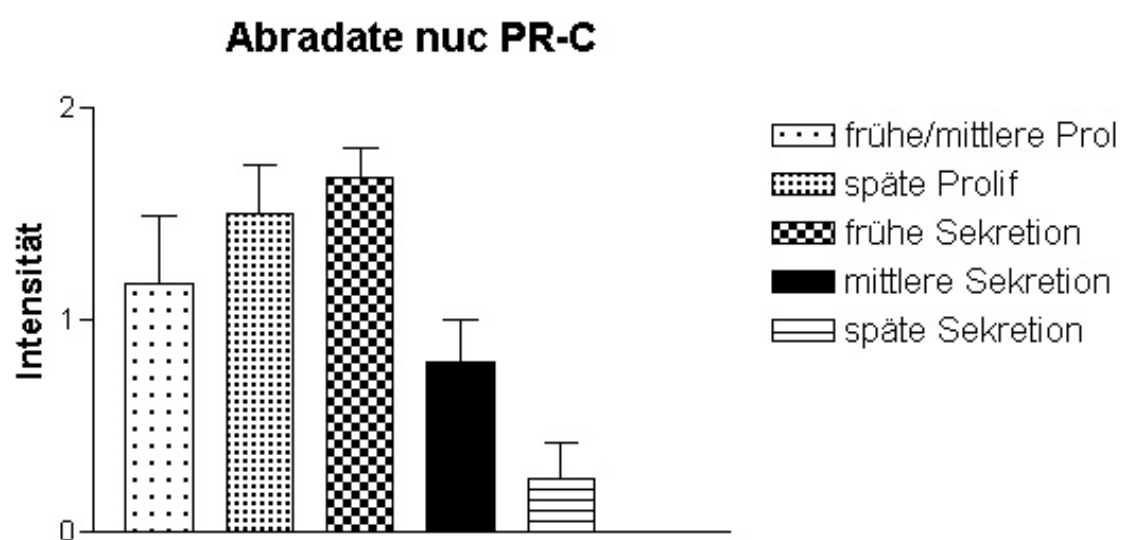
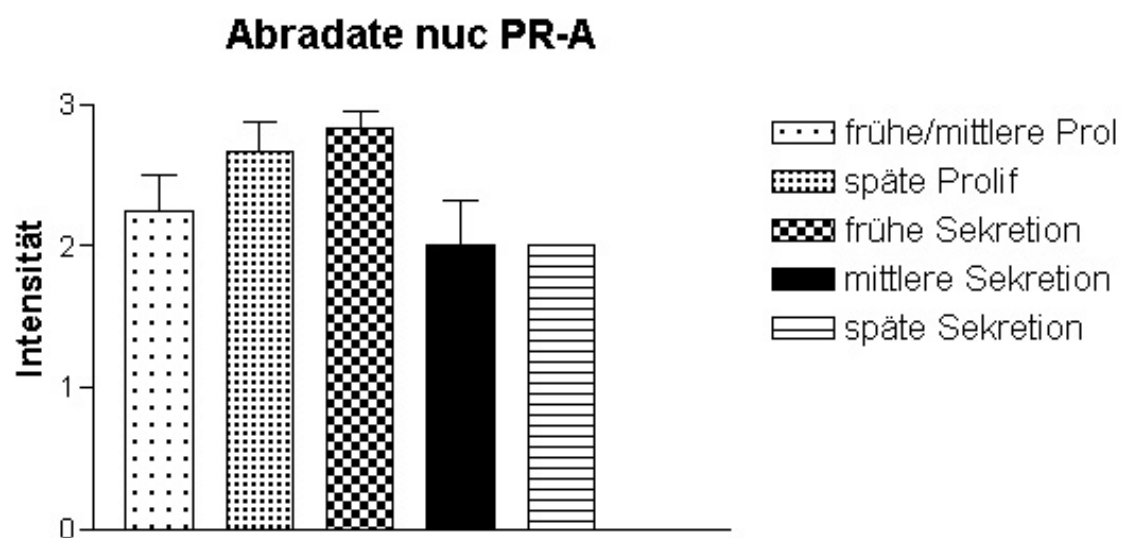
Die Beurteilung der Abradate mittels dieser Skala von 0-3 ergab für die zytosolische Fraktion eine relativ starke Expression der Isoformen B und A bereits in der frühen und mittleren Proliferationsphase. Im Verlauf der Proliferationsphase steigert sich die Expression, vor allem der Isoform A. Diese ist bereits in der späten Proliferationsphase stark exprimiert, während PR-B erst zu Beginn der Sekretionsphase eine starke Expression aufweist. PR-C hingegen weist im Zytosol in der Proliferationsphase eine mittelstarke Expression auf, welche sich in der frühen Sekretionsphase wie bei den Isoformen B und A steigert und im Verlauf der mittleren und späten Sekretionsphase wieder abnimmt. Ab dem 24./25. Zyklustag ist PR-C nicht mehr nachweisbar. Die Regulation in der Sekretionsphase entspricht der von PR-B und PR-A, welche ab dem 19./20. Zyklustag nur noch in mittlerer Intensität nachzuweisen sind. Allerdings bleibt diese auch bis zum Ende des Zyklus erhalten. In der frühen Proliferationsphase ist PR-C in einigen Abradaten gar nicht nachzuweisen. Das erklärt die erkennbare große Standardabweichung. Vom 9. bis zum 24. Zyklustag ist diese Isoform aber regelmäßig nachzuweisen, wenn auch immer in geringerer Intensität als die beiden größeren Isoformen B und A.





Im Nukleosol zeigt sich ein prinzipiell ähnliches Verteilungsmuster: Die stärkste Expression der Progesteronrezeptoren findet sich in der frühen Sekretionsphase, doch auch in der späten Proliferationsphase sind vor allem für PR-B hohe Level zu verzeichnen. Diese Isoform ist auch in der mittleren Proliferationsphase schon stark exprimiert. PR-A zeigt ein sehr ähnliches Expressionsmuster, wie bei PR-B ist in der mittleren aber vor allem in der späten Proliferationsphase die stärkste Expression nachweisbar. Mit dieser Auswertungsmethode lassen sich kaum Unterschiede zwischen PR-B und PR-A darstellen. PR-C ist wie im Zytosol durchgehend in schwächerer Intensität nachweisbar. Die stärkste Expression zeigt sich auch hier in der frühen Sekretionsphase. Im Verlauf der späten Proliferations- und frühen Sekretionsphase finden sich immer wieder einzelne Proben, in denen PR-C im Nukleosol nur sehr schwach exprimiert wird. Ab dem 19./20. Zyklustag ist PR-C durchgehend schwach exprimiert, ab dem 24./25. ist diese Isoform nicht mehr nachweisbar. PR-B und PR-A sind ab dem 22./23. Zyklustag in mittelstarker Expression nachweisbar.





Um den direkten Vergleich zwischen den Intensitäten der Banden ziehen zu können, wurde eine densitometrische Messung durchgeführt. Dabei ist es immer nur möglich, Proben, die auf einem Gel unter identischen Bedingungen reagiert haben, zu vergleichen. Daher wurden aus den 46 Abradatproben, die in Zytosol und Nukleosol aufgetrennt wurden, je elf bzw. zwölf beispielhafte Proben ausgewählt und auf ein Gel geladen.

Es lassen sich drei deutliche Banden nachweisen: PR-B bei 114 kDa, PR-A bei 94 kDa und PR-C bei 65 kDa.

Abgesehen von der Probe vom 6. Zyklustag findet sich in der späten Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase die stärkste Expression der Progesteronrezeptoren. Die Isoform C wird wie PR-B und PR-A zwischen dem 13. und dem 19. Zyklustag am stärksten exprimiert. Dabei zeigen sich allerdings erhebliche Schwankungen, da in einigen Proben auch sehr geringe Level auftreten.

Ab dem 22. Zyklustag nimmt die Progesteronrezeptor-Expression stark ab und lässt sich ab dem 26. Zyklustag nicht mehr nachweisen. Nur die Isoform A ist noch gering exprimiert. Die zwölfte Spur mit der Probe vom 26.Zt ist auf dem Film nicht mehr, auf der Coomassie-gefärbten Membran aber ebenso stark wie die anderen Proben zu erkennen. Dies zeigt an, dass von jeder Probe 30 µg Protein aufgetragen wurden, ab dem 26. Zyklustag aber so wenig Progesteronrezeptor exprimiert wird, dass dieser nicht mehr nachweisbar ist. Sehr gut ist aber auf dem Film auch die β -Aktin-Bande zu erkennen. Diese Probe ist also korrekt aufgetragen, es wird aber kein messbarer Progesteronrezeptor mehr exprimiert.

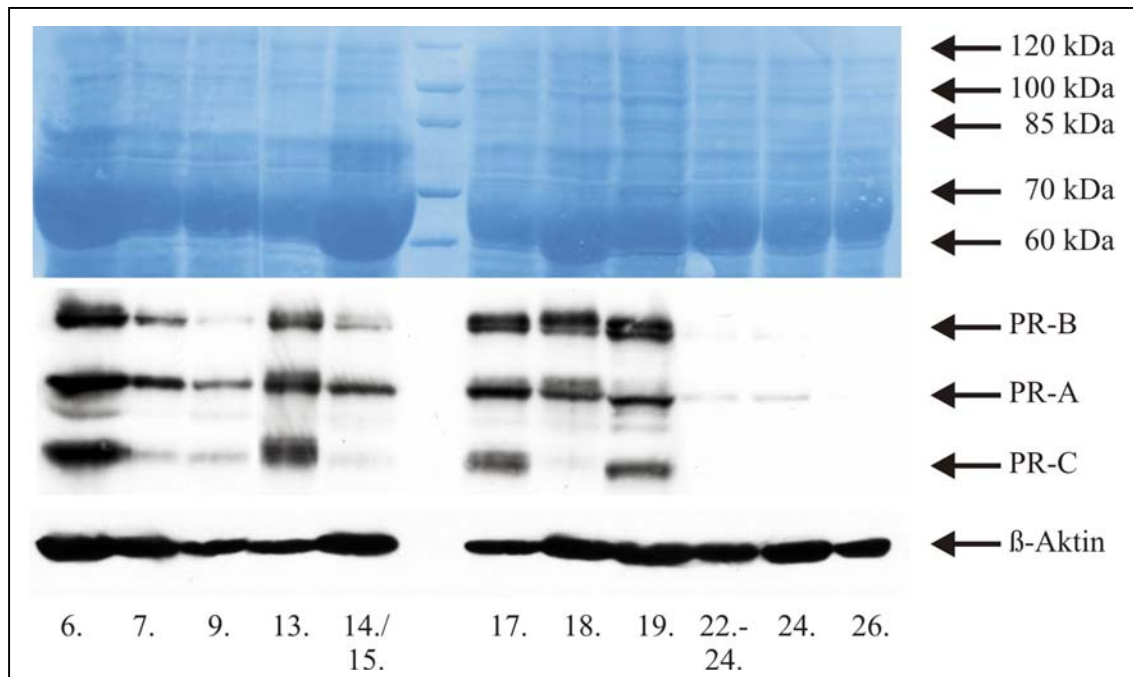


Abb. 9: Abradate über den Zyklus – Zytosol (67)

67 cyt	H3522	H3516	H3515	H3448	H3523	Marker
	6.ZT	7.ZT	9.ZT	13.ZT	14/15.ZT	
PR-B	8151	861	64	2636	429	
PR-A	9935	3453	809	5312	2813	
PR-C	9359	347	326	5866	157	
β-Aktin	21853	18312	12108	11091	18499	
cyt	H3445	H3524	H3505	H3517	H3518	H3533
	17.ZT	18.ZT	19.ZT	22-24.ZT	24.ZT	26.ZT
PR-B	4506	5925	5740	4	1	0
PR-A	5201	3505	2973	45	76	0
PR-C	2814	118	2268	2	0	0
β-Aktin	11796	17456	17143	15271	17830	14796

Mit β -Aktin verrechnet:

67 cyt	H3522	H3516	H3515	H3448	H3523	Marker
	6.ZT	7.ZT	9.ZT	13.ZT	14/15.ZT	
PR-B	0.373	0.047	0.005	0.238	0.023	
PR-A	0.455	0.189	0.067	0.479	0.152	
PR-C	0.428	0.019	0.027	0.529	0.008	
cyt	H3445	H3524	H3505	H3517	H3518	H3533
	17.ZT	18.ZT	19.ZT	22-24.ZT	24.ZT	26.ZT
PR-B	0.382	0.339	0.335	0.000	0.000	0.000
PR-A	0.441	0.201	0.173	0.003	0.004	0.000
PR-C	0.239	0.007	0.132	0.000	0.000	0.000

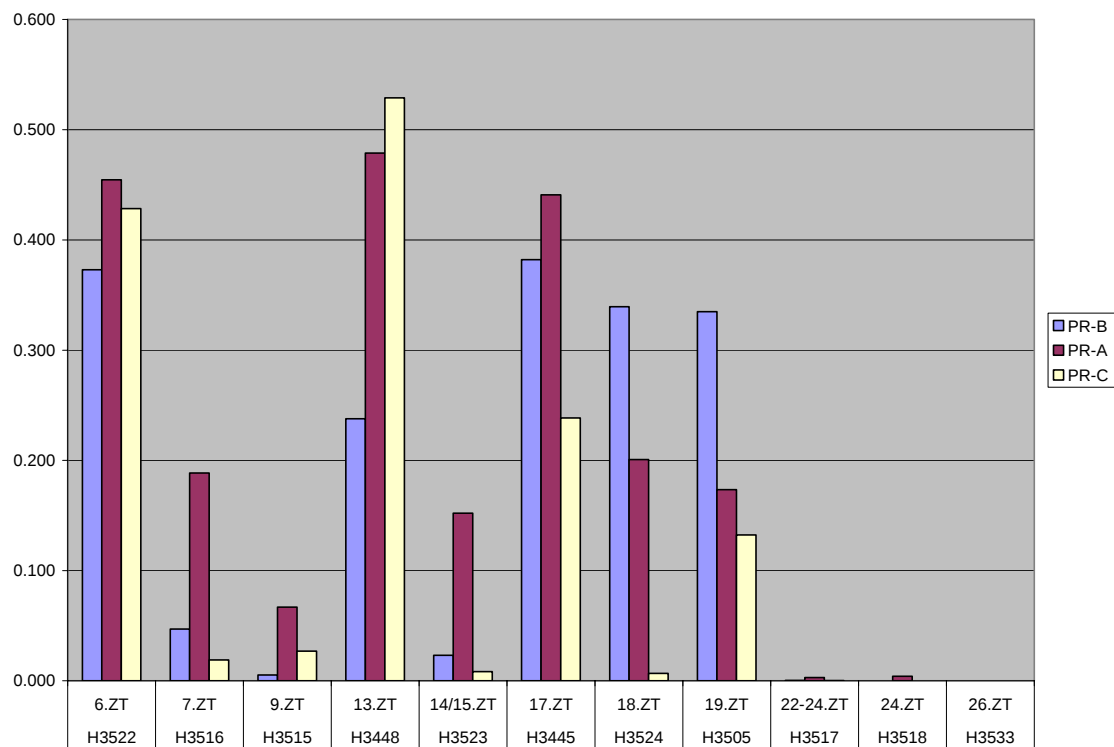


Abb. 10: Abradate über den Zyklus – Zytosol (67)

Im Nukleosol zeigt sich für die Isoform B eine doppelte Bande. Interessant ist die Beobachtung, dass bei den beiden Banden der Isoform B bis zum 14. ZT die jeweils kleinere (betrachtet man das Molekulargewicht) die intensivere ist, ab dem 14./15. Zyklustag ist aber die größere Bande stärker exprimiert. Die Duplett- bzw. Tripletformation ist für die Isoform B bei Beck et al. (1992) beschrieben worden. Diese findet sich ebenfalls bei dem Gel Epithelzellen über den Zyklus, wobei die Intensität innerhalb dieser schwankt und nicht dem hier imponierenden Muster entspricht.

Im Nukleosol ließ sich schon ab dem 6. Zyklustag eine sehr starke Expression der Isoform A nachweisen, die sich auch im Verlauf der Proliferationsphase durchsetzt. Erst ab dem Beginn der Sekretionsphase konnte PR-B diese Level erreichen. In der mittleren Sekretionsphase ist PR-B die stärker exprimierte Isoform.

PR-C war im Nukleosol ab dem 6. Zyklustag nachweisbar. Insgesamt kann man keine Steigerung in der Sekretionsphase erkennen und die Werte sind sowohl schwächer als im Zytosol als auch schwächer als die anderen beiden Isoformen. Ab dem 22. Zyklustag kann man PR-C nicht mehr nachweisen, doch auch die beiden größeren Isoformen verlieren an Intensität.

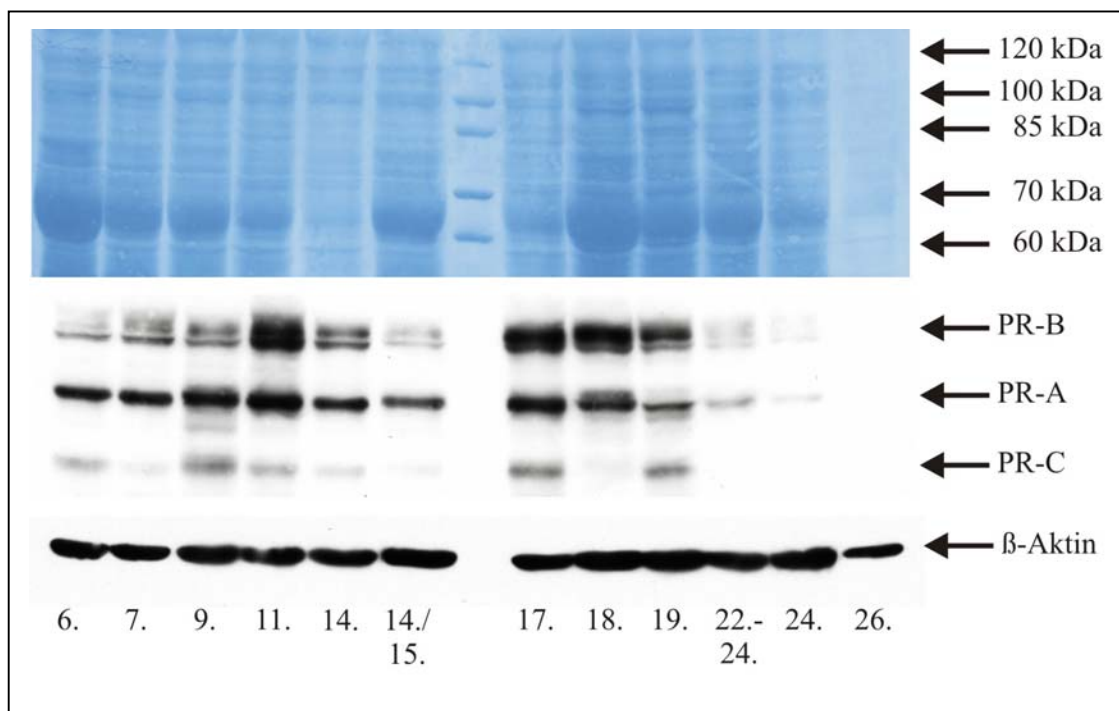


Abb. 11: Abradate über den Zyklus – Nukleosol (68)

68 nuc	H3522	H3516	H3515	H3455	H3496	H3523
	6.ZT	7.ZT	9.ZT	11.ZT	14.ZT	14/15.ZT
PR-B	185	717	726	5055	734	227
PR-B	452	944	760	5590	908	121
PR-A	3977	4461	6178	7527	3284	1880
PR-C	396	81	1079	375	111	22
β -Aktin	14422	13041	15069	14474	13635	16700
nuc	H3445	H3524	H3505	H3517	H3518	H3533
	17.ZT	18.ZT	19.ZT	22.-24.ZT	24.ZT	26.ZT
PR-B	6984	7493	3972	240	21	0
PR-B	1225	1726	609	92	25	0
PR-A	5512	4752	1834	358	42	0
PR-C	882	104	1008	1	0	0
β -Aktin	13648	18080	18794	14531	17752	10396

Mit β -Aktin verrechnet:

68 nuc	H3522	H3516	H3515	H3455	H3496	H3523
	6.ZT	7.ZT	9.ZT	11.ZT	14.ZT	14/15.ZT
PR-B	0.013	0.055	0.048	0.349	0.054	0.014
PR-B	0.031	0.072	0.050	0.386	0.067	0.007
PR-A	0.276	0.342	0.410	0.520	0.241	0.113
PR-C	0.027	0.006	0.072	0.026	0.008	0.001
nuc	H3445	H3524	H3505	H3517	H3518	H3533
	17.ZT	18.ZT	19.ZT	22.-24.ZT	24.ZT	26.ZT
PR-B	0.512	0.414	0.211	0.017	0.001	0.000
PR-B	0.090	0.095	0.032	0.006	0.001	0.000
PR-A	0.404	0.263	0.098	0.025	0.002	0.000
PR-C	0.065	0.006	0.054	0.000	0.000	0.000

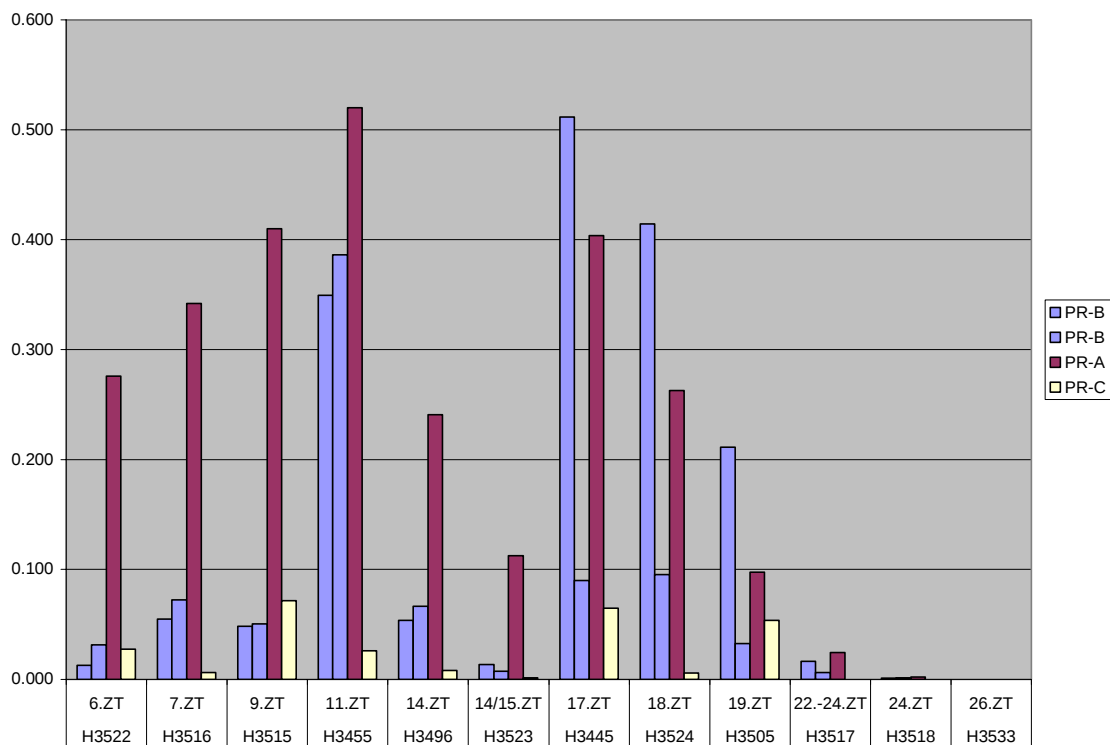


Abb. 12: Abradate über den Zyklus – Nukleosol (68)

3.3.4 Verteilung in den Zellkompartimenten

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Isoform in welchem Kompartiment – Zytosol oder Nukleosol – stärker exprimiert ist und wie sich das eventuell in den verschiedenen Zyklusphasen ändert, wurden die Intensitäten der Banden auf allen Western Blots dahingehend beurteilt und tabellarisch erfasst. Dabei wurde für jede Isoform festgehalten, ob sie sich in der entsprechenden Probe im Zytosol oder Nukleosol in einer stärkeren Intensität darstellt. Siehe Tabelle Nr.10 im Anhang.

Dabei konnten von den 46 Abradaten nur 43 ausgewertet werden, da bei drei Proben im Rahmen der Aufarbeitung die nukleäre Fraktion verloren ging und somit ein Vergleich nicht mehr möglich war. Von diesen 43 Proben war PR-B bei 38 Proben im Nukleosol stärker exprimiert als im Zytosol. Dies betrifft also 88 % der untersuchten Abradate. PR-A war in 27 Proben im Nukleosol stärker exprimiert, das sind 63%. Bei PR-C ließ

sich bei 35% der Proben nicht eindeutig zuordnen, in welchem Kompartiment diese Isoform stärker exprimiert wurde. Somit stellen die 51% im Zytosol eine eindeutige Mehrheit dar, eindeutig im Nukleosol waren nämlich nur 14% stärker exprimiert.

Tab. 3: Verteilung der Isoformen in den Zellkompartimenten - Auswertung für den gesamten Zyklus

n=43	PR-B		PR-A		PR-C	
n>c	38	88%	27	63%	6	14%
c>n	4	9%	9	21%	22	51%
n=c	1	2%	7	16%	15	35%

Tab. 4: Verteilung der Isoformen in den Zellkompartimenten - Auswertung für die verschiedenen Zyklusphasen

Zyklusphase		PR-B		PR-A		PR-C	
3.-10. ZT	n>c	11	92%	8	67%	1	8%
(n=12)	c>n	1	8%	2	17%	6	50%
	n=c	0	-	2	17%	5	42%
11.-14. ZT	n>c	4	67%	3	50%	2	33%
(n=6)	c>n	1	17%	2	33%	2	33%
	n=c	1	17%	1	17%	2	33%
15.-19. ZT	n>c	12	100%	10	83%	2	17%
(n=12)	c>n	0	-	1	8%	9	75%
	n=c	0	-	1	8%	1	8%
20.-23. ZT	n>c	4	80%	2	40%	0	-
(n=5)	c>n	1	20%	2	40%	1	20%
	n=c	0	-	1	20%	4	80%
24.-28. ZT	n>c	7	88%	4	50%	1	13%
(n=8)	c>n	1	13%	2	25%	4	50%
	n=c	0	-	2	25%	3	38%

PR-B ist über den gesamten Zyklus im Nukleosol stärker exprimiert als im Zytosol. Dabei zeigen sich keine deutlichen Schwankungen.

PR-A ist ebenfalls im Nukleosol stärker exprimiert, dies ist aber nicht so eindeutig wie bei der Isoform B. Bei PR-A zeigt sich zudem in der mittleren und späten Sekretionsphase der Trend, dass diese Isoform teilweise ähnlich stark wie im Zytosol

exprimiert wird. Wenn man nur nach Proliferations- und Sekretionsphase auftrennt, fällt dieser Trend nicht auf, da in der frühen Sekretionsphase von einer großen Anzahl Proben 83% im Nukleosol stärker exprimiert sind.

PR-C ist mit wechselnder Deutlichkeit im Zytosol stärker exprimiert. Es fällt auf, dass in der frühen und mittleren Sekretionsphase die Zuordnung leichter fällt, somit das Überwiegen im Zytosol eindeutiger ist.

Tab. 5: Verteilung der Isoformen in den Zellkompartimenten - Auswertung für die Proliferations- und Sekretionsphase

Zyklusphase		PR-B		PR-A		PR-C	
3.-14. ZT	n>c	15	83%	11	61%	3	17%
(n=18)	c>n	3	17%	4	22%	8	44%
	n=c	1	6%	3	17%	7	39%
15.-28. ZT	n>c	23	92%	16	64%	3	12%
(n=25)	c>n	2	8%	5	20%	14	56%
	n=c	0	-	4	16%	8	32%

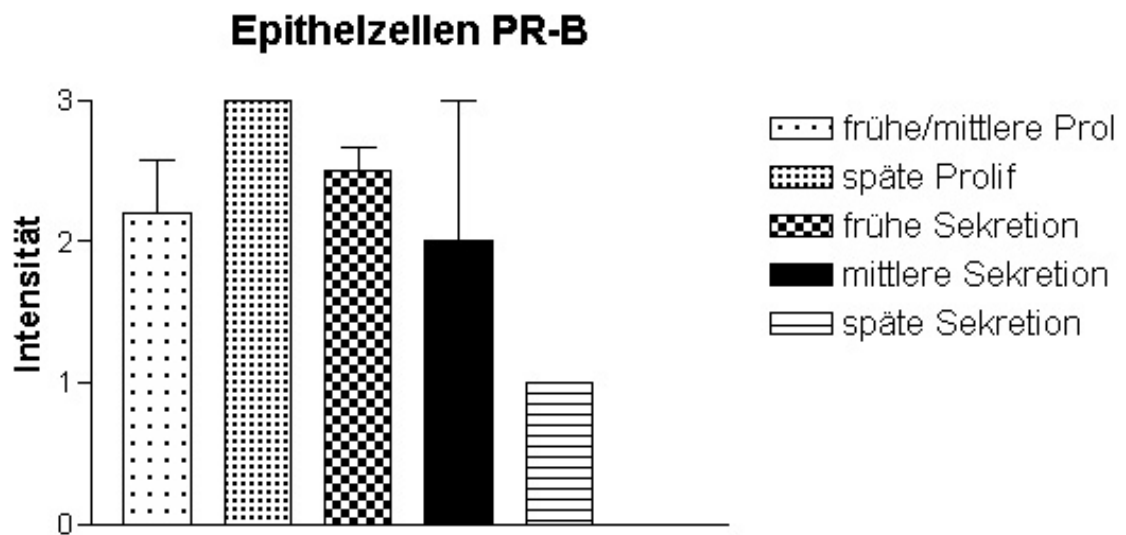
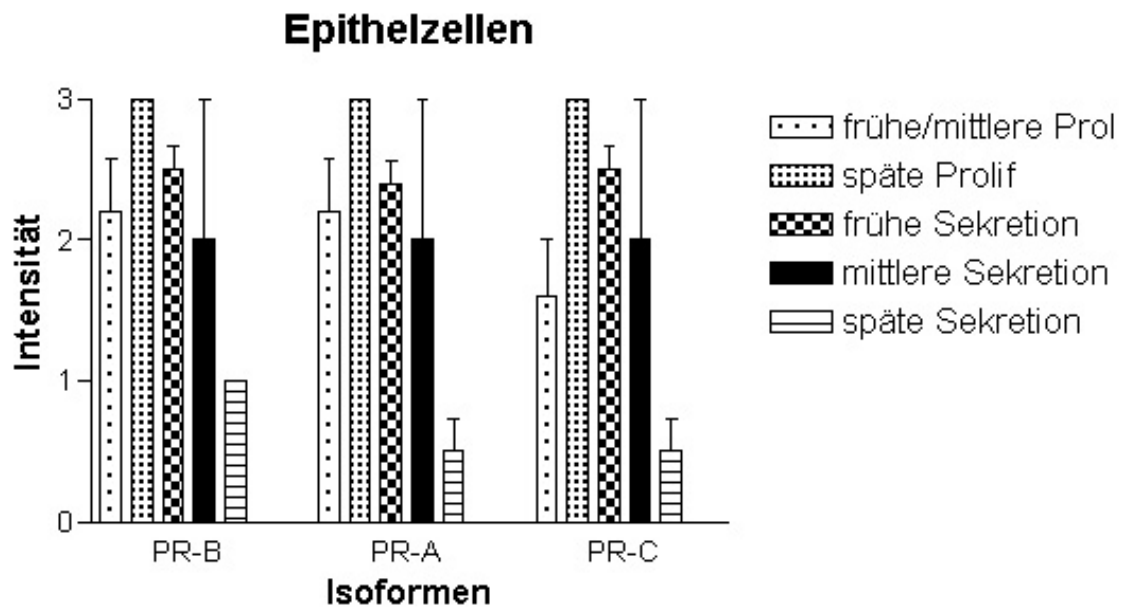
Legende: n>c Die Isoform ist im Nukleosol stärker exprimiert als im Zytosol
 c>n Die Isoform ist im Zytosol stärker exprimiert als im Nukleosol
 n=c Die Isoform ist in beiden Kompartimenten gleichstark exprimiert

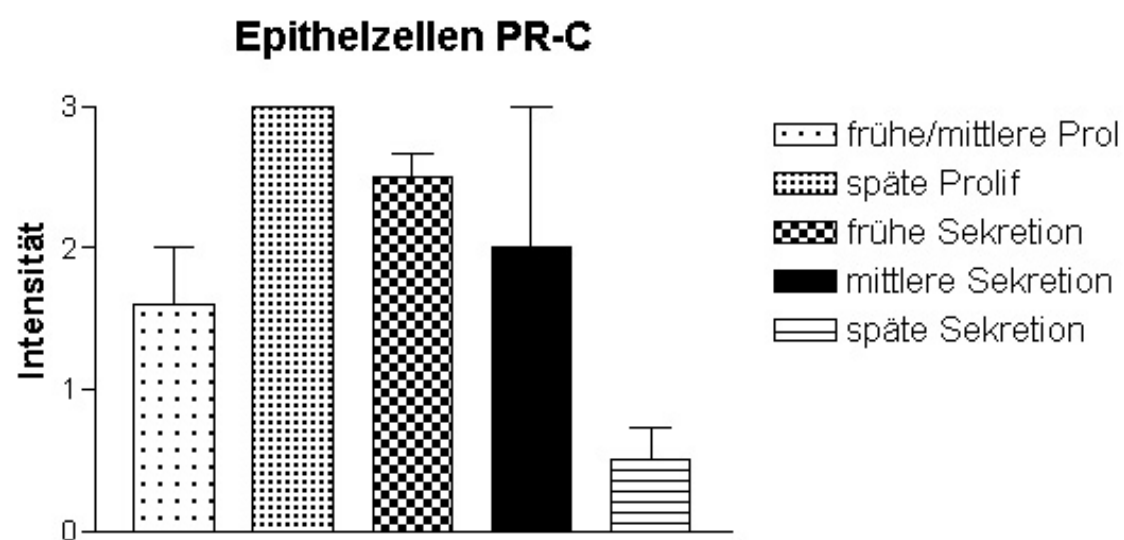
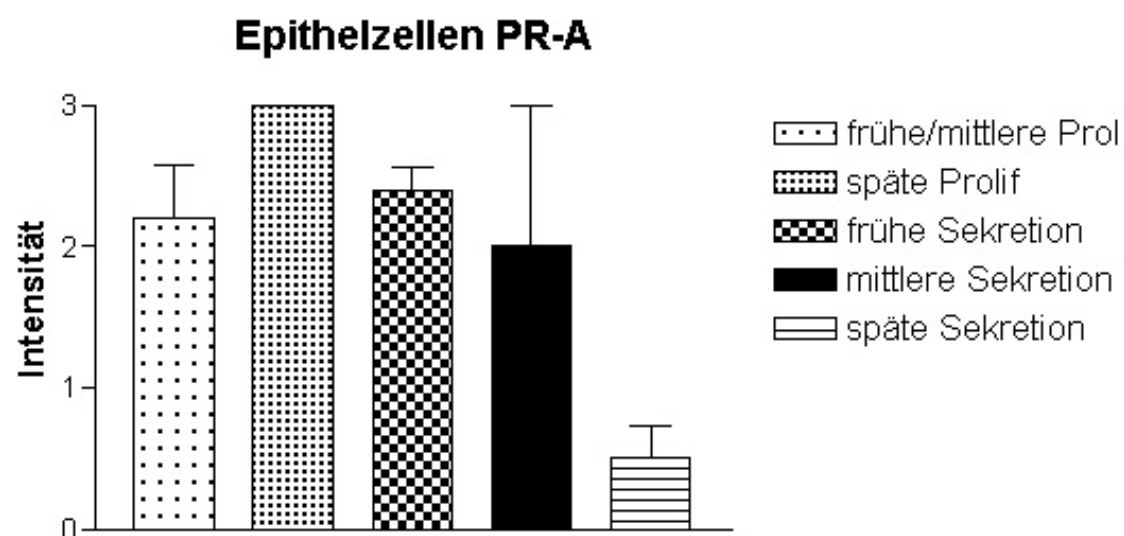
3.3.5 Verteilung in verschiedenen Zelltypen

Die bisher beschriebenen Abradate enthielten alle sowohl Stroma- als auch Epithelzellen. Um genauer differenzieren zu können, wie sich die Expression der Progesteronrezeptor-Isoformen in den verschiedenen Zelltypen unterscheidet, wurden 28 gewonnene Abradatproben wie in Absatz 2.1.2 beschrieben in Epithelzellen und Stromazellen aufgetrennt. Die Aufarbeitung erfolgte nach der Methode, die die Zellen in die Fraktionen Ü2 und Ü3 auftrennt; siehe dazu Absatz 2.3. Dabei wurde bei der Auswertung nur die Fraktion Ü2 bewertet, da das Bandenmuster in der Fraktion Ü3 nicht mit dem der als Kontrolle dienenden T47D-Zellen zu vereinbaren war. Dies wird ausführlich in Absatz 3.4.1 erklärt.

Ebenso wie die Abradate wurden in den in Epithel- und Stromakompartiment getrennten Zellen die Expression der Progesteronrezeptor-Isoformen mit einer Skala von 0-3 beurteilt. Hierbei war das Ziel, den Trend des Verteilungsmusters bei allen Proben zu erfassen. Die detaillierten Ergebnisse dieser Bewertung für die einzelnen Proben finden sich in der Tabelle Nr. 9 im Anhang.

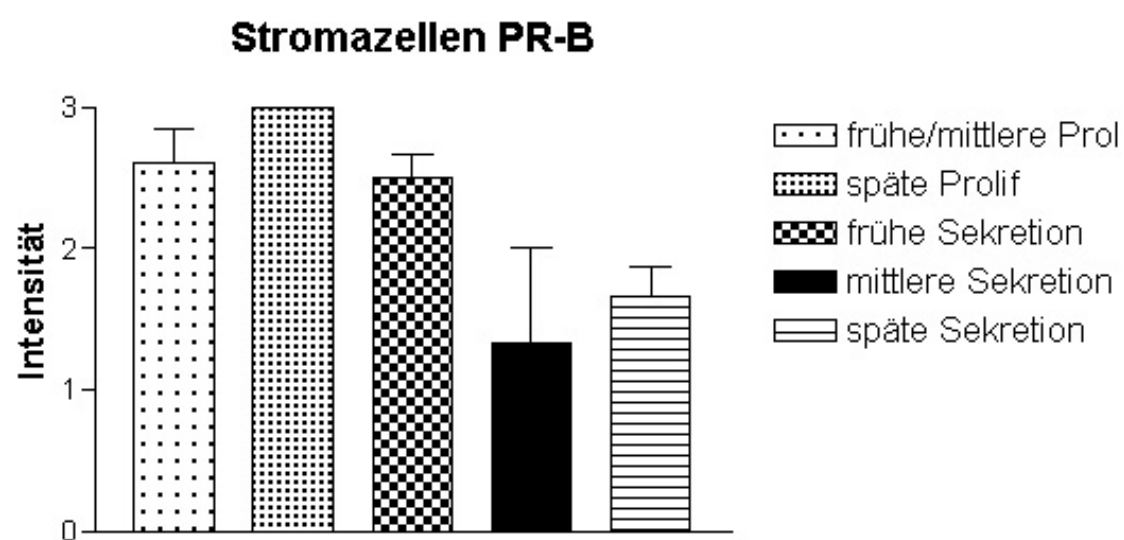
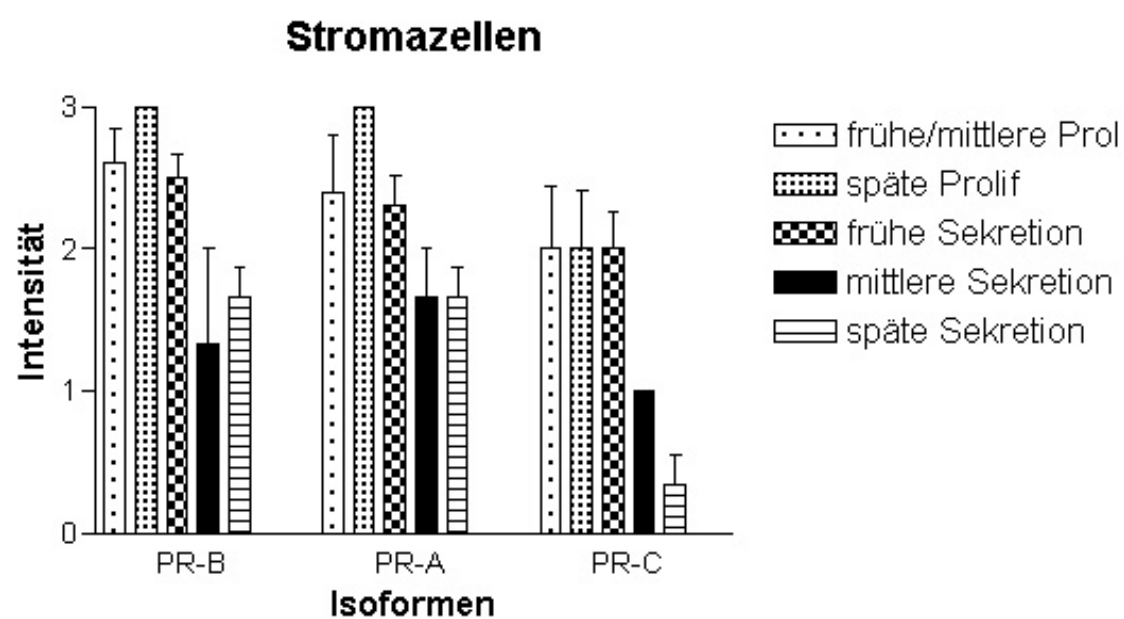
Es zeigt sich in den Epithelzellen in der Proliferationsphase eine ansteigende Intensität der Progesteronrezeptoren, wobei sich die drei Isoformen sehr gleichsinnig verhalten. Sehr ausgeprägt ist dieser Anstieg aber bei der Isoform C. In der periovulatorischen Phase findet sich die stärkste Expression. In der frühen Sekretionsphase sind die drei Isoformen stark exprimiert, auch am 19./20. Zyklustag ist ebenfalls noch eine starke Expression nachweisbar. Sehr deutlich ist der starke Abfall ab dem 21. Zyklustag. Danach lassen sich alle drei Isoformen nur noch schwach nachweisen und ab dem 25. Zyklustag findet sich in den Epithelzellen nur noch PR-B, aber ebenfalls in schwacher Intensität.

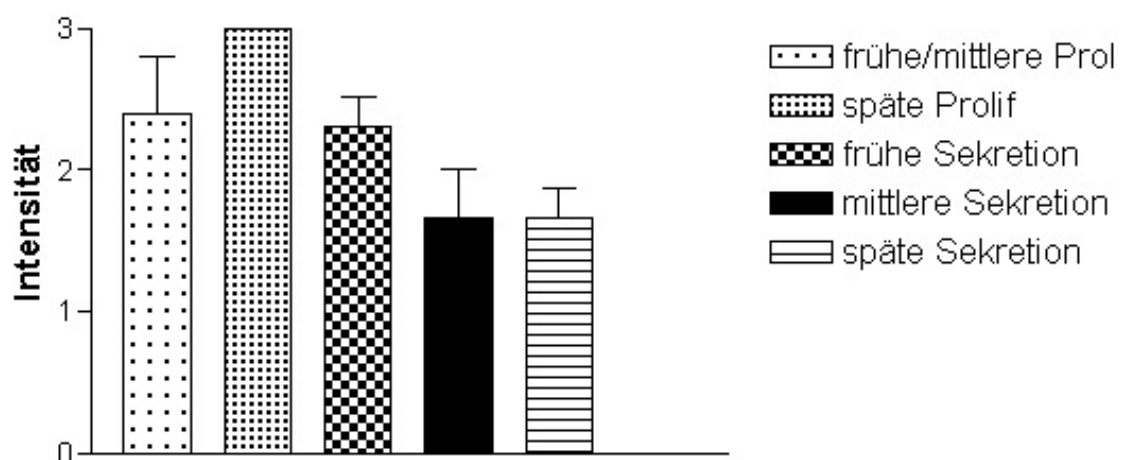
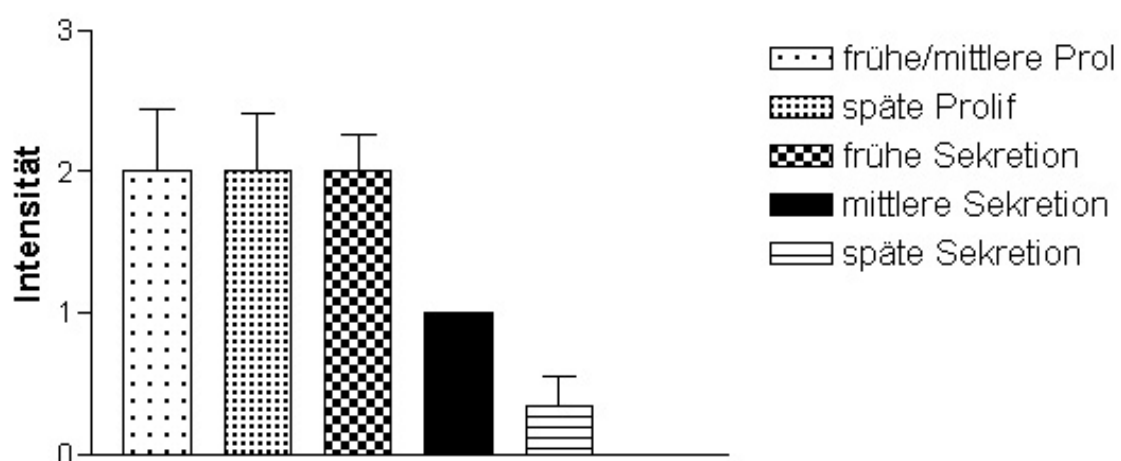




In den Stromazellen verhalten sich die drei Isoformen nicht so gleichsinnig wie in den Epithelzellen. Die stärkste Expression findet sich in der mittleren und späten Proliferationsphase und in der frühen Sekretionsphase. In der frühen Proliferationsphase ist PR-B stärker exprimiert als PR-A und PR-C. Im Verlauf der Proliferationsphase zeigt PR-C bei starken Intensitäten der beiden größeren Isoformen ein wechselndes Bild. Auch in den Proben der frühen Sekretionsphase schwanken die Intensitäten zwischen schwach und stark. Daher errechnet sich im Mittel eine mittelstarke Expression mit einer relativ großen Standardabweichung. Ab dem 19./20. Zyklustag findet sich für PR-C aber durchgehend eine schwache Expression, hier sind auch die Isoformen PR-B und PR-A nur noch in mittlerer Intensität auszumachen. Ab dem 25. Zyklustag ist PR-C gar nicht mehr nachzuweisen, PR-B und PR-A bleiben aber in schwacher bis mittelstarker Intensität exprimiert.

PR-C ist in den Epithelzellen wie die beiden größeren Isoformen reguliert. In den Stromazellen stellt sich PR-C in den meisten Proben mit einer schwächeren Intensität dar, als PR-B und PR-A. Zudem erreicht diese Isoform nicht die starken Intensitäten der beiden anderen Isoformen in der Proliferationsphase und ist auch in der mittleren und späten Sekretionsphase sehr viel schwächer nachweisbar.



Stromazellen PR-A**Stromazellen PR-C**

Um eine genaue Auswertung der Intensität der Banden vornehmen zu können, wurden die Filme eingescannt und densitometrisch ausgewertet. Dabei ist es wiederum nur möglich Vergleiche zwischen Proben auf einem Gel zu ziehen. Zur Veranschaulichung der Beurteilung der Verteilung der Progesteronrezeptoren über den gesamten Zyklus wurden elf Proben der Epithelzellen und zwölf Proben der Stromazellen ausgewählt.

In den Epithelzellen sind die Banden am 2. Zyklustag noch schwach ausgeprägt, in der weiteren Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase sind diese aber für alle drei Isoformen deutlich nachweisbar. Dabei finden sich in der frühen und mittleren Proliferationsphase die stärksten Signale. Die Isoform C ist oft etwas schwächer exprimiert als PR-B und PR-A. In der Sekretionsphase sind bis zum 20. Zyklustag für alle drei Isoformen deutliche Banden nachweisbar, deren Intensität ist aber schwächer als in der Proliferationsphase. Die für die Isoform B beschriebene Duplett- bzw. Tripletformation (Beck et al. 1992) ist gut zu erkennen, wobei die Intensität innerhalb dieser schwankt. Es lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob entweder die größere oder die kleinere in bestimmten Zyklusphasen stärker exprimiert ist. Ab dem 24. Zyklustag ist die Expression der Progesteronrezeptoren sehr stark reduziert und im Western Blot nicht mehr nachweisbar. Sowohl die mit Coomassie gefärbte Membran als auch die Bande für β -Aktin lassen aber gut erkennen, dass die Proben gleichmäßig aufgetragen wurden.

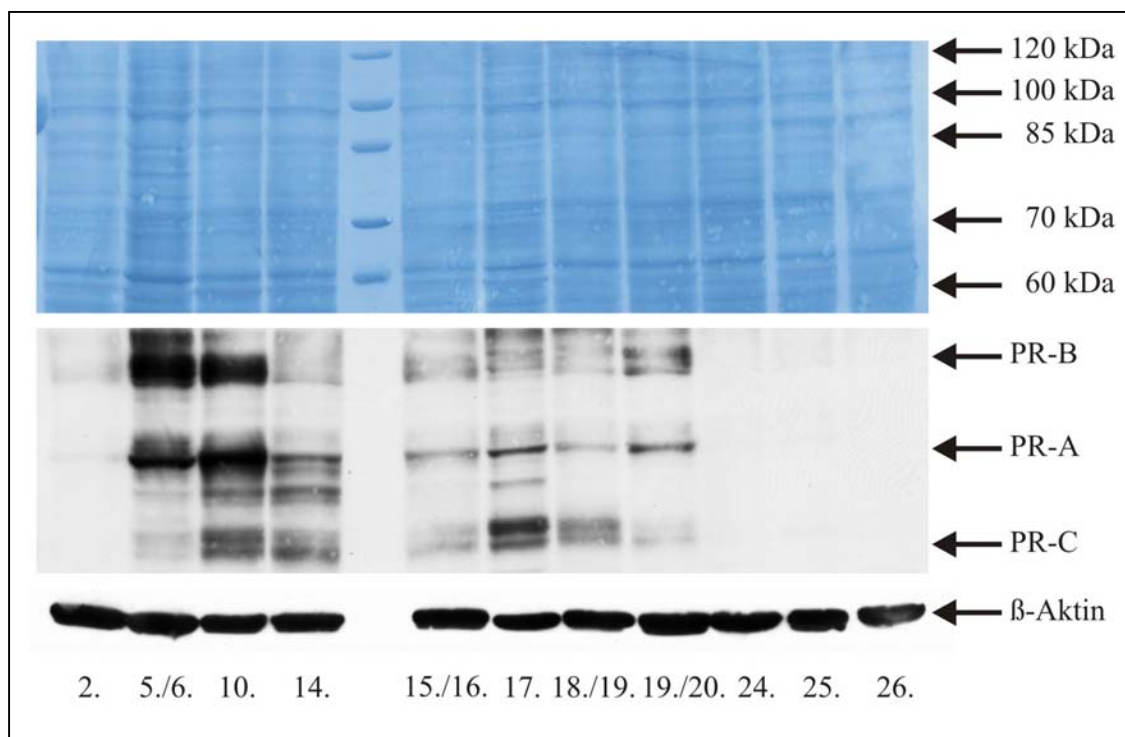


Abb. 13: Getrennte Zellen über den Zyklus Epithel

65	14.02.03 E	22.07.03 E	12.02.03 E	05.02.03 L	Marker	18.03.03 E
	2	5./6.	10	14		15./16.
PR-B	271	4531	534	692		305
PR-B	470	15536	8389	628		750
PR-A	208	9083	11131	1435		449
PR-C	192	801	4505	1949		918
β-Aktin	19713	19740	15535	16087		17374
	02.12.03 M	11.04.03 E	07.02.03 E	28.10.03 L	18.02.03 E	26.03.03 E
	17	18./19.	19./20.	24	25	26
PR-B	1225	802	395	209	181	183
PR-B	927	739	781	326	259	143
PR-A	1482	367	809	247	236	326
PR-C	6771	1708	491	283	316	306
β-Aktin	15163	16337	19938	17353	19086	12678

Mit β -Aktin verrechnet:

65	14.02.03 E	22.07.03 E	12.02.03 E	05.02.03 L	Marker	18.03.03 E
	2	5. /6.	10	14		15. /16.
PR-B	0.014	0.230	0.034	0.043		0.018
PR-B	0.024	0.787	0.540	0.039		0.043
PR-A	0.011	0.460	0.717	0.089		0.026
PR-C	0.010	0.041	0.290	0.121		0.053
	02.12.03 M	11.04.03 E	07.02.03 E	28.10.03 L	18.02.03 E	26.03.03 E
	17	18. /19.	19. /20.	24	25	26
PR-B	0.081	0.049	0.020	0.012	0.009	0.014
PR-B	0.061	0.045	0.039	0.019	0.014	0.011
PR-A	0.098	0.022	0.041	0.014	0.012	0.026
PR-C	0.447	0.105	0.025	0.016	0.017	0.024

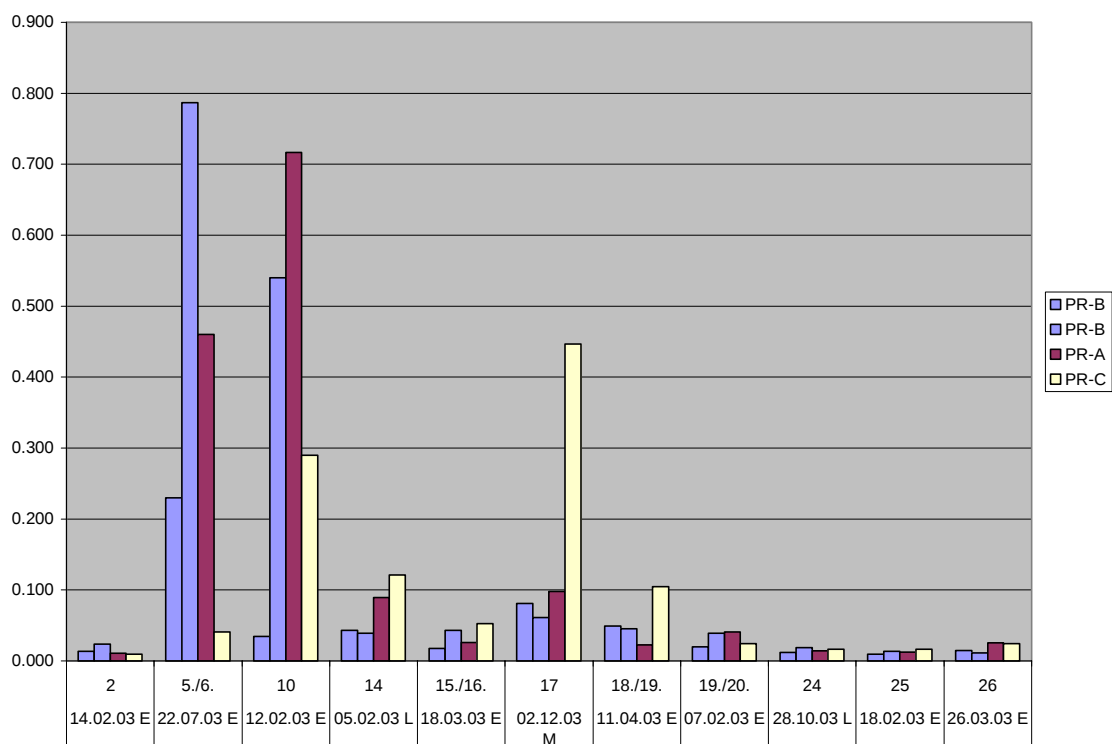


Abb. 14: Getrennte Zellen über den Zyklus Epithel

In den Stromazellen findet sich ein ähnliches Expressionsmuster. Die stärksten Banden sind hier in der mittleren Proliferationsphase nachweisbar. Schon in der späten Proliferationsphase nimmt die PR-Expression ab und gleicht sich damit dem Level der Sekretionsphase an.

Anders als in den Epithelzellen nimmt die Progesteronrezeptor Expression in den Stromazellen im Verlauf der Sekretionsphase nicht stark ab. Die Banden bleiben bis in die späte Sekretionsphase gut nachweisbar und zeigen eine ähnliche Intensität. Es fällt auf, dass die Bande für PR-C im Verhältnis zu den beiden anderen Isoformen an Intensität verliert. In der Sekretionsphase erscheint die Bande für PR-A intensiver als die meist als Duplett erscheinende Bande für PR-B. Die Messergebnisse der Densitometrie sind aber nicht immer höher. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Banden für PR-B breiter streuen.

Für die Expression des PR-C bei 65 kDa lässt sich feststellen, dass diese in der späten Sekretionsphase in den Stromazellen abnimmt. Dies findet nicht proportional zu den anderen Isoformen statt, die ein gleich bleibendes Level aufweisen.

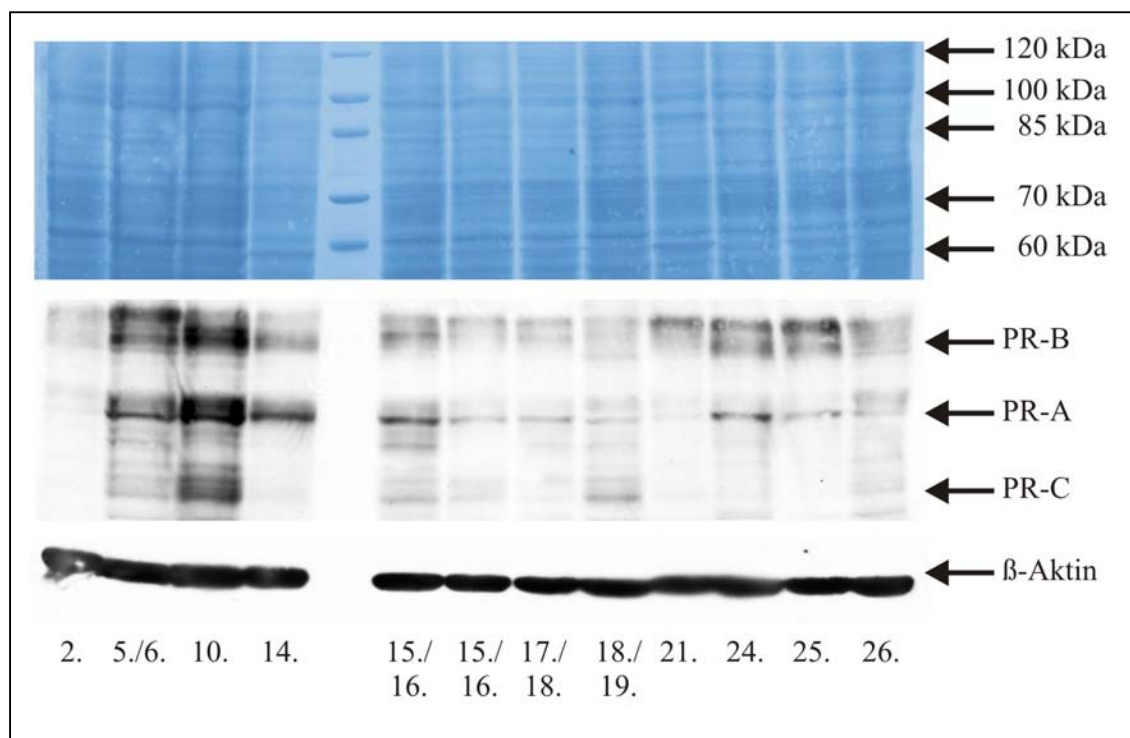


Abb. 15: Getrennte Zellen über den Zyklus Stroma

66	14.02.03 E	22.07.03 E	12.02.03 E	19.02.03 E	18.03.03 E	15.05.03 K
ZT	2.	5./6.	10.	13./14.	15./16.	15./16.
PR-B	397	2019	995	251	237	241
PR-B	500	1538	5107	785	748	123
PR-A	230	1336	6898	2096	950	159
PR-C	56	415	2933	198	410	182
β -Aktin	11405	19958	19968	16311	17169	15716
	21.03.03 E	11.04.03 E	24.06.03 M	28.10.03 L	02.10.03 L	26.08.03 E
ZT	17./18.	18./19.	21.	24.	25.	26.
PR-B	238	317	945	630	1087	788
PR-B	253	335	393	673	493	167
PR-A	195	214	100	300	167	248
PR-C	120	439	95	100	18	176
β -Aktin	16530	17048	14904	12010	17572	18515

Mit β -Aktin verrechnet:

66	14.02.03 E	22.07.03 E	12.02.03 E	19.02.03 E	18.03.03 E	15.05.03 K
ZT	2.	5./6.	10.	13./14.	15./16.	15./16.
PR-B	0.035	0.101	0.050	0.015	0.014	0.015
PR-B	0.044	0.077	0.256	0.048	0.044	0.008
PR-A	0.020	0.067	0.345	0.129	0.055	0.010
PR-C	0.005	0.021	0.147	0.012	0.024	0.012
	21.03.03 E	11.04.03 E	24.06.03 M	28.10.03 L	02.10.03 L	26.08.03 E
ZT	17./18.	18./19.	21.	24.	25.	26.
PR-B	0.014	0.019	0.063	0.052	0.062	0.043
PR-B	0.015	0.020	0.026	0.056	0.028	0.009
PR-A	0.012	0.013	0.007	0.025	0.010	0.013
PR-C	0.007	0.026	0.006	0.008	0.001	0.010

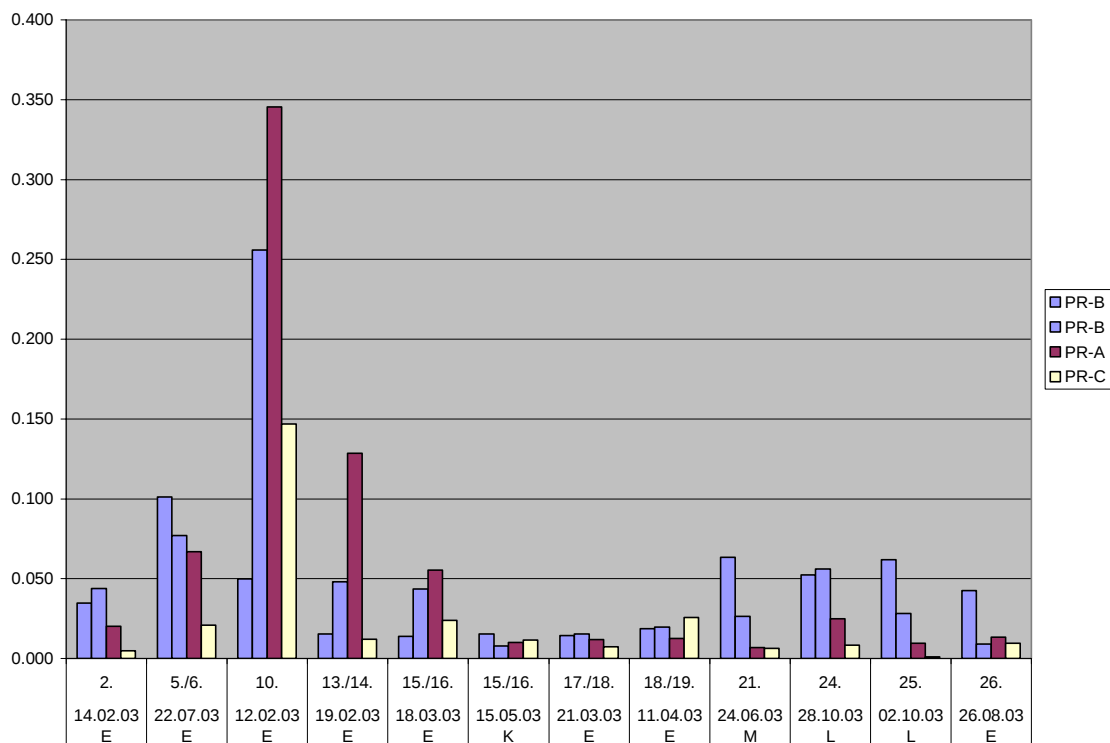


Abb. 16: Getrennte Zellen über den Zyklus Stroma

Späte Sekretionsphase

Zur genauen Beurteilung der Expression in der späten Sekretionsphase mittels densitometrischer Messung wurden sieben Proben aus dieser Phase mit drei beispielhaften Proben aus der Proliferationsphase im direkten Vergleich auf einem Gel vermessen.

In den Epithelzellen lassen sich die Banden der drei Progesteronrezeptor Isoformen in der Proliferations- und frühen Sekretionsphase kräftig darstellen. Die Bande für PR-B bei 114 kDa ist als Duplett zu erkennen. Das stärkste Signal findet sich am 10. Zyklustag. Ab dem 24. Zyklustag lassen sich diese Banden nur noch sehr schwach nachweisen. Dabei verhalten sich alle Isoformen tendenziell gleichsinnig. Nur die größere Bande von PR-B ist noch gut darstellbar, teilweise sogar mit Intensitäten, die denen der späten Proliferationsphase entsprechen.

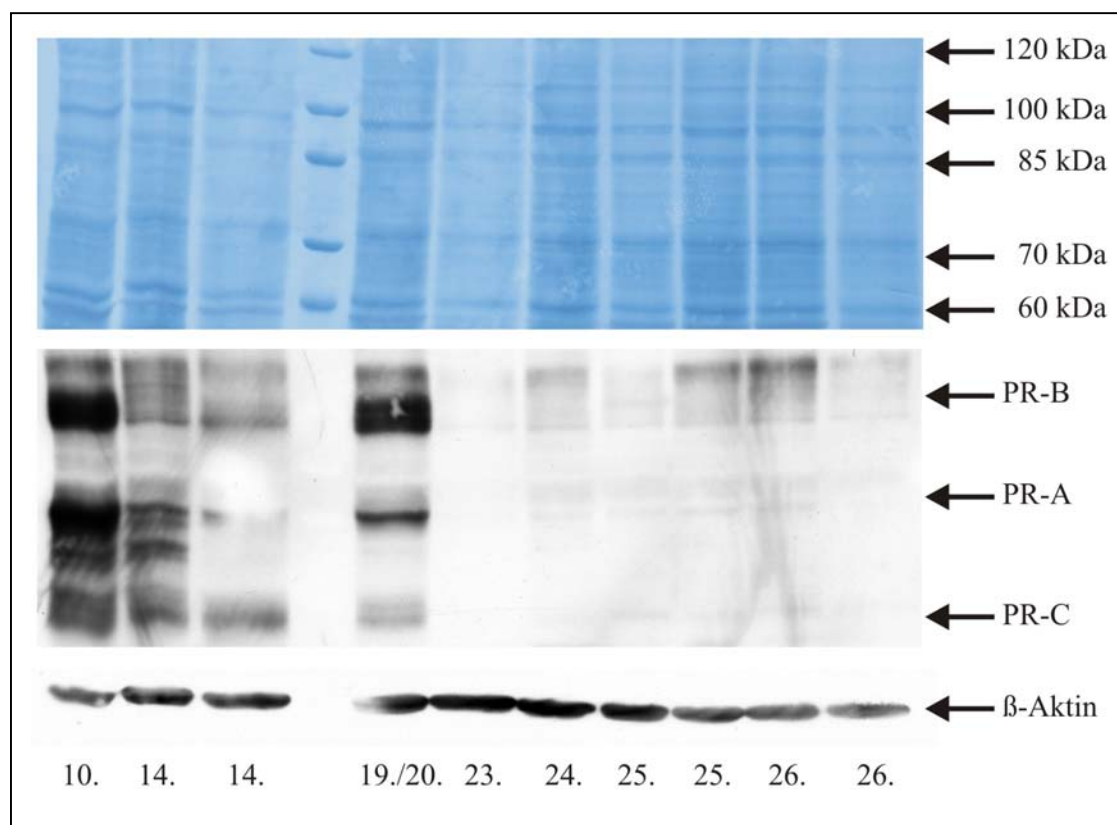


Abb. 17: Getrennte Zellen sekretorisch Epithel – Vergleich proliferativ

62	12.02.03 E	05.02.03 L	04.11.03 E	07.02.03 E		
ZT	10.	14.	14.	19./20.		
PR-B	2633	1776	1059	1040		
PR-B	15334	2160	2172	9412		
PR-A	10813	4854	718	2753		
PR-C	4239	2518	1396	606		
β-Aktin	2913	5804	5108	7093		
	25.06.03 E	28.10.03 L	18.02.03 E	02.10.03 L	26.08.03 E	26.03.03 E
ZT	24.	24.	25.	25.	26.	26.
PR-B	129	655	192	1157	1503	308
PR-B	148	538	332	702	780	285
PR-A	62	168	180	175	304	113
PR-C	33	124	242	216	498	113
β-Aktin	7583	8555	7097	4029	2431	2676

Mit β -Aktin verrechnet:

62	12.02.03 E	05.02.03 L	04.11.03 E	07.02.03 E		
ZT	10.	14.	14.	19./20.		
PR-B	0.904	0.306	0.207	0.147		
PR-B	5.264	0.372	0.425	1.327		
PR-A	3.712	0.836	0.140	0.388		
PR-C	1.455	0.434	0.273	0.085		
	25.06.03 E	28.10.03 L	18.02.03 E	02.10.03 L	26.08.03 E	26.03.03 E
ZT	24.	24.	25.	25.	26.	26.
PR-B	0.017	0.077	0.027	0.287	0.618	0.115
PR-B	0.019	0.063	0.047	0.174	0.321	0.106
PR-A	0.008	0.020	0.025	0.043	0.125	0.042
PR-C	0.004	0.015	0.034	0.054	0.205	0.042

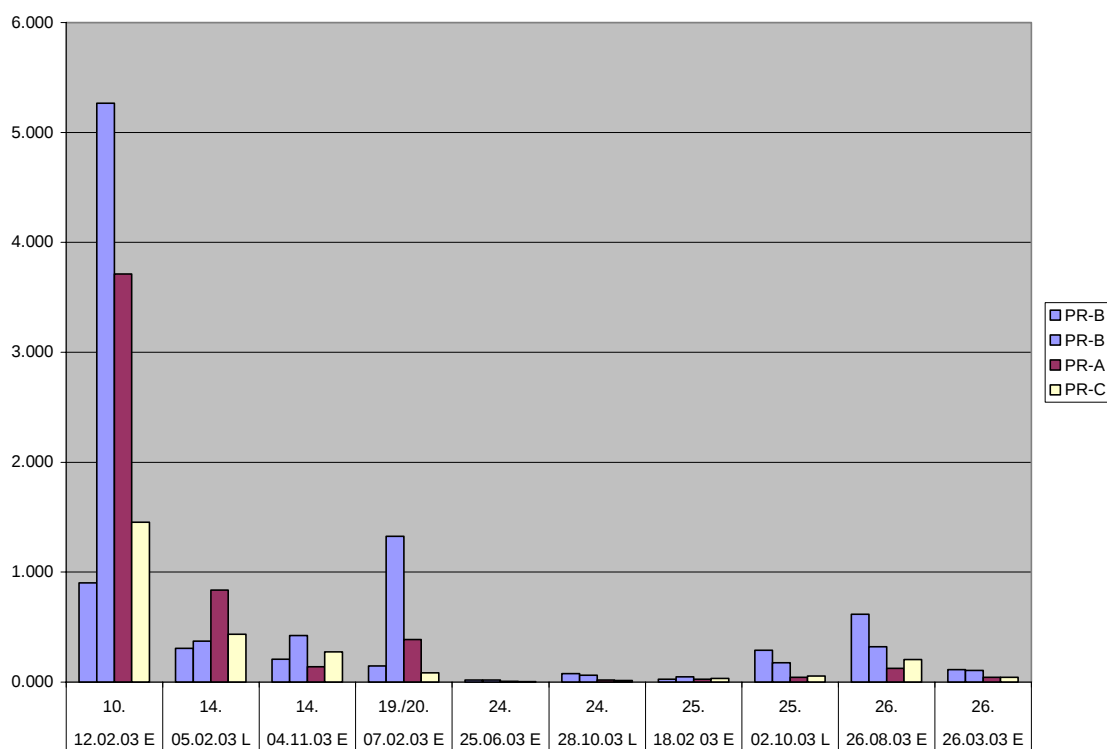


Abb. 18: Getrennte Zellen sekretorisch Epithel – Vergleich proliferativ

In den Stromazellen sind die Unterschiede zwischen der Proliferationsphase und der Sekretionsphase nicht so stark ausgeprägt. Die Tendenz zur geringeren Expression in der Sekretionsphase ist aber auch hier gut zu erkennen. Am 2. Zyklustag sind die Banden für die Isoformen noch schwach, vergleichbar mit der Sekretionsphase. In den Proben der frühen und mittleren Proliferationsphase finden sich die stärksten Signale. Diese sind in der mittleren und späten Sekretionsphase deutlich schwächer, bleiben aber durchgehend nachweisbar.

Die Messwerte am 25. Zyklustag sind für PR-B sehr hoch. Dieses Ergebnis fällt aus dem allgemeinen Trend heraus. Hier wurde am 25. Zyklustag im Vergleich zu den restlichen Werten von β -Aktin ein sehr niedriger Wert gemessen, sodass sich sehr hohe PR-Werte errechnen. Der β -Aktin Wert passt nicht zur Intensität der Coomassie-Färbung dieser Spur, sodass ich einen Reaktionsfehler annehme. In der Spur vom ersten 26. Zyklustag findet sich in der Mitte der β -Aktin-Bande ein ebenfalls blasserer Bezirk. Ich nehme an, dass sich dieser Fehler auf die gesamte Bande am 25. Zyklustag ausdehnt. Solche blassen Bezirke im Bereich einer Bande - im Vergleich zum restlichen Anteil dieser Bande - können durch Luftblasen verursacht werden, die den Kontakt mit der Lösung verhindern und somit auch die Reaktion der Proteine mit den Antikörpern.

Obwohl das Signal für die Bande des PR-A teilweise dem Untersucher optisch stärker erscheint, sind die densitometrischen Messwerte für PR-B höher. Dies liegt wiederum an der Breite der Bande. Die Intensitäten der Bande von PR-C sind in der Proliferationsphase mit denen von PR-B und PR-A vergleichbar. In der späten Sekretionsphase ist PR-C aber deutlich schwächer exprimiert.

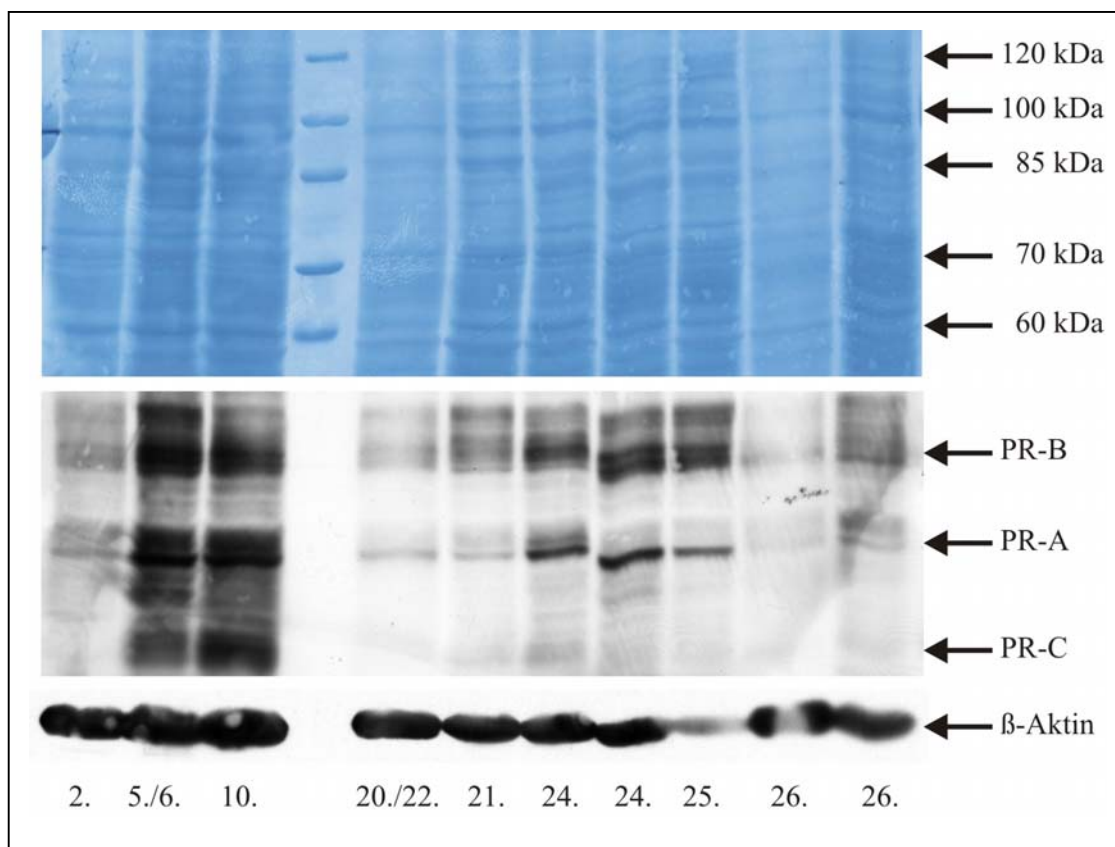


Abb. 19: Getrennte Zellen Stroma sekretorisch

63	14.02.03 E	22.07.03 E	12.02.03 E	25.03.03 E	24.06.03 M
ZT	2.	5./6.	10.	20.-22.	21.
PR-B	1196	8604	1130	380	1022
PR-B	2609	17544	5751	775	2172
PR-A	1197	8012	10254	420	472
PR-C	805	6230	13886	240	576
β-Aktin	21794	25979	28310	18854	18341
	25.06.03 E	28.10.03 L	02.10.03 L	26.03.03 E	26.08.03 E
ZT	24.	24.	25.	26.	26.
PR-B	1166	2160	3143	283	2315
PR-B	5503	7473	7230	539	2625
PR-A	3133	4151	1291	656	2157
PR-C	1170	937	706	504	577
β-Aktin	22064	20846	3058	19765	15636

3 Ergebnisse

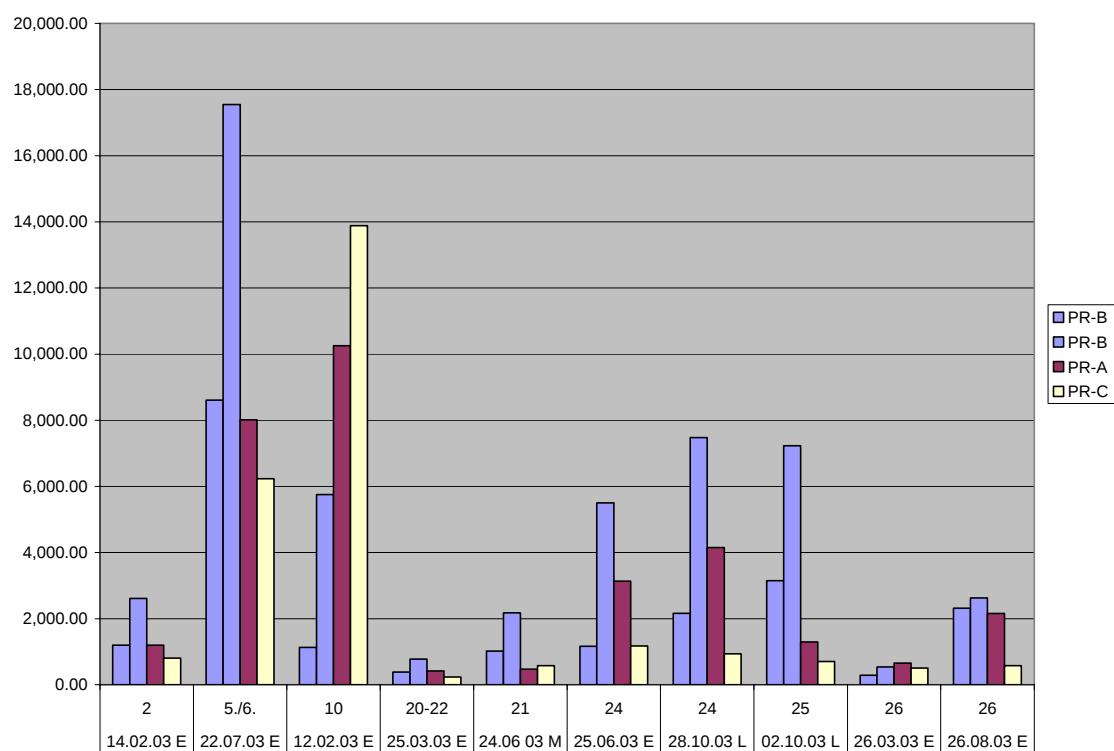


Abb. 20: Getrennte Zellen Stroma sekretorisch – ohne Verrechnung mit β -Aktin

Mit β -Aktin verrechnet:

63	14.02.03 E	22.07.03 E	12.02.03 E	25.03.03 E	24.06.03 M
ZT	2.	5./6.	10.	20.-22.	21.
PR-B	0.055	0.331	0.040	0.020	0.056
PR-B	0.120	0.675	0.203	0.041	0.118
PR-A	0.055	0.308	0.362	0.022	0.026
PR-C	0.037	0.240	0.490	0.013	0.031
	25.06.03 E	28.10.03 L	02.10.03 L	26.03.03 E	26.08.03 E
ZT	24.	24.	25.	26.	26.
PR-B	0.053	0.104	1.028	0.014	0.148
PR-B	0.249	0.358	2.364	0.027	0.168
PR-A	0.142	0.199	0.422	0.033	0.138
PR-C	0.053	0.045	0.231	0.025	0.037

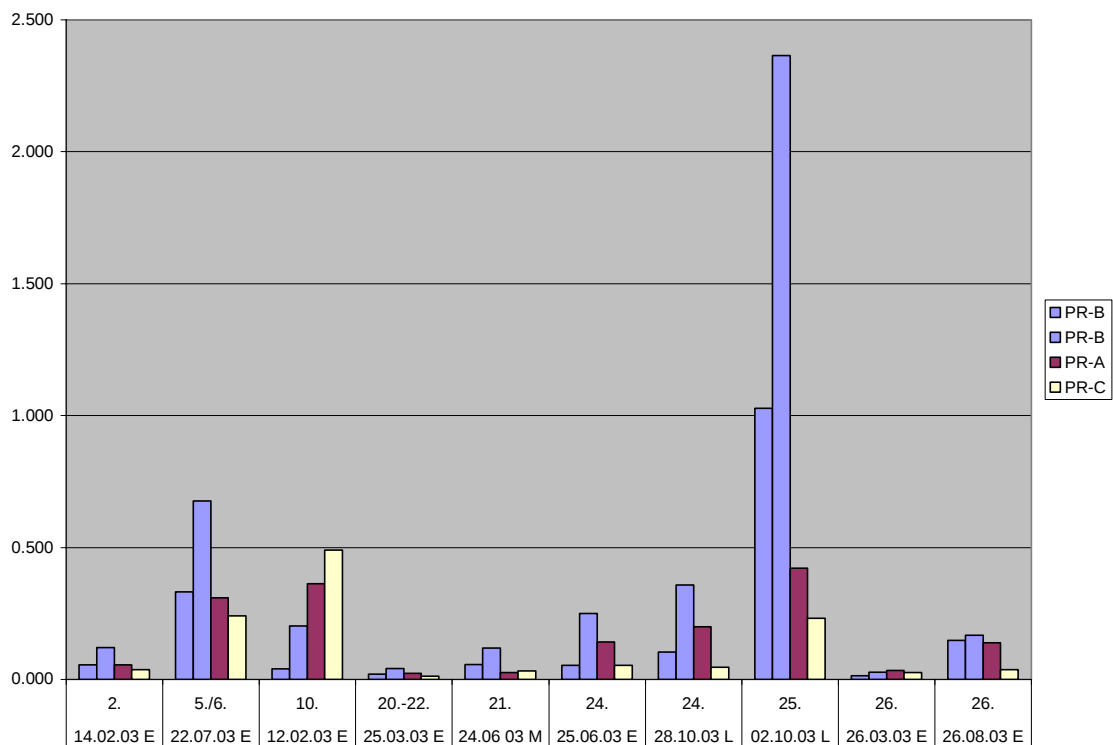


Abb. 21: Getrennte Zellen Stroma sekretorisch

Vergleich Epithel und Stroma

Im direkten Vergleich von Epithel- und Stromazellen lässt sich die Entwicklung der Expression in der mittleren und späten Sekretionsphase noch deutlicher darstellen. Hierzu wurden von vier Proben die Lysate der Epithel- und Stromazellen direkt nebeneinander aufgetragen. Am 10. Zyklustag sind die stärksten Signale für die Isoformen des Progesteronrezeptors zu messen. Dabei sind die Intensitäten der Stromazellen etwas höher. Am 15./16. Zyklustag sind die Signale sowohl in den Epithel- als auch in den Stromazellen schwächer. In den Proben vom 24. und 25. Zyklustag wird der Unterschied zwischen den Zelltypen sehr deutlich: In den Epithelzellen lassen sich keine Banden mehr nachweisen, während in den Stromazellen PR-B und PR-A noch gute Signale erkennen lassen. Dabei fällt auf, dass PR-C, der am 10. und am 15./16. Zyklustag höchstens etwas schwächer als PR-B und PR-A nachweisbar war, in der späten Sekretionsphase fehlt oder aber extrem schwächer

nachweisbar ist als die beiden anderen Isoformen. PR-B ist in den Stromazellen der späten Sekretionsphase die dominierende Isoform. Dies ist aber vor allen Dingen bei diesen beiden ausgewählten Proben der Fall, im Gel Stroma sekretorisch ist dies nicht so eindeutig.

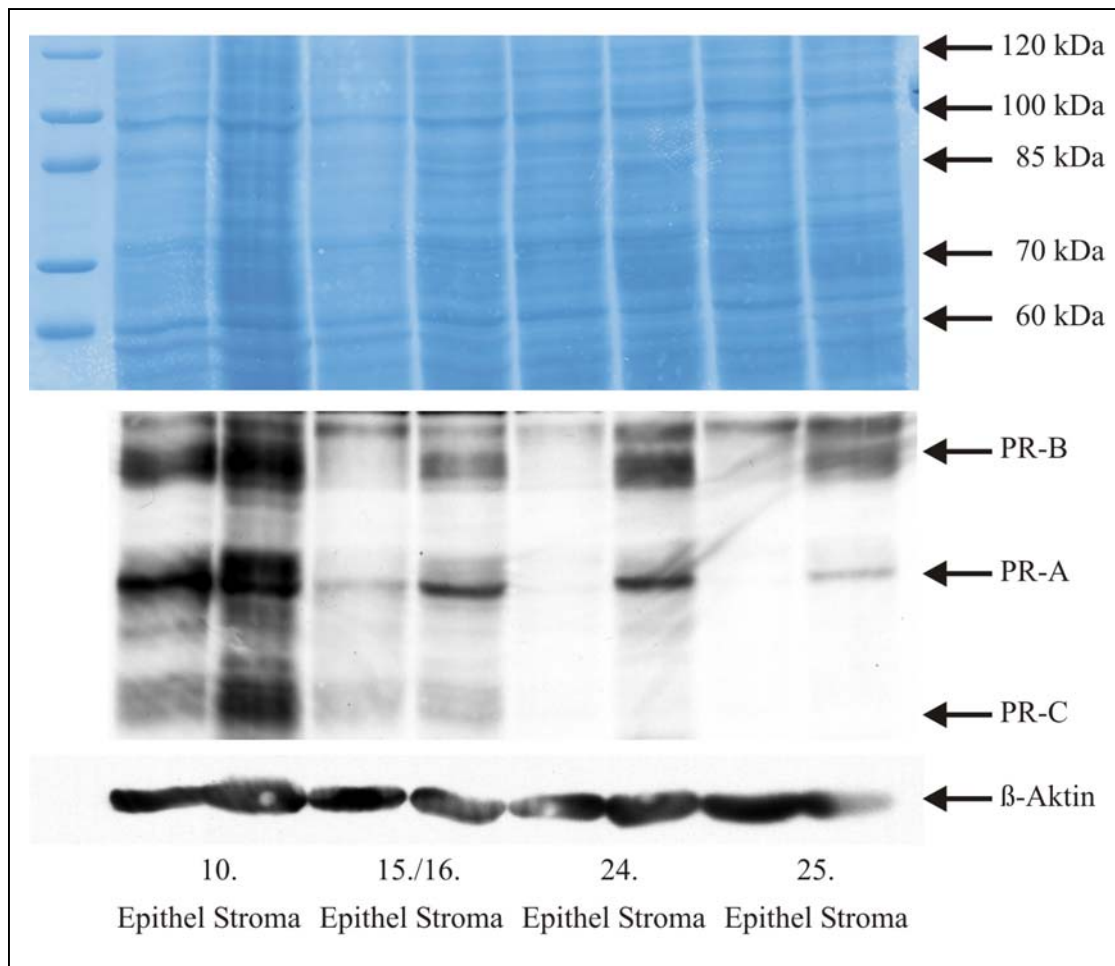


Abb. 22: Getrennte Zellen Epithel und Stroma über den Zyklus

64	12.02.03 E	12.02.03 E	15.05.03 K	15.05.03 K
	Epi	Str	Epi	Str
ZT	10	10	15/16	15/16
PR-B	671	3247	816	526
PR-B	5546	15875	359	1746
PR-A	9161	12521	460	2810
PR-C	2266	12366	915	924
β -Aktin	14175	15781	19353	8835
	28.10.03 L	28.10.03 L	02.10.03 L	02.10.03 L
	Epi	Str	Epi	Str
ZT	24	24	25	25
PR-B	410	2000	908	2086
PR-B	167	6614	541	2491
PR-A	114	3240	14	286
PR-C	48	212	8	25
β -Aktin	14694	15332	19416	3207

Mit β -Aktin verrechnet:

64	12.02.03 E	12.02.03 E	15.05.03 K	15.05.03 K
	Epi	Str	Epi	Str
ZT	10	10	15/16	15/16
PR-B	0.047	0.206	0.042	0.060
PR-B	0.391	1.006	0.019	0.198
PR-A	0.646	0.793	0.024	0.318
PR-C	0.160	0.784	0.047	0.105
	28.10.03 L	28.10.03 L	02.10.03 L	02.10.03 L
	Epi	Str	Epi	Str
ZT	24	24	25	25
PR-B	0.028	0.130	0.047	0.650
PR-B	0.011	0.431	0.028	0.777
PR-A	0.008	0.211	0.001	0.089
PR-C	0.003	0.014	0.000	0.008

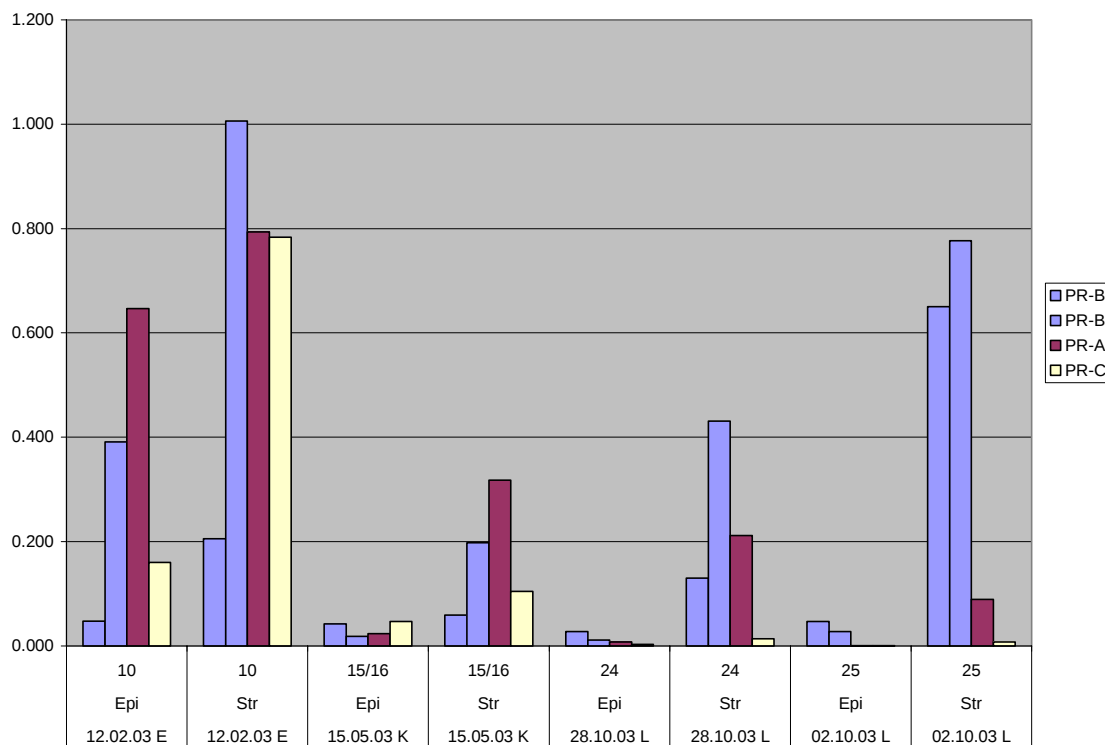


Abb. 23: Getrennte Zellen Epithel und Stroma über den Zyklus

3.4 Beeinflussung durch unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden

3.4.1 Endometrium

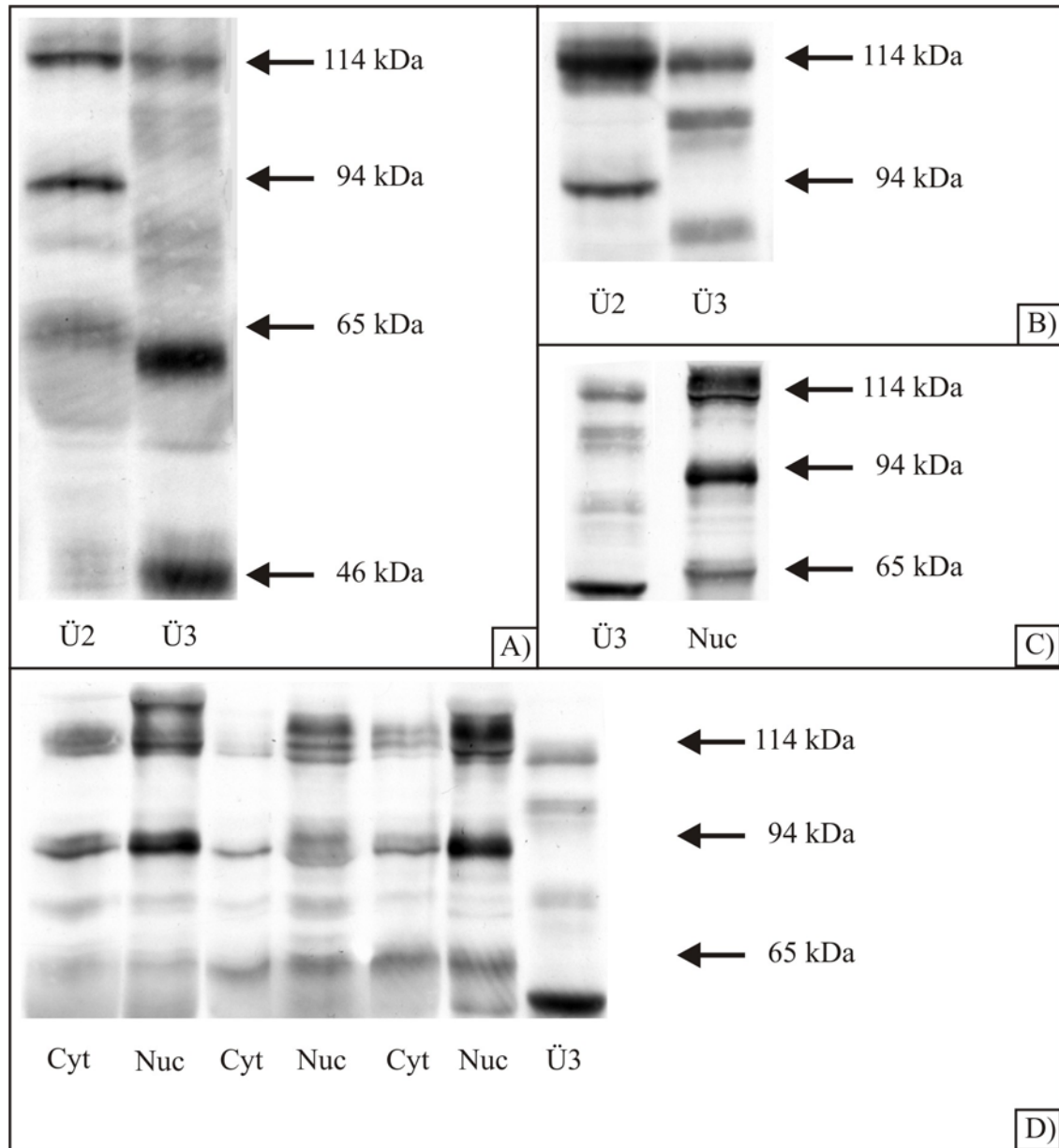
In Kapitel 2.3 wurden zwei verschiedene Methoden der Aufarbeitung der gewonnenen Zellen beschrieben. Die Methode, nach der die Getrennten Zellen aufgearbeitet worden sind, wurde zunächst auch für die Abradate angewendet. Dabei wurden die Zellen in die Überstände 2 (Ü2) und 3 (Ü3) aufgetrennt. Man geht davon aus, dass das im für die Gewinnung von Ü3 verwendeten Lysispuffer enthaltene Detergenz Triton eine Zerstörung der Kernmembran verursacht und somit ermöglicht, dass man die Verteilung der Rezeptoren zwischen Zytosol und Nukleosol beurteilen kann. Sowohl bei den Getrennten Zellen als auch bei den Abradaten war eine sinnvolle Auswertung der Reaktionen im Western Blot an Ü3 allerdings nicht möglich. PR-B war in Ü2 meistens stärker nachweisbar, aber auch in Ü3 vorhanden. PR-A dagegen war in Ü3 überhaupt nicht nachweisbar. Dafür detektierte der Antikörper eine Bande bei etwas über 100 kDa

und eine Bande bei ca. 80 kDa. PR-C war ebenfalls in Ü2 nachweisbar, in Ü3 war die entsprechende Bande bei ca. 10 kDa geringerem Molekulargewicht nachweisbar und schien daher wie nach unten verschoben.

Die Abbildungen verdeutlichen den Unterschied zwischen Ü2 und Ü3 und ermöglichen einen direkten Vergleich zwischen Ü3 und cyt und nuc.

Dieses Bandenmuster war nicht mit dem Rezeptorprofil der als Kontrolle dienenden T47D Zellen vereinbar. In den vorangegangenen Studien zu der Isoform C war für die Aufarbeitung ein anderes Protokoll verwendet worden. Diese Methode nach Weigel et al. (1992) trennt nach Zytosol (cyt) und Nukleosol (nuc) auf und verwendet für die Aufarbeitung der Kerne einen mit 0,5 M Natriumchlorid versetzten Puffer. Laut Wei et al. (1996) ist es ein Charakteristikum der Progesteronrezeptor Isoformen B und A, dass nach einer Hormonbehandlung für deren Extraktion aus den Kernen ein hoher Salzgehalt erforderlich ist. Dies treffe für PR-C ebenfalls zu.

Die Fraktion Ü3 wurde in den Versuchen nicht weiter verwendet. Die Fraktion Ü2, deren Bandenmuster dagegen gut mit dem der Methode nach Weigel et al. (1992) zu vergleichen war, wurde für die Versuche mit den Getrennten Zellen verwendet.



- A) Hier sind die verschiedenen Bandenmuster in Ü2 und Ü3 am Abradat H3306 mit dem AK MAB462 gezeigt. PR-B war in Ü2 meistens stärker nachweisbar, aber auch in Ü3 vorhanden. PR-A war in Ü3 nicht nachweisbar. Dafür detektierte der Antikörper eine Bande bei etwas über 100 kDa und eine Bande bei ca. 80 kDa. Die Bande bei 65 kDa war ebenfalls in Ü2 nachweisbar, in Ü3 war die Bande um ca. 10 kDa nach unten verschoben.
- B) Verdeutlichung besonders des kompletten Verschwinden von PR-A (H3309, PR10A9)
- C) Direkter Vergleich von Ü3 und nuc, welche beide den Inhalt der Zellkerne darstellen (H3309 Ü3 vs. H3445 nuc, MAB462)
- D) Darstellung von Abradaten Zytosol bzw. Nukleosol im Vergleich zu Ü3 (H3447, H3448, H3445 cyt und nuc vs. H3309 Ü3, MAB462)

Abb. 24: Beeinflussung durch verschiedene Aufarbeitungsmethoden

3.4.2 T47D-Zellen

Bei den T47D-Zellen wurden ebenfalls beide Methoden der Aufarbeitung verwendet. Anders als bei den Abradatproben und den Getrennten Zellen war im Western Blot in Ü3 das charakteristische Bandenmuster nachweisbar. Der einzige Unterschied zeigte sich in der Verteilung der Isoformen der Rezeptoren.

Auf einem die Untersuchungsergebnisse zusammenfassenden Gel wurden T47D-Zellen aufgetragen, die nach verschiedenen Verfahren aufgearbeitet wurden. Dabei wurden von einem Zellkulturabbruch jeweils die zytosolische und die nukleäre Fraktion nebeneinander aufgetragen. Man erkennt von links nach rechts zunächst zwei Abbrüche, die wie die getrennten Zellen in Ü2 und Ü3 aufgetrennt wurden, und rechts von dem Marker zwei Abbrüche, die wie die Abradate mit der Ultrazentrifugationsmethode nach Weigel et al. (1992) in Zytosol und Nukleosol aufgetrennt wurden.

Bei der ersten Methode finden sich die Isoformen B und A verstärkt in Ü2. Zwischen 60 und 70 kDa erkennt man die Bande für die Isoform C (Wei und Miner 1994). Diese ist in Ü2 und Ü3 etwa gleichstark nachzuweisen. Bei der Charge, die am 15.06.04 abgebrochen wurde, ist diese in Ü3 zwar etwas schwächer als in Ü2, der Unterschied zwischen der Intensität der Banden für PR-B und PR-A in Ü2 und Ü3 ist aber auch stärker ausgeprägt als bei der Charge, die am 30.05.04 abgebrochen wurde.

Die zweite Methode der Aufarbeitung folgt dem Protokoll von Weigel et al. (1992), welches auch Wei und Miner (1994) zum Nachweis des PR-C in T47D-Zellen verwendet haben. Die Intensität der Banden zeigt, dass PR-B im Nukleosol stärker exprimiert wird als im Zytosol. PR-A ist unterschiedlich stark exprimiert. PR-C ist eindeutig im Zytosol stärker exprimiert. Dies ist auch bei Wei und Miner (1994) derart beschrieben worden.

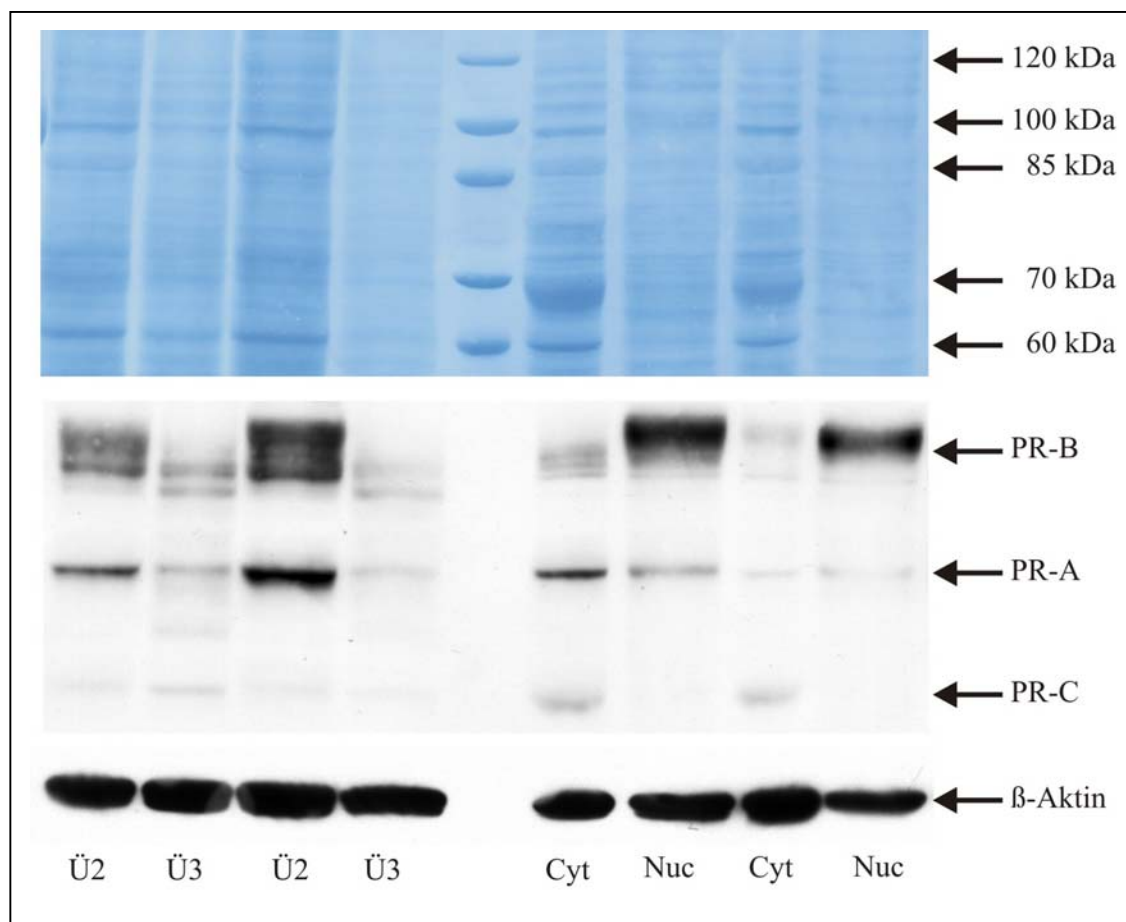


Abb. 25: T47D Zellen

70 T47D	30.05.04	30.05.04	15.06.04	15.06.04
	Ü2	Ü3	Ü2	Ü3
PR-B	2719	943	7674	542
PR-A	1308	349	4265	198
PR-C	149	146	130	84
β-Aktin	20234	22277	23223	18854
	04.08.04	04.08.04	23.09.04	23.09.04
	cyt	nuc	cyt	nuc
PR-B	869	7230	548	2889
PR-A	1760	296	85	96
PR-C	421	51	263	45
β-Aktin	19018	17628	24617	13114

Mit β -Aktin verrechnet:

70 T47D	30.05.04	30.05.04	15.06.04	15.06.04
	Ü2	Ü3	Ü2	Ü3
PR-B	0.134	0.042	0.330	0.029
PR-A	0.065	0.016	0.184	0.010
PR-C	0.007	0.007	0.006	0.004
	04.08.04	04.08.04	23.09.04	23.09.04
	cyt	nuc	cyt	nuc
PR-B	0.046	0.410	0.022	0.220
PR-A	0.093	0.017	0.003	0.007
PR-C	0.022	0.003	0.011	0.003

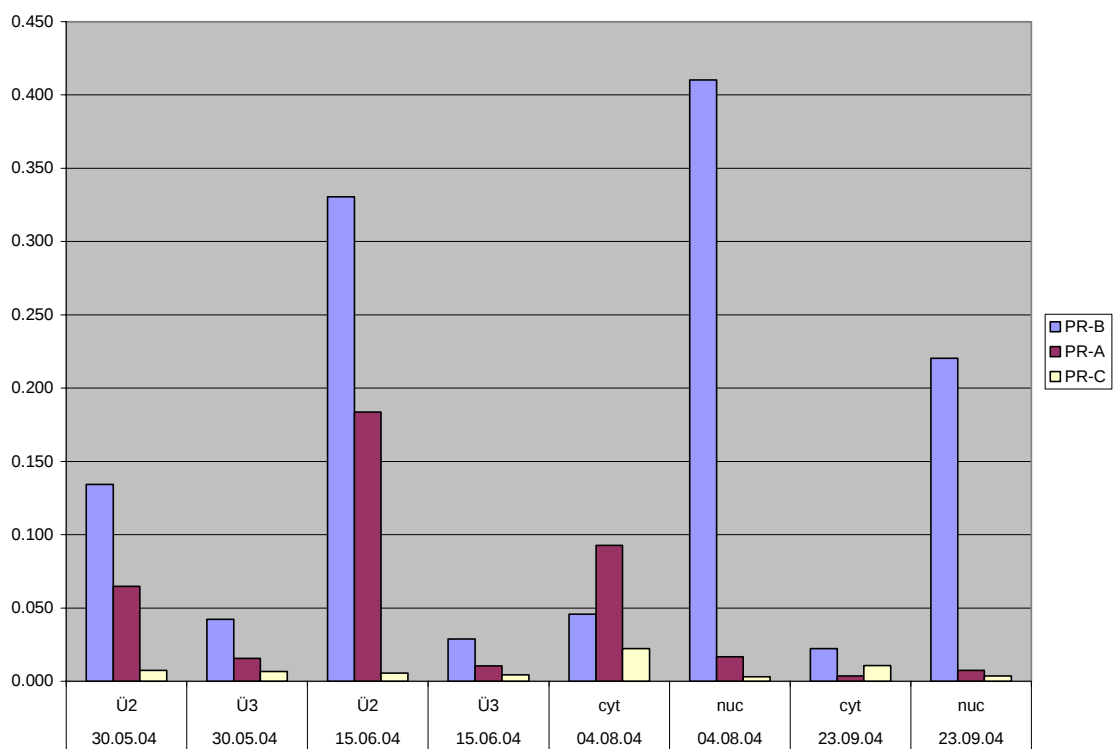


Abb. 26: T47D Zellen

4 Diskussion

4.1 Isoformen des Progesteronrezeptors

In diversen Geweben sind bisher zwei funktionell unterschiedliche Progesteronrezeptor-Isoformen, PR-B und PR-A, identifiziert worden (Horwitz und Alexander 1983). Diese zwei Proteine unterscheiden sich morphologisch nur darin, dass der Isoform A die ersten 164 Aminosäuren fehlen, welche in der Isoform B enthalten sind. PR-B und PR-A werden von unterschiedlichen mRNAs translatiert, welche unter der Kontrolle von unterschiedlichen Promotoren von demselben Gen transkribiert werden (Kastner et al. 1990b). In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien veröffentlicht, in denen mehr als diese beiden Isoformen beschrieben wurden. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu einer weiteren kleineren Isoform vorgenommen, die in der Literatur als PR-C bezeichnet wird. Dabei ist es von großer Bedeutung, welche Antikörper zum Nachweis der Progesteronrezeptoren verwendet werden, da nicht jede Isoform von jedem Antikörper überhaupt detektiert werden kann.

4.1.1 Spezifität der Antikörper

Die zur Untersuchung der verschiedenen PR-Isoformen verwendeten Antikörper Ab-6, Ab-7 und Ab-8 wurden von Clarke et al. (1987) hergestellt. Bei der Verwendung in der Immunhistochemie erkennt der Antikörper Ab-6 spezifisch die Isoform B, der Antikörper Ab-7 spezifisch die Isoform A und der Antikörper Ab-8 beide Isoformen B und A. Diese drei Antikörper binden am N-Terminus des Progesteronrezeptor Proteins und wurden von uns verwendet, um das Protein bei 65 kDa zu charakterisieren.

Anhand der Reaktion mit dem Antikörper Ab-6 ist die Aussage möglich, dass das Protein bei 65 kDa den N-Terminus des Progesteronrezeptors nicht enthält. Dieser Antikörper erkennt PR-B, nicht aber PR-A und somit ein Epitop am N-Terminus des Progesteronrezeptors, welches spezifisch für PR-B ist (Clarke et al. 1987). Weder PR-A noch das Protein bei 65 kDa wurden durch den Antikörper erkannt. Dies zeigt an, dass

dem Protein bei 65 kDa die N-terminale Bindungsregion fehlt, gegen die der Antikörper Ab-6 gerichtet ist.

Das Protein bei 65 kDa wurde aber auch durch die Antikörper Ab-7 und Ab-8 nicht erkannt. Diese Antikörper erkennen im Western Blot beide Isoformen B und A. Aus den Angaben des Herstellers geht hervor, dass sich das Epitop am N-Terminus befindet. Eine genaue Bindungssequenz ist dabei nicht angegeben. Bei einer Verwendung in der Immunhistochemie erkennt der Antikörper Ab-7 spezifisch die Isoform A. Das Epitop auf PR-B, welches von dem Antikörper Ab-7 im Immunoblot erkannt wird, ist nur nach der denaturierenden Gel-Elektrophorese zugänglich. Mote et al. (1999) erklären diese Änderung der Spezifität in verschiedenen Anwendungen folgendermaßen: Bei PR-B ist eine zusätzliche N-terminale Sequenz vorhanden. Diese verändert die Region mit der Bindungsstelle des Antikörpers Ab-7 derart in ihrer Konformation, dass das Epitop dem Antikörper in der Immunhistochemie nicht zugänglich ist.

Dass das Protein bei 65 kDa von keinem dieser drei am N-Terminus des Progesteronrezeptors bindenden Antikörper erkannt wird, lässt darauf schließen, dass es sich um eine verkürzte Form von PR-A handelt.

Daher wurden in unseren Versuchen Antikörper verwendet, die an den C-Terminus des Progesteronrezeptor-Proteins binden. Dabei standen zwei verschiedene Produkte zur Auswahl, der Antikörper PR10A9 der Firma Coulter Immunotech und der Antikörper MAB462 der Firma Chemicon. Bei beiden Antikörpern wurde die spezifische Bindungssequenz von zwölf Aminosäuren als 922AGMVKPLL FHKK933 am äußersten C-Terminus angegeben. Die Antikörper PR10A9 und MAB462 erkennen beide ein Protein mit einem Molekulargewicht von 65 kDa. Sie sind in der Lage, zusätzlich zu PR-B und PR-A alle am N-Terminus verkürzten Isoformen zu detektieren.

4.1.2 Nachweis des PR-C

Durch einen ähnlichen monoklonalen Antikörper C-262, der gegen die letzten 14 Aminosäuren des C-Terminus gerichtet ist, wurde in T47D-Zellen ein 60 kDa Protein entdeckt (Weigel et al. 1992). Dieser Antikörper wurde von Weigel et al. (1992) entwickelt, um funktionelle Studien der komplexen C-terminalen Domäne und den Nachweis von verkürzten Rezeptoren in Brustkrebszellen zu ermöglichen. Dieser

Antikörper sollte mit den Progesteronrezeptoren in allen Spezies reagieren, da die Bindungsregion in allen Progesteronrezeptoren, dessen Sequenzen bekannt sind, eine Übereinstimmung von 100% aufweist: Mensch (Kastner et al. 1990b), Kaninchen (Loosfelt et al. 1986), Huhn (Gronemeyer et al. 1987; Conneely et al. 1986).

Der Antikörper wurde später von der Firma Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada hergestellt, welche allerdings laut eigenen Angaben dieses Projekt beendet hat. Da die Sequenz, die der Antikörper C-262 und die beiden von uns verwendeten Antikörper binden bis auf zwei Aminosäuren identisch ist, sind die Ergebnisse der Antikörperreaktionen vergleichbar.

Beim Testen dieses Antikörpers wiesen Weigel et al. (1992) im Zytosol von T47D Zellen ein Protein mit der Größe von 60 kDa sowie zwei weitere Banden mit einem noch niedrigeren Molekulargewicht von 50-55 kDa nach. In Versuchen mit Brustkrebszellen der Linie MDA231, welche den Progesteronrezeptor nicht exprimieren, ließ sich das 60 kDa Protein nicht nachweisen. Die beiden Banden bei 50-55 kDa aber waren nachweisbar und ließen somit auf unspezifische Bindungen schließen. Hier wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei diesem 60 kDa-Protein um ein Degradationsfragment des Rezeptors handele, da die relative Menge des nachweisbaren Proteins von einer Aufarbeitung zur nächsten variierte und dieses Protein von dem monoklonalen Antikörper AB-52, der gegen den N-Terminus des menschlichen Progesteronrezeptors gerichtet ist, nicht erkannt wurde.

Wei und Miner (1994) haben in T47D Zellen dieses Protein mit der Größe von 60 kDa mit dem Antikörper C-262 nachweisen können und weitergehend untersucht. In vorangegangenen Studien (Wei et al. 1990) waren bereits neun verschiedene Progesteronrezeptor-Transkripte beschrieben worden und Hinweise auf eine dritte, am N-Terminus verkürzte Isoform erbracht worden. In der Studie von 1994 wurde mithilfe der Messung der Photoaffinität festgestellt, dass das 60 kDa Protein in der Lage ist, Progestin zu binden. In der Anwesenheit von R5020, Progesteron oder RU468 waren sowohl die Isoformen B und A als auch die von hier an C genannte Isoform unfähig, Progestin zu binden. Auch bei der Inkubation mit Progesteron oder R5020 verhielt sich PR-C wie die beiden Isoformen B und A und wanderte in den Kern. Eine verlängerte Inkubation der nukleären Extrakte bei erhöhten Temperaturen resultierte nicht in einer

Akkumulation des PR-C. Jedoch war die Menge an mittels der Photoaffinität messbarem PR-B und PR-A verringert. Dies stützte die Hypothese, dass das 60 kDa Protein kein Degradationsprodukt der beiden größeren Isoformen sei, sondern ein eigenes progestinbindendes Protein. Die beiden mRNAs 11.4III und IV waren nicht nur in T47D Zellen sondern auch in MCF7 sowie im humanen Endometrium nachweisbar.

4.1.3 Funktion der Isoform C

In einer weiteren Studie zur Funktion der Isoform C des Progesteronrezeptors von Wei et al. (1996) wurde nachgewiesen, dass PR-C in vitro durch Translation von einer downstream Methionin Start Sequenz hergestellt werden kann und dass dieses Protein fähig ist, R5020 sowie RU468 zu binden. Dazu wurde ein Teil der cDNA des Progesteronrezeptors, beginnend mit der möglichen Startregion Met595, bis zum C-terminalen Ende des Progesteronrezeptors Lys933 in einen Expressionsvektor eingebracht (pSG5). Da in progesteronrezeptor-negativen HeLa-Zellen eine Progesteronbindung messbar war, nachdem die DNA des PR-C in diese transfiziert worden war, wurde die Schlussfolgerung aufgestellt, dass PR-C auch in vivo von Met595 translatiert werden kann. Weiterhin wurde festgestellt, dass in T47D Zellen transfizierte PR-C cDNA zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität führte, allerdings nur in Anwesenheit von PR-B und PR-A. Die antagonistische Wirkung von Antiprogestinen wurde nicht beeinflusst. Die Möglichkeit, dass PR-C von einer anderen Startstelle Met632 translatiert werden könnte, wurde für unwahrscheinlich gehalten, da mehrere Gruppen gezeigt hatten, dass beim Vorhandensein von zwei verschiedenen Translationsstartstellen der Gebrauch des ersten Startcodons konsequent vorgezogen wird (Kastner et al. 1990a); (Vegeto et al. 1993); (Sartorius et al. 1994).

PR-C wurde durch Wei et al. (1997) weitergehend charakterisiert. In einer Co-Immunopräzipitationsstudie wurde gezeigt, dass PR-B und PR-C in vivo Dimere bilden. PR-C behindert allerdings die Bindung von PR-B an DNA. In Hormonbehandlungsstudien wurde gezeigt, dass die nukleären Spiegel von PR-C parallel zu denen der beiden größeren Isoformen laufen, sowohl bei Progestinen als auch bei Antiprogestinen.

Die Regionen, die für die Bildung von Rezeptor-Dimeren und für die Bindung von Hitzeschockproteinen verantwortlich sind, befinden sich am C-Terminus im Bereich der

Hormonbindungsdomäne. Auch wenn dieses Protein nicht in der Lage ist, an die DNA zu binden, so könnte es doch durch die Bildung von Dimeren mit den beiden anderen Isoformen diese antagonisieren.

Auch für die beiden größeren Isoformen PR-B und PR-A sind unterschiedliche Funktionen beschrieben worden. Während PR-B als Aktivator der Transkription von Zielgenen gilt, wirkt PR-A als Inhibitor. Morphologisch unterscheidet sich PR-A von PR-B dadurch, dass dieser Isoform die ersten 164 Aminosäuren am N-Terminus fehlen. In diesen ersten 164 Aminosäuren befindet sich eine dritte Aktivierungsdomäne (AF3) (Sartorius et al. 1994). Diese besitzt somit nur die Isoform B und wird somit für die unterschiedlichen Funktionen der beiden Isoformen verantwortlich gemacht. So kann PR-A als sehr potenter Inhibitor auf die transkriptionelle Aktivität der Isoform B wirken (Vegeto et al. 1993). Dies wird durch eine inhibierende Domäne (ID) ermöglicht, welche sich innerhalb der ersten 140 Aminosäuren der Isoform A befindet (Giangrande et al. 1997). Diese ist somit ebenfalls in der Isoform B vorhanden, wird dort aber durch die oben beschriebene dritte Aktivierungsfunktion aufgehoben (Hovland et al. 1998). Die verschiedenen Domänen der Isoformen des Progesteronrezeptors sind in der Abbildung 1 in der Einleitung graphisch dargestellt.

4.1.4 PR-C im humanen Endometrium

Eine exakte Aussage, um was für ein Protein es sich bei der Bande bei 65 kDa handelt, die wir im humanen Endometrium nachweisen konnten, ist nicht möglich. Dies ließe sich nur durch eine Sequenzierung per Massenspektrometrie (MSMS) oder noch genauer durch einen Edman-Abbau analysieren. Bei einem Edman-Abbau erfolgt ein Abbau einer Peptidkette vom N-Terminus her und man erhält einzelne Aminosäuren. Bei der Massenspektrometrie werden die eingebrachten Proben verdampft und destabilisiert. Danach werden die Ionen nach Ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und anschließend detektiert. Unsere Versuche der Sequenzierung per MSMS waren bisher leider erfolglos, nicht nur für PR-C, sondern auch die beiden größeren Isoformen konnten nicht nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen sind eine zu geringe Konzentration der Progesteronrezeptoren in den Lysaten. Bei einem Nachweis mittels spezifischer Antikörper und der nachfolgenden Chemilumineszenz-Reaktion können nämlich bereits sehr geringe Konzentrationen sichtbar gemacht

werden. Mithilfe dieser Sequenzierung per MSMS ließe sich zumindest die Aussage treffen, dass es sich bei dem nachgewiesenen Protein um einen Teil des Progesteronrezeptors handelt.

Kastner et al. (1990b) hatten in T47D Zellen die Isoformen B und A sequenziert, allerdings nicht mittels MSMS.

Es ist aber vorstellbar, dass wie in den T47D Zellen gezeigt (Wei und Miner 1994), auch im humanen Endometrium mehr als zwei Isoformen des Progesteronrezeptors exprimiert werden und es sich dabei nicht nur um proteolytische Spaltprodukte handelt. So sind im humanen Endometrium veränderte mRNAs des Progesteronrezeptors nachgewiesen worden, denen verschiedene Exons fehlen (Misao et al. 1998). Nach der Translation dieser mRNAs entstehen progesteronrezeptor-ähnliche Proteine, denen funktionelle Domänen fehlen würden. Diese könnten die Funktionen der Wildtyp Progesteronrezeptoren modulieren (Misao et al. 2000). Diese Gruppe hat mRNAs amplifiziert, zum einen innerhalb der Region von Exon 1 bis Exon 8 – bezogen auf PR-B und PR-A, zum anderen innerhalb der Region von Exon 3 bis Exon 8 – bezogen auf PR-B, PR-A und PR-C. Die mRNA, der das Exon 5 und 6 fehlt, die im normalen humanen Endometrium und endometriotischem Gewebe nachgewiesen werden konnte, konnte nur innerhalb der Region zwischen Exon 3-8 nachgewiesen werden und somit wurde angenommen, dass sie sich von PR-C ableitet. Die PR-C cDNA enthält nämlich nur die Exons 3-8, Exon 1 und der größte Teil von Exon 2 fehlen.

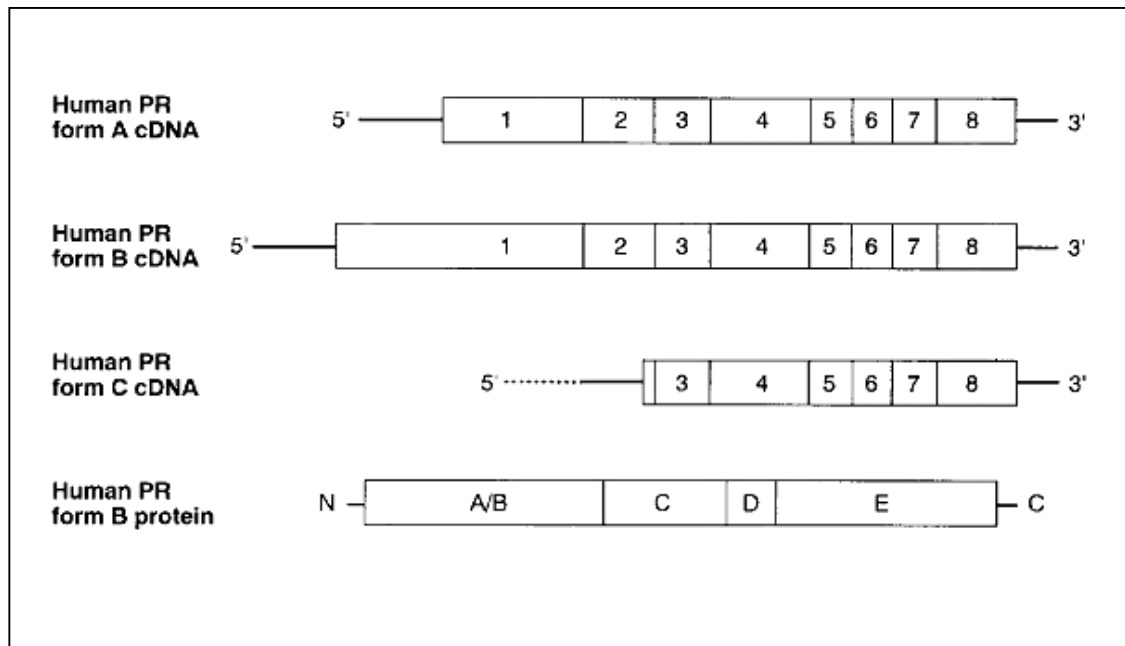


Abb. 27: cDNAs der drei Isoformen abgewandelt nach Misao et al. (2000) mit den Exons 1-8

Die ersten Beweise, dass zumindest in T47D Zellen eine dritte Progesteronrezeptor-Isoform exprimiert wird, liegen nun seit 1994 vor (Wei und Miner 1994). Ob PR-C in allen progesteronrezeptor-positiven Geweben vorkommt, ist nicht gut untersucht. Dieser kann nur durch Antikörper, die an den C-Terminus des Progesteronrezeptor-Proteins binden, erkannt werden, und in den meisten Studien zur Untersuchung der Progesteronrezeptor-Isoformen werden N-terminal bindende Antikörper verwendet. In den diversen Studien, die zu Progesteronrezeptoren veröffentlicht werden, wird diese Isoform entweder ignoriert und weiterhin geschrieben, der Progesteronrezeptor existiere in zwei Isoformen oder er wird als solcher beschrieben, meist im Western Blot und eine Bande auf der Höhe von ca. 60 kDa als solche benannt (Goldman et al. 2005), was nicht unbedingt ein Beweis ist, dass es sich tatsächlich um eine Progesteronrezeptor-Isoform handelt. In einigen Veröffentlichungen werden auch alle im Western Blot mit Antikörpern gegen den humanen Progesteronrezeptor nachweisbaren Banden als Progesteronrezeptoren bezeichnet. Es stellt sich immer wieder die Frage, ob es sich nun um Spaltprodukte handelt oder um Rezeptoren und wie man diese definiert. Saner et al. (2003) konnten zum Beispiel in menschlichen Endothelzellen der Aorta mittels PCR ein Transkript nachweisen, welches nach Expression in einem S9 Vektor ein Protein mit

einem Molekulargewicht von 38 kDa ergab. Dieses wurde PR-M genannt und konnte mithilfe der Antikörper C19 und C20 der Firma Santa Cruz auch in T47D Zellen nachgewiesen werden.

Marshburn PB et al. (2005) konnten in 88 Proben normalem Endometriums, den Nachweis mehrerer veränderter mRNAs erbringen, denen Exons fehlen. Diese waren gleichartig reguliert wie die Wildtyp mRNAs.

Theoretisch müssten bei der Entstehung von Spaltprodukten zumindest ein Teil dieser einen N-Terminus aufweisen und in Western Blots bei Reaktionen mit N-terminal bindenden Antikörpern als zusätzliche niedermolekulare Banden zu erkennen sein.

4.1.5 Unsere Ergebnisse der Regulation von PR-C

Die von uns erzielten Ergebnisse lassen sich mit keinen vorherigen Studien vergleichen, da die Isoform C im Endometrium bisher nicht nachgewiesen wurde. In einigen Punkten lassen sich aber Vergleiche zu den Studien an T47D Zellen ziehen.

Die Isoform C des Progesteronrezeptors ist ähnlich reguliert wie die beiden größeren Isoformen B und A. Dabei ist diese durchweg schwächer exprimiert. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Weigel et al. (1992) und Wei und Miner (1994), welche diese Isoform in T47D Zellen untersucht haben.

Bei der Unterscheidung, ob die Isoformen des Progesteronrezeptors im Zytosol oder Nukleosol stärker exprimiert werden, ist bei PR-C im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen eine Festlegung häufig nicht möglich, da nicht eindeutig zu erkennen ist, ob die Bande der Isoform C im Zytosol oder Nukleosol eine stärkere Intensität aufweist. Wenn man allerdings in einem zweiten Schritt die Proben auswertet, bei denen eine Festlegung möglich ist, so ist PR-C in 79% der Proben im Zytosol stärker exprimiert, wobei sich diese Untersuchung auf Abradate bezieht. Auch Wei und Miner (1994) konnten PR-C vornehmlich in der zytosolischen Fraktion der untersuchten T47D Zellen nachweisen. In unseren Untersuchungen von T47D Zellen ist die Isoform C ebenfalls eindeutig im Zytosol stärker exprimiert. In diesem Punkt stimmen unsere Ergebnisse also überein und im humanen Endometrium gleicht die Verteilung in den verschiedenen Zellkompartimenten der in T47D Zellen.

4.1.6 Wirkungsmechanismus von PR-C in humanen Geweben

Insgesamt muss bedacht werden, dass je kürzer die Isoform wird, sie in Funktion bzw. Aufgabe nicht mehr den „großen“ Isoformen entsprechen kann, da ihr die entsprechenden Domänen fehlen. So ist PR-C nicht in der Lage, an die DNA zu binden, die Bindung von Liganden ist aber ebenso noch möglich wie die Bildung von Dimeren z.B. mit PR-B, was in T47D Zellen zu einer Behinderung der Bindung von PR-B an die DNA führte (Wei et al. 1996). So könnte PR-C zum Beispiel eine Kontrollfunktion im Bereich der Translationsregulation ausüben, indem es wie oben beschrieben, die Bindung von größeren Isoformen an die DNA beeinflusst.

Da der Isoform C der erste Zinkfinger fehlt und diese damit nicht fähig ist, an die DNA zu binden, ist zu vermuten, dass PR-C nicht über die Aktivierung der Transkription und demnach über einen nicht-klassischen Weg wirkt. Für Progesteron sind mehrere Wege der nicht klassischen Wirkungsweise diskutiert (Falkenstein et al. 2000). In verschiedenen Geweben sind sehr schnelle Wirkungen des Progesterons nachgewiesen worden, die in dieser Zeit nicht über den klassischen Weg laufen können (Bielefeldt et al. 1996; Sabeur et al. 1996; Revelli et al. 1998; Fomin et al. 1999).

4.1.7 PR-C in humanen Geweben

Condon et al. (2006) wiesen die Isoform C des Progesteronrezeptors im menschlichen Myometrium des schwangeren Uterus nach. Sie zeigten eine vermehrte Expression gegen Ende der Schwangerschaft der Isoformen B und C auf. Daraus schlossen sie eine durch PR-C verminderte Fähigkeit von PR-B, Progesteron zu binden, und somit eine Abschwächung der Ruhigstellung des Myometriums durch Progesteron und eine Einleitung der Geburt.

Ebenfalls konnte die Isoform C des Progesteronrezeptors durch Goldman et al. (2005) in humaner Dezidua nachgewiesen werden. Unter der Verwendung eines polyklonalen Antikörpers aus dem Kaninchen gegen den humanen Progesteronrezeptor konnte im Western Blot PR-C bei einem Molekulargewicht von 60 kDa dargestellt werden. Zusätzlich zu PR-B, PR-A und PR-C wurden zwei weitere potenzielle Isoformen bei 45 und 36 kDa gezeigt. Bei der Untersuchung der Veränderung im Expressionsprofil der Isoformen wurden Deziduaprobe ohne und mit zuvor stattgehabten Kontraktionen

verglichen. Dabei kam es durch die Kontraktionen zu einer starken Abnahme der Expression aller fünf Isoformen. PR-C konnte weiterhin im Amnion ohne vorangegangene Kontraktionen nachgewiesen werden. Dort waren PR-C und die Isoform bei 36 kDa die am stärksten exprimierten Isoformen.

Obwohl man die Möglichkeit nicht ausschließen kann, dass die beiden kleinen Isoformen bei 45 und 36 kDa Degradationsprodukte sind, haben diverse Publikationen über die Expression von Progesteronrezeptor-Isoformen mit kleinerem Molekulargewicht berichtet, die in Struktur und Aktionsmechanismus vom klassischen nukleären Rezeptor abweichen. El-Hefnawy et al. (2000) konnten in Leydig-Zellen der Maus eine ungewöhnliche Form eines Progesteronrezeptors nachweisen, die in Struktur und Funktion wahrscheinlich mit einer in der Membran lokalisierten Form des Progesteronrezeptors verwandt ist. Diese wurde in der zytoplasmatischen Membran von Spermien charakterisiert (Luconi et al. 1998). Die Expression von einer ungewöhnlichen Progesteronrezeptor-Isoform wurde in Granulosazellen des Rindes beschrieben, welche in der Zellmembran lokalisiert ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Progesteron mit steigender Follikelgröße signifikant abnahm, was andeuten könnte, dass diese membranständigen nicht-genomischen Rezeptoren entwicklungsgemäß reguliert sind (Rae et al. 1998a; Rae et al. 1998b).

4.1.8 PR-C in anderen Spezies

In welchen Geweben oder Spezies PR-C nachweisbar ist, kann nur in Studien untersucht werden, in denen ein C-terminal bindender Antikörper verwendet wird.

Inzwischen konnte die Isoform C des Progesteronrezeptors auch im Rind nachgewiesen werden: So zum Beispiel von Schams et al. (2003) im Brustgewebe und im Endometrium des Rindes. Dies erfolgte im Western Blot unter der Verwendung des Antikörpers PR10A9, den auch wir für unsere Versuche benutzt haben. Dabei konnte für PR-C eine Bande bei 65kDa gezeigt werden. Diese war bisher für das Rind nicht beschrieben worden. Alle drei Isoformen ließen sich im Drüsengewebe der Brust nur bei nicht schwangeren Färsen, also jungen Kühen nachweisen; dabei wurde Endometrium als Positivkontrolle verwendet.

Genauere Untersuchungen zu der Isoform C wurden durch Ogle (2002) an Ovarien der Ratte durchgeführt. Hier wurde gezeigt, dass PR-C sowie die beiden größeren Isoformen B und A von zwei verschiedenen Antikörpern erkannt wurden, von denen einer (h928) an die Hinge Region des Progesteronrezeptor-Proteins und der andere an die Bindungsstelle für Liganden (C-262) bindet. Beide Bindungsstellen sind genau definiert, liegen auf dem Protein aber weit voneinander entfernt. PR-C war hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und war nach dem 10. Schwangerschaftstag die dominanteste Form. Weiterhin führte eine Blockade der Progesteronwirkung durch RU468 zu einem Verschwinden der Isoformen B und A, PR-C war aber weiterhin stark exprimiert (Ogle et al. 1998). So waren in der Dezidua der Ratte nach in vivo Hormonbehandlungen immer noch Hormonbindungsstellen mit hoher Affinität nachweisbar, obwohl PR-B und PR-A sehr gering oder gar nicht mehr vorhanden waren. In vorangegangenen Studien hatte diese Gruppe gezeigt, dass in Homogenaten der Dezidua Basalis der Spätschwangerschaft noch Progesteron-Bindungsstellen vorhanden waren, was mit einer weiterhin starken Expression von PR-C korrelierte, wobei PR-B und PR-A nicht mehr exprimiert wurden (Ogle et al. 1997). Die primär zytosolische Lokalisation wurde durch das Fehlen des ersten Zinkfingers, wie durch Wei et al. (1996) beschrieben, erklärt. Die Autoren stellten die These auf, dass PR-C eine Köderfunktion haben könnte und auf diesem Weg eine Art Senke für Progesteron darstellen könnte, um die Stromazellen vor Progesteron und seiner apoptotischen Wirkung zu bewahren.

4.1.9 Andere Thesen

In einer Studie von Peluso et al. (2003) wurde im Western Blot bestätigt, dass der AK C-262 ein 60kDa progesteronbindendes Protein in Lysaten aus Ovarien der Ratte erkennt. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe (Peluso et al. 2004) wurde das durch den C-262 AK detektierte 60kDa Protein mit einer C-262 Affinitätssäule isoliert und mit Massenspektrometrie sequenziert. Diese Analyse deckte auf, dass das durch C-262 detektierbare Protein ein unbenanntes Protein, bezeichnet als RDA288, ist. Eine RT-PCR zeigte, dass RDA288 mRNA in SIGCs (Spontaneously Immortalized Granulosa Cells), unreifer Rattenovarien, Lunge und Skelettmuskel vorhanden war, nicht aber in verschiedenen anderen Organen (z.B. Uterus). Hier wurde also mit dem gleichen Antikörper, den auch Wei und Miner (1994) verwendet hatten, ein

progesteronbindendes Protein nachgewiesen, das sich aber in einer Sequenzierung mittels Massenspektrometrie als ein bisher unbekanntes Protein herausstellte.

4.1.10 Weitere verkürzte Progesteronrezeptor-Proteine in Brustkrebszellen

Durch Yeates et al. (1998) konnte in T47D Zellen sowie in anderen Brustkrebszellen durch ein Gemisch der Antikörper Ab-6 und Ab-7 im Immunoblot ein Protein der Größe 78 kDa nachgewiesen werden. Dieses war in der Lage, einen Liganden zu binden, und es gab keine Beweise, dass das 78 kDa Protein durch proteolytische Spaltung aus den Isoformen B und A entstehen könnte. Die gefundenen Progesteronrezeptor Transkripte, denen Exons fehlten, hätten nur zu Isoformen mit einem kleineren Molekulargewicht führen können, was die Autoren zu dem Schluss kommen ließ, dass das 78 kDa Protein von PR-A abstamme. So könnten posttranskriptionale Veränderungen des Transkripts oder eine Mutation des Progesteronrezeptor-Gens eine Ursache darstellen. Als weitere Ursachen kämen eine posttranslationale Modifizierung durch Phosphorylierung oder eine in vivo Prozessierung in Frage.

4.2 Regulation der Isoformen im Endometrium

Da bei unseren Untersuchungen der Expression der Isoform C des Progesteronrezeptors von dem verwendeten Antikörper die beiden größeren Isoformen B und A ebenfalls erkannt werden, lassen sich unsere Ergebnisse mit denen ähnlicher Untersuchungen vergleichen. Da bei den bisherigen Studien zu PR-B und PR-A Antikörper verwendet wurden, die am N-Terminus des Progesteronrezeptor-Proteins binden, konnte die dort verkürzte Isoform C nicht nachgewiesen werden.

4.2.1 Literaturvergleich

Die Expression der Isoformen B und A im menschlichen Endometrium und deren zyklusabhängige Schwankung wurde bereits von einigen Autoren beschrieben, jedoch mit teilweise leicht abweichenden Ergebnissen und meist einer geringeren Anzahl an Proben.

Mangal et al. (1997) haben an Endometriumbiopsien eine Zyklusabhängigkeit der Isoformen A und B des Progesteronrezeptors nachgewiesen. Dabei wurde aufgrund der

im Vergleich zu T47D Zellen geringeren Mengen an exprimiertem Progesteronrezeptor vor der Analyse im Immunoblot eine Immunoprecipitation mit dem Antikörper AB-52 (Santa Cruz) durchgeführt. In dieser Studie wurden die Proben, um bessere Vergleiche ziehen zu können, in Gruppen eingeteilt, basierend auf der bekannten Fluktuation der Steroidhormone:

- Frühe Follikelphase: 2-8, kein Progesteron, vor dem Östrogenanstieg
- Späte Follikelphase: 9-13, Östrogen steigt bis zum Höhepunkt
- Periovulatorische Phase: 14-16, Östrogen fällt stark ab, Progesteron beginnt anzusteigen
- Frühe Lutealphase: 18-23, steigende Werte für Östrogen und Progesteron
- Späte Lutealphase: 23-Ende, sinkende Werte für Östrogen und Progesteron

Es wurden die Verhältnisse zwischen PR-B und PR-A bestimmt. Die Isoformen waren den gesamten Zyklus über nachweisbar, aber PR-B war nur in der periovulatorischen Phase stark ausgeprägt, so dass sich das Verhältnis von PR-A zu PR-B hier an den Wert 1 annäherte. In der frühen Follikelphase und der Lutealphase betrug es 10:1. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Östrogen die Expression von PR-B induziere und Progesteron diese im Gegenzug reduziere. PR-A sei im Gegensatz zu PR-B viel weniger sensitiv auf hormonelle Manipulation.

Attia et al. (2000) haben ebenfalls mittels Western Blot nach Immunoprecipitation unter der Verwendung des Antikörpers AB-52 (Santa Cruz) einen Vergleich der Level an PR-B und PR-A angestellt. Dabei wurde an 18 Frauen mit Endometriose zu unterschiedlichen Phasen des Menstruationszyklus eine simultane Biopsie des Endometriums und des endometriotischen Gewebes vorgenommen. Dabei war es dieser Gruppe möglich, zyklische Veränderungen in der Expression der Progesteronrezeptor-Isoformen im eutrophen Endometrium zu zeigen. Die höchsten Level an PR-B wurden in der periovulatorischen Phase (Zyklustag 10-14) beobachtet und nahmen im Verlauf der Sekretionsphase ab. Obwohl die Level des PR-A einem ähnlichen Muster folgten, waren hier die Veränderungen nicht so stark ausgeprägt.

Durch die Analyse von einzelnen Zellen mittels Immunfluoreszenzdoppelmarkierung konnten Mote et al. (1999) nachweisen, dass PR-A und PR-B in den Zielzellen des

menschlichen Uterus koexprimiert sind. Diese Gruppe kam nach der Untersuchung von 26 Proben zu dem Ergebnis, dass in der Proliferationsphase PR-B und PR-A im Epithel stärker exprimiert wird als im Stroma und dass beide Isoformen im Verlauf der Proliferationsphase zunehmen. Dies wird durch eine Induktion durch Östrogen erklärt. Im Epithel zeigten PR-B und PR-A ähnlich hohe Konzentrationen, im Stroma war PR-A die stärker exprimierte Isoform. In der frühen Sekretionsphase ließen sich die Progesteronrezeptoren im Epithel schwächer nachweisen als in der Proliferationsphase. In der mittleren Sekretionsphase nahm die Expression weiter ab, wobei PR-B die dominante Isoform war; in der späten Sekretionsphase waren die Drüsen progesteronrezeptor-negativ. Im Stroma sank die PR-B Konzentration ähnlich wie im Epithel, aber nicht ganz so stark. PR-A war während der gesamten Sekretionsphase nachweisbar und immer als die stärkere Isoform, mit einer eventuellen Steigerung in der mittleren Sekretionsphase. Dies wird hier auf den bekannten zweiten Östrogen-Peak im Serum zurückgeführt.

Bei den Untersuchungen waren PR-A und PR-B im Drüsenepithel vor der subnukleären Bildung von Vakuolen und Glykogenbildung in vergleichbaren Mengen exprimiert, was den Autoren zufolge beide Isoformen in diesen Prozess verwickelt. Die Persistenz von PR-B, nicht aber PR-A in den Drüsen während der mittleren Sekretionsphase suggeriere allerdings die Möglichkeit, dass PR-B in der glandulären Sekretion eine signifikantere Rolle spiele als PR-A in der späten Sekretionsphase. In den Stromazellen verwickelte das Vorherrschen von PR-A über den Zyklus diese Isoform in progesterongesteuerten Veränderungen wie dem Stromaödem, den Stromamitosen und der Prädezidualisierung.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Ansicht, dass PR-A und PR-B im Drüsengewebe und Stroma des menschlichen Uterus während des Menstruationszyklus unterschiedliche Reaktionswege der Progesteronwirkung vermitteln.

Wang et al. (1998) haben ebenfalls mittels Immunhistochemie an normalem Endometrium und an Dezidua der Frühschwangerschaft die Expression der Isoformen B und A untersucht. Dabei haben sie keinen spezifischen Antikörper gegen PR-A verwendet, sondern nur einen spezifischen für PR-B, alle Analysen von PR-A sind also subtraktive Rückschlüsse. An 40 Endometriumproben, 5 von jeder Phase des Zyklus,

und 10 Deziduaprobeen konnten sie mit einem monoklonalen Antikörper der Firma Novocastra (NCL-PgR) hohe Level der beiden Progesteronrezeptor-Isoformen im Epithel in der Proliferationsphase bis in die mittlere Sekretionsphase nachweisen, im Stroma fanden sich in der Sekretionsphase immer hohe Level. Mit einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, der gegen den N-Terminus, den nur B hat, gerichtet ist, fand sich ein Peak in der mittleren Proliferationsphase; danach waren die Level aber abfallend und ab der mittleren Sekretionsphase sehr schwach. Daraus zogen Wang et al. (1998) die Schlussfolgerung, dass in den Drüsen in der Sekretionsphase ein dramatischer Abfall der beiden Isoformen vorliegt, PR-A aber im Stroma in der Sekretionsphase und Frühschwangerschaft als dominante Form erhalten bleibt.

4.2.2 Unsere Ergebnisse

In unserer Arbeit wurden an vergleichbarem Material Untersuchungen mittels Western Blot durchgeführt. Dabei wurde allerdings ein anderer Antikörper (PR10A9) verwendet, der jedoch ebenfalls in der Lage war, die beiden Isoformen B und A zu erkennen.

In den Western Blots an Abradaten, die sowohl Epithel- als auch Stromazellen enthalten, konnten wir wie auch Mangal et al. (1997) eine Dominanz von PR-A gegenüber PR-B nachweisen; allerdings war diese bei uns in der Zeit um den 17.-19. Zyklustag aufgehoben, danach dominierte PR-B. Siehe hierzu Abb. 9 und Abb. 11. Dies gilt sowohl für das Zytosol als auch für das Nukleosol. Bei Mangal et al. (1997) erreichte PR-B in der periovulatorischen Phase die Level von PR-A.

Die bei uns erzielten Ergebnisse der Untersuchungen an den Getrennten Zellen kann man gut mit der Studie von Mote et al. (1999) vergleichen. Dabei konnten bei uns Epithel- und Stromazellen sowie die Isoformen B und A getrennt beurteilt werden. Wie auch Mote et al. (1999) konnten wir in der Proliferationsphase die stärksten Signale messen und zeigen, dass im Verlauf der Sekretionsphase in den Epithelzellen ein stärkerer Abfall auftrat als in den Stromazellen. In der Sekretionsphase konnten auch wir im Epithel für PR-B eine stärkere Expression nachweisen als für PR-A. Siehe hierzu Abb. 17. Von der mittleren Proliferationsphase bis in die frühe Sekretionsphase war PR-A im Stroma stärker als PR-B. Allerdings konnten wir im Epithel auch in der späten Sekretionsphase noch ganz schwache Banden nachweisen. Und die Dominanz von PR-A im Stromakompartiment war nicht eindeutig messbar, da die Banden von PR-B

häufig breiter waren. Dass bei uns in den Drüsen auch in der späten Sekretionsphase noch Progesteronrezeptoren nachweisbar sind, lässt sich vor allem dadurch erklären, dass die Expression in der Basalis des Drüsenepithels im Gegensatz zur Funktionalis weniger starke Schwankungen aufweist. Diesen Unterschied kann man nur mit der Methode der Immunhistochemie herausarbeiten; im Western Blot ist dies nicht möglich, da bei der Gewinnung des Abradatmaterials das Endometrium samt der Basalis abradiert wird. Somit werden bei den Reaktionen an den Getrennten Zellen beim Epithel immer die Basalis und Funktionalis gemeinsam untersucht.

Den Peak für PR-B, den Wang et al. (1998) in den Drüsen der mittleren Proliferationsphase nachweisen konnten, können wir mit unseren Western Blots an Getrennten Zellen bestätigen. Siehe hierzu Abb. 13.

Beim Vergleich der Ergebnisse muss man immer noch beachten, dass unterschiedliche Antikörper verwendet wurden und es denkbar ist, dass diese auch entsprechend unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Isoformen des Progesteronrezeptors haben können, selbst wenn diese in gleichen Mengen vorhanden sein sollten.

Da das Protein der Isoform C noch nie im humanen Endometrium nachgewiesen wurde, gibt es dementsprechend auch keine Studien zu deren eventuell zyklusabhängiger Regulation. Ein Literaturvergleich ist somit nicht möglich.

4.3 Mögliche klinische Relevanz

Die Expression und Verteilung der Progesteronrezeptor-Isoformen spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und als Prognosefaktoren von gynäkologischen Erkrankungen. Es besteht zum Beispiel die Möglichkeit, dass Varianten des Progesteronrezeptors, die durch Splicen verändert wurden, bei der Pathogenese von hormonabhängigen Tumoren eine Rolle spielen. Als Beispiele seien hier das Endometrium- und das Mammakarzinom sowie als pathologische Störung die Endometriose diskutiert.

4.3.1 Endometriose

Endometriose ist definiert als das Vorkommen von dem Endometrium ähnelndem Gewebe außerhalb des Cavum uteri. Sie ist eine der häufigsten Ursachen von Infertilität

und chronischem Unterbauchschmerz und betrifft eine von zehn Frauen im gebärfähigen Alter (Eskenazi et al. 1997). Attia et al. (2000) haben in einer Studie die unterschiedliche Expression von PR-B und PR-A in normalem Endometrium und endometriotischem Gewebe verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass endometriotisches Gewebe kein PR-B und nur sehr geringe Level an PR-A enthält. Zudem findet sich keine zyklische Variation von PR-A. Dadurch lässt sich die Resistenz gegenüber Progesteron erklären, die in endometriotischem Gewebe auftritt. Ob außer einem veränderten Verteilungsmuster der Progesteronrezeptoren in endometriotischem Gewebe auch eventuell andere Isoformen zusätzlich zu PR-B und PR-A auftreten, ist bisher nicht untersucht worden.

Weitere Unterschiede zu gesundem Endometrium zeigen sich in der Genexpression. Durch Kao et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass im Endometrium von Frauen, die unter Endometriose leiden, Gene, die durch Progesteron beeinflusst werden, anders reguliert werden als im Endometrium gesunder Frauen. Darunter waren auch Gene, die die Einnistung embryonaler Strukturen beeinflussen und somit Erklärung dafür sein können, dass bei vielen Frauen mit Infertilität eine Endometriose nachgewiesen werden kann.

In der Entwicklung und dem Fortbestehen einer Endometriose spielt das Hormon Östradiol (E2) eine wichtige Rolle. Durch das Enzym 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (17 β -HSD) wird Östradiol (E2) zu Östron (E1) umgewandelt und somit inaktiviert (Wu et al. 1993). Diese Umwandlung wird durch Progesteron stimuliert (Satyaswaroop et al. 1982). In endometriotischem Gewebe konnte durch Bulun et al. (2006) in der Sekretionsphase kein 17 β -HSD nachgewiesen werden, im Gegensatz zu normalem Endometrium, wo es in Reaktion auf Progesteron exprimiert wird. Histologisch lassen sich aber keine Unterschiede zwischen endometriotischem Gewebe und gesundem Endometrium nachweisen, so dass eine selektive Resistenz gegen bestimmte Wirkungsmechanismen des Progesterons wahrscheinlich ist. Durch den Mangel an PR-B und die extrem niedrigen Level von PR-A kommt es zusätzlich zu einem erhöhten Östradiol-Spiegel, da Progesteron die Transkription von 17 β -HSD nicht induzieren kann (Bulun et al. 2006).

Zu der Progesteronrezeptorverteilung liegen allerdings auch widersprüchliche Ergebnisse vor. So konnten Misao et al. (1999) einen hohen Anteil von PR-B mRNA in Endometrioseherden nachweisen.

Somit ist sowohl die Expression der Rezeptoren als auch die Genexpression in endometriotischem Gewebe auf jeden Fall anders als in gesundem Endometrium und es bleibt weiterer Forschungsbedarf auch unter der Fragestellung, ob eventuell andere Isoformen des Progesteronrezeptors exprimiert werden.

4.3.2 Endometriumkarzinom

Beim Endometriumkarzinom wird viel darüber diskutiert, ob den häufig nachweisbaren und vom Wildtyp abweichenden mRNAs eine Bedeutung in der Pathogenese zukommt.

Das Progesteronrezeptor-Gen besteht aus acht Exons, die durch sieben kleine Introns getrennt werden (Kastner et al. 1990b). Misao et al. (2000) wiesen die Koexpression von Progesteronrezeptor mRNA, bei der Exons fehlen, mit der Wildtyp mRNA nach. Die natürlich vorkommenden Varianten könnten durch verändertes Splicen der primären Transkripte des Wildtyp Progesteronrezeptors entstehen. Einige mRNAs konnten in normalem oder malignem Brustgewebe sowie normalem uterinen Endometrium und endometriotischem Gewebe nicht nachgewiesen werden und wurden somit als gewebespezifisch angesehen. Diese Gruppe hat mRNAs amplifiziert, zum einen innerhalb der Region von Exon 1 bis Exon 8 – bezogen auf PR-B und PR-A, zum anderen innerhalb der Region von Exon 3 bis Exon 8 – bezogen auf PR-B, PR-A und PR-C. Die mRNA, der das Exon 5 und 6 fehlt, die in normalem humanem Endometrium und endometriotischem Gewebe nachgewiesen werden konnte, konnte nur innerhalb der Region zwischen Exon 3-8 nachgewiesen werden. Somit wurde angenommen, dass diese sich von PR-C ableitet. Die PR-C cDNA enthält nämlich nur die Exons 3-8, Exon 1 und der größte Teil von Exon 2 fehlen. Siehe dazu Abb. 27. Die im Endometriumkarzinom nachgewiesenen mRNAs, die innerhalb der Region zwischen Exon 3-8 nachgewiesen werden konnten, waren identisch mit denen, die in der Region zwischen Exon 1-8 nachgewiesen werden konnten. Je geringer der Differenzierungsgrad des Endometriumkarzinoms war, desto geringer war auch die Anzahl der nachweisbaren

mRNAs. Dies ließ die Autoren darauf schließen, dass mit Abnahme der histologischen Differenzierung die normale Ansprechempfindlichkeit auf Steroide abnehmen könnte.

Die Möglichkeit, dass einige dieser veränderten Transkripte als Proteine exprimiert werden, erscheint plausibel, wenn man Ergebnisse von Immunoblots beurteilt, in denen sich anomale Banden zeigen (Richer et al. 1998; Yeates et al. 1998). Richer et al. (1998) konnten in progesteronrezeptor-positiven Brustkrebszellen kein PR-B, aber PR-A und hier als Varianten des PR-A beschriebene Proteine nachweisen. Durch den verwendeten Antikörper AB-52 konnten auch Progesteronrezeptor-Varianten nachgewiesen werden, die durch Transfektion von mRNAs, denen bestimmte Exons fehlen, in COS-1 Zellen exprimiert wurden. Yeates et al. (1998) haben in T47D Zellen eine verkürzte Isoform des Progesteronrezeptors mit einem Molekulargewicht von 78 kDa nachgewiesen und außerdem gezeigt, dass diese Isoform in der Lage ist, Progesteron zu binden.

Eine andere Studie zu veränderten mRNAs konnte sowohl in normalem Endometrium als auch im Endometriumkarzinom eine mRNA nachweisen, bei der zwischen dem Exon 4 und dem Exon 5 eine Nukleotid-Sequenz von 323 Basenpaaren eingefügt ist (Yamanaka et al. 2002).

So gibt es viele Studien zu veränderten mRNAs in Endometriumkarzinom, aber nur wenige zu der Expression der Proteine, die von diesen veränderten mRNAs translatiert werden könnten. Diese Proteine wären vermutlich Varianten des Progesteronrezeptors, die von verschiedenen Antikörpern gegen das Progesteronrezeptor-Protein auch erkannt werden könnten. In unserer Arbeit zeigen wir die Verhältnisse im normalen Endometrium.

Das Verhältnis der Isoformen B und A ist beim Endometriumkarzinom mit fortschreitender Malignität gestört. In den Stadien FIGO 2 und 3 (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) findet sich meist nur noch die Expression einer Isoform (Arnett-Mansfield et al. 2001). Die erniedrigten Level, die im Vergleich zum normalen Endometrium beschrieben wurden, lassen sich also mit dem Verlust einer Isoform erklären. Eine Änderung des Verhältnisses der Expression der Isoformen könnte den Autoren zufolge zu einer gestörten Regulation der Zielgene führen. Eine dadurch veränderte Wirkung von Progesteron könnte eine Rolle in der Pathogenese des Endometriumkarzinoms spielen.

In einer weiteren Studie konnten Arnett-Mansfield et al. (2004) eine ungleichmäßige Verteilung im Kern beim Endometriumkarzinom nachweisen, wobei sich im normalen Endometrium gleichmäßige Verteilung fand. Zusätzlich war die Kolo-kalisation der Isoformen B und A im Endometriumkarzinom seltener, während PR-B und PR-A im normalen Endometrium kolokalisiert sind.

Fujimoto et al. (1997) konnten in hochmalignen Endometrium-, Zervix- und Ovarialkarzinomproben häufig eine Überexpression des PR-B nachweisen. In diesen Tumoren wurden die Level der mRNAs der Isoformen B und A verglichen. Dabei zeigte sich überproportional häufig ein Verlust der mRNA des Progesteronrezeptors A. Fukuda et al. (1998) beschrieben beim Adenokarzinom des Endometriums eine signifikante Korrelation der immunhistochemischen Nachweisbarkeit des Progesteronrezeptors mit der Überlebensrate unabhängig von anderen klinischen oder pathologischen Parametern.

Leslie et al. (2005) untersuchten Zellen von Endometriumkarzinomen auf die Verteilung der beiden Isoformen PR-B und PR-A. PR-A fand sich sogar in Abwesenheit von Progesteron vorwiegend im Kern, PR-B dagegen vorwiegend im Zytosol, wurde aber in Anwesenheit von Progesteron schnell in den Kern transloziert. Diese unterschiedliche Verteilung im Gegensatz zu nicht malignem Gewebe halten die Autoren für ein Kennzeichen des Endometriumkarzinoms.

4.3.3 Mammakarzinom

Beim Mammakarzinom stellt der Progesteronrezeptor einen wichtigen prognostischen Marker und einen Marker für die Ansprechbarkeit auf eine hormonelle Therapie dar. Mammakarzinom-Typen, die Östrogen- oder Progesteronrezeptoren exprimieren, zeigen einen anderen klinischen Verlauf als solche, die rezeptornegativ sind. Dabei besteht zusätzlich ein Unterschied darin, welche Rezeptoren exprimiert werden. progesteronrezeptor-positive Tumoren sind zum Beispiel mit größerer Wahrscheinlichkeit hormonabhängig und zeigen, unabhängig von Östrogenrezeptoren, geringere Aggressivität und ein günstigeres krankheitsfreies Überleben (Balleine et al. 1999b; Arpino et al. 2005). Progesteronrezeptoren sind den Östrogenrezeptoren als prognostische Marker überlegen (Costa et al. 2002).

Aktuelle Brustkrebs-Screening Untersuchungen verwenden immunhistochemische Methoden, um die Menge an exprimiertem Progesteronrezeptor zu beurteilen. Diese zurzeit gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der Progesteronrezeptor-Level in Karzinomen können nicht zwischen den Isoformen unterscheiden und könnten auch keine Varianten nachweisen. Abweichende Isoformen könnten als Progesteronrezeptoren verbucht werden und zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Dies könnte erklären, warum ein Teil der progesteronrezeptor-positiven Karzinome nicht auf eine Hormonbehandlung ansprechen.

Aktuelle Studien zeigen aber, dass es wichtig ist, das Verteilungsmuster zumindest der Isoformen B und A zu messen, was durch diese Methode nicht möglich ist. Mittels der Microarray Technik kann man eine große Anzahl von Genen auf eine Expressionsänderung hin untersuchen. Dabei haben Jacobsen et al. (2003) gezeigt, dass von 94 progesteronregulierten Genen, 59 nur durch PR-B hochreguliert werden, 4 nur durch PR-A und 19 nur durch beide Isoformen. Daher scheint es wichtig zu sein, nicht nur zu untersuchen, ob ein Tumor den Progesteronrezeptor exprimiert, sondern welche Isoform vorherrscht.

In normalem Brustgewebe sind die Progesteronrezeptor-Isoformen B und A koexprimiert. Dabei lassen sich beide in etwa gleichen Mengen nachweisen (Mote et al. 2002). In Brustkrebszellen ist das Verhältnis der beiden Isoformen zueinander aber ungleich und zeigt sich in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zunehmend dysreguliert.

Balleine et al. (1999a) gelang der Nachweis der Koexpression von veränderten mRNAs sowohl des Östrogen- als auch des Progesteronrezeptors in den Zellen von verschiedenen Brustkrebsgeweben. Die Expression von einer veränderten Progesteronrezeptor mRNA, der Teile des Exons 4 fehlen (del-p4 PR) (Hisatomi et al. 2003), und einer mRNA, der die Exons 4 und 6 fehlen (Nagao et al. 2003), konnte im Brustkrebsgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe signifikant häufiger nachgewiesen werden. Leygue et al. (1996) konnten sowohl in normalem als auch neoplastischem Brustgewebe mRNAs nachweisen, denen Exons fehlen. Für die mRNA, der das Exon 6 fehlt, konnte in einer weiteren Studie (Leygue et al. 1999) nachgewiesen werden, dass diese im Verlauf der Tumorigenese gesteigert nachzuweisen ist. Richer et al. (1998) wiesen in normalem Brustgewebe und Brustkrebszellen vier veränderte

mRNAs nach. Diese wurden in COS-1 Zellen transfiziert und im Immunoblot analysiert. Mit einem am N-Terminus bindenden Antikörper AB-52 konnten Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachgewiesen werden.

Graham et al. (1995) wiesen bei der Untersuchung von veränderten Konzentrationsverhältnissen der Isoformen B und A zueinander zusätzlich ein Protein von 78 kDa nach. Dieses Protein war in 52 von 202 Tumorproben, also in 25,7% der Proben, nachzuweisen. Dabei unterschied sich die Verteilung der Isoformen B und A in diesen Proben nicht von der in den restlichen Proben.

Bei den Studien zu der Expression von mRNA-Varianten des Progesteronrezeptors muss noch erforscht werden, ob diese regelmäßig zu stabilen Proteinen translatiert werden und wie diese die Gen-Expression, die durch Progesteronrezeptoren vermittelt wird, beeinflussen. Die Tatsache, dass in normalem Gewebe abweichende mRNAs vorkommen, lässt zumindest vermuten, dass der Signalweg von Progesteron mehr als die drei Protagonisten PR-B, PR-A und PR-C hat. Tumoren, die abweichende Progesteronrezeptoren exprimieren, könnten in ebenfalls abweichender Weise auf eine hormonelle Therapie reagieren. Wenn in normalen Geweben also mehr als die zwei Isoformen B und A exprimiert werden, könnte das zu veränderten Reaktionen auf Progesteron führen, als normalerweise beobachtet. Eine detaillierte Analyse der exprimierten Isoformen könnte die verschiedenen Reaktionen der Gewebe auf Progesteron erklären.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Endometrium auf die Expression verschiedener Isoformen des Progesteronrezeptors hin untersucht. Dabei war das Ziel, festzustellen, ob die Isoform PR-C im Endometrium nachweisbar ist und ob und wie die Expression dieser Isoform im Verlauf des Zyklus reguliert wird. Diese dritte Isoform des Progesteronrezeptors war von Wei und Miner (1994) in der Brustkrebszelllinie T47D nachgewiesen worden.

Unter der Verwendung eines am C-Terminus des Proteins bindenden Antikörpers konnten im Western Blot zusätzlich die Isoformen PR-B und PR-A dargestellt werden. Somit ist bei allen Untersuchungen auch immer eine Aussage über die Regulation dieser beiden „größeren“ Isoformen und ein Vergleich zur Isoform PR-C möglich.

Ziel der Untersuchungen waren unterschiedliche Fragestellungen:

- Vergleich der im Western Blot verwendeten Antikörper

Hier konnte deutlich gezeigt werden, dass das Protein mit dem Molekulargewicht von ca. 60 kDa nur von Antikörpern detektiert wird, die am C-Terminus des Progesteronrezeptors binden.

- Nachweis im humanen Endometrium

Nach der Detektion der Isoform C des Progesteronrezeptors in T47D Zellen, die nach dem entsprechenden Protokoll aufgearbeitet wurden, das Wei und Miner (1994) verwendeten, war auch im humanen Endometrium eine entsprechende Bande nachzuweisen.

- Verteilung in verschiedenen Phasen des Zyklus

Bei der Beurteilung der Expression der verschiedenen Isoformen im Verlauf des Zyklus wurden die Proben jeweils in Zytosol und Nukleosol getrennt und entsprechend bewertet. Dabei ergab sich für die drei Isoformen in der zytosolischen Fraktion ein ähnlicher Verlauf, der eine Steigerung der Intensitäten im Verlauf der Proliferationsphase und eine Abschwächung im Verlauf der

Sekretionsphase zeigt. In der frühen Sekretionsphase erreichen die Isoformen ihre maximale Expression. PR-C ist zwischen dem 9. und 24. Zyklustag regelmäßig nachzuweisen, allerdings immer in schwächerer Intensität als die beiden größeren Isoformen. Das Verteilungsmuster in der nukleären Fraktion ist vergleichbar mit einem Maximum in der frühen Sekretionsphase, wobei die Intensitäten der beiden Isoformen B und A in der mittleren und späten Sekretionsphase stärker erhalten bleiben als im Zytosol. PR-C lässt sich in diesen Phasen nur schwach, ab dem 24. Zyklustag überhaupt nicht mehr nachweisen.

Um die Intensitäten genau messen zu können, wurde eine densitometrische Messung durchgeführt. Dabei ist allerdings immer nur eine begrenzte Anzahl an Proben vergleichbar. Hier kann das Expressionsmuster generell bestätigt werden. Allerdings ergibt sich in der Proliferationsphase für die Isoform A eine stärkere Intensität als für die Isoform B. PR-C kann in insgesamt schwächeren und oftmals stark variierenden Intensitäten ermittelt werden.

- Methodik: Unterschiedliche Aufarbeitungen

In einer Reihe von Vorversuchen wurden zwei verschiedene Aufarbeitungsmethoden verglichen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass in der Fraktion Ü3, die bei der zweiten Methode entsteht, eine Bandenverschiebung bei der Reaktion mit dem Antikörper gegen den Progesteronrezeptor auftritt. Das Bandenmuster dieser Fraktion Ü3 war mit dem der Kontrollzellen T47D nicht vergleichbar und wurde in der Auswertung nicht verwendet.

- Verteilung in verschiedenen Zellkompartimenten

Im direkten Vergleich der Intensität der Isoformen in Zytosol und Nukleosol konnte sowohl für PR-B als auch für PR-A eine eindeutig stärkere Expression im Nukleosol ermittelt werden. PR-C ist in 35 % der Proben in den beiden Fraktionen gleichstark exprimiert, in den restlichen Proben kann deutlich eine stärkere Expression im Zytosol ermittelt werden.

- Verteilung in verschiedenen Zelltypen

Eine Auftrennung der Endometriumproben in Epithel- und Stromazellen ermöglichte eine gesonderte Auswertung der Verteilung der Isoformen des

Progesteronrezeptors. In den Epithelzellen verhalten sich die drei Isoformen gleichsinnig, mit einem Maximum in der späten Proliferationsphase und einem starken Abfall in der späten Sekretionsphase. PR-C erreicht hier die Intensitäten der beiden größeren Isoformen, anders in den Stromazellen. Hier zeigen PR-B und PR-A ein ähnliches Muster, PR-C ist insgesamt schwächer exprimiert und zeigt von der frühen Proliferations- bis zum Ende der frühen Sekretionsphase nur wenig Schwankungen seiner Intensität. Bei einem genaueren Vergleich mittels densitometrischer Messung konnten in den Stromazellen bis in die späte Sekretionsphase die Isoformen B und A deutlich nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich von Epithel- und Stromazellen zeigt sich vor allem in der späten Sekretionsphase ein deutlicher Unterschied zwischen diesen beiden Zelltypen: Die beiden Isoformen B und A werden fast nur noch in den Stromazellen exprimiert. PR-C zeigt in dieser Phase des Zyklus eine deutlich geringere Intensität im Vergleich zu den anderen Isoformen als in früheren Phasen des Zyklus.

Nur bei genauer Kenntnis der Regulation des gesunden Endometriums ist eine Beurteilung pathologischer Befunde möglich. Somit liefert diese Studie eine Grundlage zur Bewertung der Verteilung der Isoformen bei gynäkologischen Erkrankungen wie dem Endometrium- und Mammakarzinom sowie der Endometriose.

6 Anhang

Tab. 6: Liste der Endometriumabrade

H-Nr.	Klinik- datum	Alter	Zyklustag nachdatiert	LH mlu/ml	Östradiol pg/ml	Progesteron pg/ml
H 3444	03.06.03 M	43	7./8.	3,7	32,0	803
H 3445	02.12.03 M	44	17.	8,4	119,0	4507
H 3446	13.02.04 E	43	8.-10.	7,4	130,0	665
H 3447	01.07.03 M	47	8.	12,6	200,0	2544
H 3448	05.08.03 K	31	12./13.	5,1	75,0	902
H 3449	03.02.04 L	43	18.	0,8	91,0	9543
H 3450	18.02.03 E	42	25.	2,9	117,0	19289
H 3451	21.03.03 E	36	17./18.	9,0	129,0	15843
H 3452	09.03.04 K	35	22./23.	1,7	72,0	5315
H 3454	06.05.03 M	40	18./19.	3,6	154,0	19950
H 3455	29.07.03 L	47	10.	6,2	132,0	774
H 3456	26.02.04 L	42	18./19.	2,8	111,0	11271
H 3457	11.04.03 E	38	18./19.	10,0	102,0	9718
H 3458	07.01.04 L	43	24.	0,4	88,0	7839
H 3494	06.11.03 L1	42	8.	5,4	76,3	705
H 3495	15.01.04 L	41	8.	4,1	72,0	625
H 3496	04.11.03 E	48	14.	23,6	250,0	966
H 3497	26.08.03 E	35	26.	1,9	189,0	14120
H 3504	15.09.04 E	51	18./19.	5,3	59,0	11888
H 3505	24.08.04 M	42	18./19.	2,4	110,0	8790
H 3506	19.08.04 E	46	24.	3,2	98,0	7265
H 3507	13.08.04 E	47	3./4.	5,6	7,1	862
H 3508	13.08.04 L	40	18./19.	4,1	56,0	13364
H 3513	25.10.04 L	44	18.	3,98	54,0	10886
H 3515	05.08.03 L	48	9.	9,1	163,0	1089
H 3516	26.10.04 L	44	7.	8,25	6,4	621
H 3517	20.10.03 E2	41	22.-24.	1,3	70,0	8450
H 3518	25.06.03 E	45	24.	4,3	21,0	3604
H 3519	24.06.03 M	39	21.	1,8	153,0	30808
H 3520	22.07.03 E	47	5./6.	5,8	52,0	1391
H 3521	02.10.03 L	44	25./26.	2,64	48,0	13280
H 3522	05.11.04 L	44	6.	2,92	121,0	1011
H 3523	15.05.03 E	46	14./15.	15,0	42,0	3266

H 3524	06.05.03 L	39	18.	3,8	90,0	21982
H 3525	09.04.03 L	25	18.	9,2	153,0	21028
H 3526	21.02.03 E	43	7.	9,8	34,0	876
H 3527	11.03.03 E2	46	12./13.	3,5	104,0	924
H 3528	18.03.03 E	49	15./16.	9,3	106,0	13192
H 3529	07.02.03 E	47	19./20	Keine	Bestimmung	
H 3531	05.02.03 L	40	14.	18,9	181,0	1508
H 3532	19.02.03 E	42	13./14.	3,7	106,0	661
H 3533	07.01.03 L	44	26.	2,1	94,0	10310
H 3534	08.05.03 L	41	24./25.	Keine	Bestimmung	
H 3536	06.08.04 L	51	15.	8,7	29,0	2040
H 3537	01.12.04 K	47	23.	3,81	45,0	3373
H 3538	03.12.04 E	40	24.-26.	2,14	47,0	4442

Tab. 7: Liste der Zelltrennungen

Klinik-Datum	Alter	Zyklustag nachdatiert	LH mlu/ml	Östradiol pg/ml	Progesteron pg/ml
05.02.03 L	40	14.	18,9	181,0	1508
07.02.03 E	47	19./20.	Keine	Bestimmung	
12.02.03 E	38	10.	3,5	102,0	1804
14.02.03 E	47	3./4.	4,9	18,0	954
18.02.03 E	42	25.	2,9	117,0	19289
19.02.03 E	42	13./14.	3,7	106,0	661
21.02.03 E	43	7.	9,8	34,0	876
12.03.03 E	43	17.	2,7	86,0	12447
18.03.03 E	49	15./16.	9,3	106,0	13192
21.03.03 E	36	17./18.	9,0	129,0	15843
25.03.03 E	49	20.-22.	1,4	7,0	15263
26.03.03 E	48	26.	2,0	21,0	9564
09.04.03 L	25	18.	9,2	153,0	21028
11.04.03 E	38	18./19.	10,0	102,0	9718
06.05.03 L	39	18.	3,8	90,0	21982
06.05.03 M	40	18./19.	3,6	154,0	19950
15.05.03 K	41	15./16.	3,0	<<	3040
24.06.03 M	39	21.	1,8	153,0	30808
25.06.03 E	45	24.	4,3	21,0	3604
03.07.03 L	41	13./14.	36,7	118,0	2172
22.07.03 E	47	5./6.	5,8	52,0	1391
29.07.03 L	47	10.	6,2	132,0	774

26.08.03 E	35	26.	1,90	189,0	14120
02.10.03 L	44	25.	2,64	48,0	13280
20.10.03 E1	38	17.	7,90	131,0	5703
28.10.03 L	43	24.	2,24	42,0	4052
04.11.03 E	48	14.	23,60	250,0	966
02.12.03 M	44	17.	8,40	119,0	4507

Tab. 8: Liste Auswertung Abradate

H-Nr.	Zt.	U	PR-B	PR-A	PR-C		U	PR-B	PR-A	PR-C
Frühe und mittlere Proliferationsphase, n=12										
H 3507	3./4.	Cyt	1	1	0		nuc	1	1	0
H 3520	5./6.	Cyt	2	2	0		nuc	2	2	0
H 3522	6.	cyt	2	2	2		nuc	2	2	2
H 3516	7.	cyt	2	2	2		nuc	3	3	2
H 3526	7.	cyt	1	1	0		nuc	1	1	0
H 3444	7./8.	Cyt	1	1	0		nuc	1	1	0
H 3447	8.	cyt	2	2	1		nuc	3	3	1
H 3495	8.	cyt	2	2	0		nuc	3	3	1
H 3494	8.	cyt	2	3	2		nuc	3	3	1
H 3446	8.-10.	Cyt	2	2	2		nuc	2	2	1
H 3515	9.	cyt	3	3	3		nuc	3	3	3
H 3455	10.	cyt	3	3	3		nuc	3	3	3
Späte Proliferationsphase, n=6										
H 3448	12./13.	cyt	2	2	2		nuc	3	2	1
H 3527	12./13.	cyt	2	3	1		nuc	3	3	2
H 3532	13./14.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	1
H 3496	14.	cyt	2	3	2		nuc	3	3	2
H 3531	14.	cyt	2	3	1		nuc	3	3	1
H 3523	14./15.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
Frühe Sekretionsphase, n=14										
H 3536	15.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3528	15./16.	cyt	2	2	1		nuc	3	3	1
H 3445	17.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3451	17./18.	cyt	3	3	2		nuc	0	0	0
H 3513	18.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3524	18.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3525	18.	cyt	3	3	1		nuc	3	3	1
H 3449	18.	cyt	3	3	2		nuc	3	2	1
H 3454	18./19.	cyt	3	3	2		nuc	0	0	0

H 3457	18./19.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3504	18./19.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3508	18./19.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3505	18./19.	cyt	3	3	2		nuc	3	3	2
H 3456	18./19.	cyt	2	2	1		nuc	3	2	1
Mittlere Sekretionsphase, n=5										
H 3529	19./20.	cyt	2	2	1		nuc	3	3	1
H 3519	21.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	1
H 3452	22./23	cyt	2	2	1		nuc	2	1	0
H 3517	22.-24.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	1
H 3537	23.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	1
Späte Sekretionsphase, n=9										
H 3458	24.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	1
H 3506	24.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	1
H 3518	24.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	0
H 3534	24./25.	cyt	1	1	0		nuc	2	2	0
H 3538	24.-26.	cyt	2	2	0		nuc	2	2	0
H 3450	25.	cyt	0	0	0		nuc	0	0	0
H 3521	25./26.	cyt	2	2	1		nuc	2	2	0
H 3497	26.	cyt	2	2	0		nuc	2	2	0
H 3533	26.	cyt	2	2	0		nuc	2	2	0

Tab. 9: Liste Auswertung Getrennte Zellen

Datum	Zt.		PR-B	PR-A	PR-C			PR-B	PR-A	PR-C
Frühe und mittlere Proliferationsphase, n=5										
14.02.03 E	3./4.	Epi	1	1	1		Str	2	1	1
22.07.03 E	5./6.	Epi	2	2	1		Str	3	3	1
21.02.03 E	7.	Epi	2	2	1		Str	2	1	2
29.07.03 L	10.	Epi	3	3	2		Str	3	3	3
12.02.03 E	10.	Epi	3	3	3		Str	3	3	3
Späte Proliferationsphase, n=3 bzw. 4										
19.02.03 E	13./14.	Epi	Keine	Probe			Str	3	3	1
03.07.03 L	13./14.	Epi	3	3	3		Str	3	3	3
05.02.03 L	14.	Epi	3	3	3		Str	3	3	2
04.11.03 E	14.	Epi	3	3	3		Str	3	3	2
Frühe Sekretionsphase, n=10										
18.03.03 E	15./16.	Epi	3	3	3		Str	3	3	2
15.05.03 K	15./16.	Epi	3	3	3		Str	3	3	3
02.12.03 M	17.	Epi	3	3	3		Str	3	3	3

12.03.03 E	17.	Epi	2	2	2		Str	3	2	1
20.10.03 E1	17.	Epi	2	2	2		Str	2	2	2
21.03.03 E	17./18.	Epi	2	2	2		Str	3	3	3
09.04.03 L	18.	Epi	2	2	2		Str	2	2	1
06.05.03 L	18.	Epi	3	2	3		Str	2	1	2
11.04.03 E	18./19.	Epi	3	3	3		Str	2	2	2
06.05.03 M	18./19.	Epi	2	2	2		Str	2	2	1
Mittlere Sekretionsphase, n=2 bzw. 3										
07.02.03 E	19./20.	Epi	3	3	3		Str	0	1	1
25.03.03 E	20.-22.	Epi	Keine	Probe			Str	2	2	1
24.06.03 M	21.	Epi	1	1	1		Str	2	2	1
Späte Sekretionsphase, n=6										
25.06.03 E	24.	Epi	1	1	1		Str	2	2	1
28.10.03 L	24.	Epi	1	1	1		Str	2	2	1
18.02.03 E	25.	Epi	1	1	1		Str	1	1	0
02.10.03 L	25.	Epi	1	0	0		Str	2	2	0
26.03.03 E	26.	Epi	1	0	0		Str	1	1	0
26.08.03 E	26.	Epi	1	0	0		Str	2	2	0

Tab. 10: Liste Auswertung Kompartimente

H-Nr.	Zt.	PR-B	PR-A	PR-C
H 3507	3./4.	n>c	n=c	n=c
H 3520	5./6.	n>c	n=c	c>n
H 3522	6.	c>n	c>n	c>n
H 3516	7.	n>c	n>c	c>n
H 3526	7.	n>c	n>c	n=c
H 3444	7./8.	n>c	c>n	c>n
H 3447	8.	n>c	n>c	n=c
H 3494	8.	n>c	n>c	c>n
H 3495	8.	n>c	n>c	n=c
H 3446	8.-10.	n>c	n>c	n=c
H 3515	9.	n>c	n>c	n>c
H 3455	10.	n>c	n>c	c>n
H 3527	12./13.	n>c	n>c	n>c
H 3448	12./13.	n>c	c>n	c>n
H 3532	13./14.	c>n	c>n	n=c
H 3496	14.	n>c	n>c	n>c
H 3531	14.	n>c	n>c	n=c
H 3523	14./15.	n=c	n=c	c>n

H 3536	15.	n>c	n=c	c>n
H 3528	15./16.	n>c	n>c	n>c
H 3445	17.	n>c	n>c	c>n
H 3451	17./18.	Keine	Probe	
H 3449	18.	n>c	c>n	c>n
H 3513	18.	n>c	n>c	c>n
H 3524	18.	n>c	n>c	c>n
H 3525	18.	n>c	n>c	n=c
H 3454	18./19.	Keine	Probe	
H 3456	18./19.	n>c	n>c	c>n
H 3457	18./19.	n>c	n>c	n>c
H 3504	18./19.	n>c	n>c	c>n
H 3508	18./19.	n>c	n>c	c>n
H 3505	18./19.	n>c	n>c	c>n
H 3529	19./20.	n>c	n>c	n=c
H 3519	21.	n>c	n=c	n=c
H 3452	22./23.	n>c	c>n	c>n
H 3517	22.-24.	n>c	n>c	n=c
H 3537	23.	c>n	c>n	n=c
H 3458	24.	n>c	n>c	n>c
H 3506	24.	n>c	n=c	c>n
H 3518	24.	n>c	c>n	n=c
H 3534	24./25.	n>c	n=c	c>n
H 3538	24.-26.	c>n	c>n	c>n
H 3450	25.	Keine	Probe	
H 3521	25./26.	n>c	n>c	n=c
H 3497	26.	n>c	n>c	c>n
H 3533	26.	n>c	n>c	n=c

7 Literaturverzeichnis

- Alfer, J (2000). Markermoleküle endometrialer Funktionen: Vergleichende immunhistochemische Lokalisierung bei fertilen und subfertilen Patientinnen. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen.
- Arnett-Mansfield, RL, DeFazio, A, Mote, PA and Clarke, CL (2004). Subnuclear distribution of progesterone receptors A and B in normal and malignant endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1429-42.
- Arnett-Mansfield, RL, deFazio, A, Wain, GV, Jaworski, RC, Byth, K, Mote, PA and Clarke, CL (2001). Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res* 61(11): 4576-82.
- Arpino, G, Weiss, H, Lee, AV, Schiff, R, De Placido, S, Osborne, CK, and Elledge, RM (2005). Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst.* 97(17):1254-61.
- Attia, GR, Zeitoun, K, Edwards, D, Johns, A, Carr, BR and Bulun, SE (2000). Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2897-902.
- Balleine, RL, Hunt, SM and Clarke, CL (1999a). Coexpression of alternatively spliced estrogen and progesterone receptor transcripts in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 84(4): 1370-7.
- Balleine, RL, Earl, MJ, Greenberg, ML and Clarke, CL (1999b). Absence of progesterone receptor associated with secondary breast cancer in postmenopausal women. *Br J Cancer* 79(9-10):1564-71.
- Beck, CA, Weigel, NL and Edwards, DP (1992). Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 6(4): 607-20.

- Beier, HM and Beier-Hellwig, K (1998). Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* 4(5): 448-458.
- Bielefeldt, K, Waite, L, Abboud, FM and Conklin, JL (1996). Nongenomic effects of progesterone on human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): G370-6.
- Bulun, SE, Cheng, YH, Yin, P, Imir, G, Utsunomiya, H, Attar, E, Innes, J and Kim, JJ (2006). Progesterone resistance in endometriosis: Link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 248: 94-103.
- Clarke, CL, Zaino, RJ, Feil, PD, Miller, JV, Steck, ME, Ohlsson-Wilhelm, BM and Satyaswaroop, PG (1987). Monoclonal antibodies to human progesterone receptor: characterization by biochemical and immunohistochemical techniques. *Endocrinology* 121(3): 1123-32.
- Classen-Linke, I, Alfer, J, Krusche, CA, Chwalisz, K, Rath, W and Beier, HM (2000). Progestins, progesterone receptor modulators, and progesterone antagonists change VEGF release of endometrial cells in culture. *Steroids* 65(10-11): 763-771.
- Classen-Linke, I, (2000). Hormonelle Regulation endometrialer Zellen: Vergleichende Untersuchungen in vivo und in vitro. Habilitationsschrift an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen.
- Classen-Linke, I, Alfer, J, Hey, S, Krusche, CA, Kusche, M and Beier, HM (1998). Marker molecules of human endometrial differentiation can be hormonally regulated under in-vitro conditions as in-vivo. *Hum Reprod Update* 4(5): 539-549.
- Condon, JC, Hardy, DB, Kovaric, K and Mendelson, CR (2006). Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor- κ B may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol* 20(4): 764-775.
- Conneely, OM, Sullivan, WP, Toft, DO, Birnbaumer, M, Cook, RG, Maxwell, BL, Zarucki-Schulz, T, Greene, GL, Schrader, WT and O'Malley, BW (1986). Molecular cloning of the chicken progesterone receptor. *Science* 233(4765): 767-70.

- Costa, SD, Lange, S, Klinga, K, Merkle, E and Kaufmann, M (2002). Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer--results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *Eur J Cancer* 38(10): 1329-34.
- El-Hefnawy, T, Manna, PR, Luconi, M, Baldi, E, Slotte, JP and Huhtaniemi, I (2000). Progesterone action in a murine Leydig tumor cell line (mLTC-1), possibly through a nonclassical receptor type. *Endocrinology* 141(1): 247-55.
- Eskenazi, B and Warner, ML (1997). Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 24(2): 235-258
- Falkenstein, E, Norman, AW and Wehling, M (2000). Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 85(5): 2072-5.
- Fomin, VP, Cox, BE and Word, RA (1999). Effect of progesterone on intracellular Ca^{2+} homeostasis in human myometrial smooth muscle cells. *Am J Physiol* 276(2 Pt 1): C379-85.
- Fujimoto, J, Ichigo, S, Hirose, R, Sakaguchi, H and Tamaya, T (1997). Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62(5-6): 449-54.
- Fukuda, K, Mori, M, Uchiyama, M, Iwai, K, Iwasaka, T and Sugimori, H (1998). Prognostic significance of progesterone receptor immunohistochemistry in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 69(3): 220-5.
- Giangrande, PH, Pollio, G and McDonnell, DP (1997). Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272(52): 32889-900.
- Goldman, S, Weiss, A, Almalah, I and Shalev, E (2005). Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Reprod* 11(4): 269-77.

- Graham, JD, Yeates, C, Balleine, RL, Harvey, SS, Milliken, JS, Bilous, AM and Clarke, CL (1995). Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 55(21): 5063-8.
- Gronemeyer, H, Turcotte, B, Quirin-Stricker, C, Bocquel, MT, Meyer, ME, Krozowski, Z, Jeltsch, JM, Lerouge, T, Garnier, JM and Chambon, P (1987). The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis. *Embo J* 6(13): 3985-94.
- Hendrickson, MR, Kempson, RL (1997). Normal histology of the uterus and fallopian tubes. In: *Histology for Pathologists*, second edition, Sternberg, S.S. (ed.), Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
- Hey, S (2000). Zyklusabhängige Lokalisation der extrazellulären Matrixproteine Tenascin und Oncofetales Fibronectin im menschlichen Endometrium und ihre Relation zu Proliferation und Angiogenese. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen.
- Hisatomi, H, Kohno, N, Wakita, K, Nagao, K, Hirata, H, Hikiji, K and Harada, S (2003). Novel alternatively spliced variant with a deletion of 52 BP in exon 6 of the progesterone receptor gene is observed frequently in breast cancer tissues. *Int J Cancer* 105(2): 182-5.
- Horwitz, KB and Alexander, PS (1983). In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology* 113(6): 2195-201.
- Hovland, AR, Powell, RL, Takimoto, GS, Tung, L and Horwitz, KB (1998). An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 273(10): 5455-60.
- Jacobsen, BM, Richer, JK, Sartorius, CA and Horwitz, KB (2003). Expression profiling of human breast cancers and gene regulation by progesterone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(3): 257-68.
- Kao, LC, Germeyer, A, Tulac, S, Lobo, S, Yang, JP, Taylor, RN, Osteen, K, Lessey, BA and Giudice, LC (2003). Expression profiling of endometrium from women with

- endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 144(7): 2870-2881.
- Kastner, P, Bocquel, MT, Turcotte, B, Garnier, JM, Horwitz, KB, Chambon, P and Gronemeyer, H (1990a). Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem* 265(21): 12163-7.
- Kastner, P, Krust, A, Turcotte, B, Stropp, U, Tora, L, Gronemeyer, H and Chambon, P (1990b). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* 9(5): 1603-14.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leonhardt, SA, Boonyaratanakornkit, V, Edwards DP (2003). Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68, 761-770.
- Leslie, KK, Stein, MP, Kumar, NS, Dai, D, Stephens, J, Wandering-Ness, A and Glueck, DH (2005). Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 96(1): 32-41.
- Leygue, E, Dotzlaw, H, Watson, PH and Murphy, LC (1996). Identification of novel exon-deleted progesterone receptor variant mRNAs in human breast tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 228(1): 63-8.
- Leygue, E, Dotzlaw, H, Watson, PH and Murphy, LC (1999). Altered expression of exon 6 deleted progesterone receptor variant mRNA between normal human breast and breast tumour tissues. *Br J Cancer* 80(3-4): 379-82.
- Loosfelt, H, Atger, M, Misrahi, M, Guiochon-Mantel, A, Meriel, C, Logeat, F, Benarous, R and Milgrom, E (1986). Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(23): 9045-9.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL and Randall, RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-75.

- Luconi, M, Bonaccorsi, L, Maggi, M, Pecchioli, P, Krausz, C, Forti, G and Baldi, E (1998). Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3): 877-85.
- Mangal, RK, Wiehle, RD, Poindexter, AN, 3rd and Weigel, NL (1997). Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63(4-6): 195-202.
- Marshburn, PB, Zhang, J, Bahrani-Mostafavi, Z, Matthews, ML, White, J and Hurst, BS (2005). Variant progesterone receptor mRNAs are co-expressed with the wild-type progesterone receptor mRNA in human endometrium during all phases of the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 11(11): 809-15.
- Mattei, MG, Krust, A, Stropp, U, Mattei, JF and Chambon, P (1988). Assignment of the human progesterone receptor to the q22 band of chromosome 11. *Hum Genet* 78(1): 96-7.
- Misao, R, Nakanishi, Y, Sun, W, Iwagaki, S, Fujimoto, J and Tamaya, T (2000). Identification of exon-deleted progesterone receptor mRNAs in human uterine endometrial cancers. *Oncology* 58(1): 60-5.
- Misao, R, Iwagaki, S, Fujimoto, J, Sun, W and Tamaya, T (1999). Dominant expression of progesterone receptor form B mRNA in ovarian endometriosis. *Horm Res* 52(1):30-4.
- Misao, R, Sun, WS, Iwagaki, S, Fujimoto, J and Tamaya, T (1998). Identification of various exon-deleted progesterone receptor mRNAs in human endometrium and ovarian endometriosis. *Biochem Biophys Res Commun* 252(2): 302-6.
- Mote, PA, Balleine, RL, McGowan, EM and Clarke, CL (1999). Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 84(8): 2963-71.
- Mote, PA, Bartow, S, Tran, N and Clarke, CL (2002). Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 72(2): 163-72.

- Nagao, K, Kohno, N, Wakita, K, Hikiji, K, Yamamoto, S, Hirata, H and Hisatomi, H (2003). Expression of a novel splicing variant deleting exons 4 and 6 of the progesterone receptor gene is a rare event in breast cancer. *Oncol Rep* 10(2): 305-8.
- Noyes, RW, Hertig, AT, Rock, J (1950). Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1,3-25.
- Ogle, TF (2002). Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy. *Steroids* 67(1): 1-14.
- Ogle, TF, Dai, D, George, P and Mahesh, VB (1997). Stromal cell progesterone and estrogen receptors during proliferation and regression of the decidua basalis in the pregnant rat. *Biol Reprod* 57(3): 495-506.
- Ogle, TF, George, P and Dai, D (1998). Progesterone and estrogen regulation of rat decidual cell expression of proliferating cell nuclear antigen. *Biol Reprod* 59(2): 444-50.
- Peluso, JJ, Bremner, T, Fernandez, G, Pappalardo, A and White, BA (2003). Expression pattern and role of a 60-kilodalton progesterone binding protein in regulating granulosa cell apoptosis: involvement of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Reprod* 68(1): 122-8.
- Peluso, JJ, Pappalardo, A, Fernandez, G and 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(6): 3014-22.
- Rae, MT, Menzies, GS and Bramley, TA (1998a). Bovine ovarian non-genomic progesterone binding sites: presence in follicular and luteal cell membranes. *J Endocrinol* 159(3): 413-27.
- Rae, MT, Menzies, GS, McNeilly, AS, Woad, K, Webb, R and Bramley, TA (1998b). Specific non-genomic, membrane-localized binding sites for progesterone in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 58(6): 1394-406.
- Revelli, A, Massobrio, M and Tesarik, J (1998). Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19(1): 3-17.

- Richer, JK, Lange, CA, Wierman, AM, Brooks, KM, Tung, L, Takimoto, GS and Horwitz, KB (1998). Progesterone receptor variants found in breast cells repress transcription by wild-type receptors. *Breast Cancer Res Treat* 48(3): 231-41.
- Rousseau-Merck, MF, Misrahi, M, Loosfelt, H, Milgrom, E and Berger, R (1987). Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet* 77(3): 280-2.
- Sabeur, K, Edwards, DP and Meizel, S (1996). Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 54(5): 993-1001.
- Saner, KJ, Welter, BH, Zhang, F, Hansen, E, Dupont, B, Wei, Y and Price, TM (2003). Cloning and expression of a novel, truncated, progesterone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 200(1-2): 155-63.
- Sartorius, CA, Groshong, SD, Miller, LA, Powell, RL, Tung, L, Takimoto, GS and Horwitz, KB (1994). New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogesterin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Res* 54(14): 3868-77.
- Satyaswaroop, PG, Wartell, DJ and Mortel, R (1982). Distribution of progesterone receptor, estradiol dehydrogenase, and 20 alpha-dihydroprogesterone dehydrogenase activities in human endometrial glands and stroma: progestin induction of steroid dehydrogenase activities in vitro is restricted to the glandular epithelium. *Endocrinology*, Vol 111, 743-749.
- Schams, D, Kohlenberg, S, Amselgruber, W, Berisha, B, Pfaffl, MW and Sinowatz, F (2003). Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol* 177(2): 305-17.
- Vegeto, E, Shahbaz, MM, Wen, DX, Goldman, ME, O'Malley, BW and McDonnell, DP (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7(10): 1244-55.

- Wang, H, Critchley, HO, Kelly, RW, Shen, D and Baird, DT (1998). Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 4(4): 407-12.
- Wei, LL, Gonzalez-Aller, C, Wood, WM, Miller, LA and 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(12): 1833-40.
- Wei, LL, Hawkins, P, Baker, C, Norris, B, Sheridan, PL and Quinn, PG (1996). An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10(11): 1379-87.
- Wei, LL and Miner, R (1994). Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res* 54(2): 340-3.
- Wei, LL, Norris, BM and 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(4): 287-97.
- Weigel, NL, Beck, CA, Estes, PA, Prendergast, P, Altmann, M, Christensen, K and Edwards, DP (1992). Ligands induce conformational changes in the carboxyl-terminus of progesterone receptors which are detected by a site-directed anti-peptide monoclonal antibody. *Mol Endocrinol* 6(10): 1585-97.
- Wu, L, Einstein, M, Geissler, WM, Chan, HK, Elliston, KO and Andersson, S (1993). Expression cloning and characterization of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268(17): 12964-12969.
- Yamanaka, T, Hirata, S, Shoda, T and Hoshi, K (2002). Progesterone receptor mRNA variant containing novel exon insertions between exon 4 and exon 5 in human uterine endometrium. *Endocr J* 49(4): 473-82.
- Yeates, C, Hunt, SM, Balleine, RL and Clarke, CL (1998). Characterization of a truncated progesterone receptor protein in breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2): 460-7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hier ist zu aller erst **Frau Prof. Dr. Irmgard Classen-Linke** zu nennen, die mir dieses Thema überlassen und somit diese wissenschaftliche Arbeit ermöglicht hat. Durch ihre Ideen, ihre Geduld und Erfahrung sowie in zahlreichen Diskussionen konnte sie mich stets motivieren und hatte für alle anfallenden Probleme immer ein offenes Ohr.

Herrn Prof. Dr. Dr. Henning Beier möchte ich ganz herzlich für seine Unterstützung und die Möglichkeit in seinem Labor und seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten danken.

Herrn Prof. Dr. Joseph Neulen sei gedankt für die Übernahme des Koreferats. Durch die routinemäßige Messung bestimmter Hormonparameter im Labor seiner Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin unterstützten er und seine Mitarbeiter diese Arbeit schon bei der Probenverarbeitung.

Herrn PD Dr. Andreas Herrler danke ich für sein stetes Interesse am Voranschreiten dieser Arbeit, für die vielen anregenden Diskussionen und seine Hilfe bei Problemen im Labor. Für hilfreiche Unterstützung bei der Arbeit im Institut danke ich **Frau PD Dr. Ulrike von Rango** und **Frau PD Dr. Claudia Krusche**, die ebenfalls stets für Fragen zur Verfügung standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Sabina Hennes-Mades** für Ihre herzliche Aufnahme und Betreuung bedanken. Durch ihre optimale Einweisung in die experimentelle Methodik, sowie ihre große Hilfsbereitschaft bei der täglichen Arbeit im Labor ist diese Arbeit zustande gekommen. **Bärbel Bonn**, **Diana Seelis-Schmidt**, und **Christoph Schlösser** gilt ebenfalls großer Dank für allzeit geduldige Unterstützung bei der Laborarbeit. Ebenso sei **Sabine Eisner** und **Kerstin Eckes** für ihre große Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art gedankt.

Allen Mitarbeitern dieses Instituts sei für die herzliche Atmosphäre und die unterhaltsamen Mittags- bzw. Kaffeepausen gedankt. Durch euch bin ich auch in schwierigeren Phasen meiner Arbeit immer gerne ins Labor gekommen.

Herrn Prof. Dr. Schmalzing danke ich für die Möglichkeit, die Ultrazentrifuge in seinem Labor zu nutzen.

Für die Unterstützung beim Zusammentragen des Probenmaterials sei den **OP-Teams der Frauenkliniken in Aachen** herzlich gedankt: St. Antonius Hospital Eschweiler, Prof. Dr. C. Karl; Universitätsklinikum Aachen, Prof. Dr. W. Rath; Marienhospital Aachen, Prof. Dr. M. Kusche; Luisenhospital Aachen, Dr. D. Crommelinck.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kira Hendricks
Geburtstag: 20. Mai 1981
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

08/1987 – 01/1989 Katholische Grundschule Sollbrüggen in Krefeld
01/1989 – 07/1991 Grundschule der Deutschen Schule Tokio, Japan
08/1991 – 06/2000 Arndt-Gymnasium in Krefeld
Abitur im Juni 2000

Studium:

ab WS 2000/01 Humanmedizin, RWTH Aachen
09/2002 Ärztliche Vorprüfung
08/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 09/2003 Doktorarbeit im Institut für Anatomie und Reproduktionsbiologie, Prof. Dr. Dr. H. M. Beier, Aachen
03/2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung