

**Expression der Progesteronrezeptor -  
Membrankomponente 1 im Mammakarzinom vor und  
nach neoadjuvanter Therapie und anhand dessen  
Entwicklung eines immunreaktiven Scores**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Wurster, Isabel Friederike

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Neubauer

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schulze-Osthoff

Für meine Familie

1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2. Entstehen und Genese des Mammakarzinoms.....	2
1.2.1. Risikofaktoren.....	2
1.2.2. Genetische Formen.....	3
1.3. Klassifikation des Mammakarzinoms.....	4
1.4. Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms.....	5
1.5. Bedeutung von Steroidhormonrezeptoren in der Genese und Behandlung von Mammakarzinomen.....	5
1.5.1. Steroidhormone.....	5
1.5.2. Steroidhormonrezeptoren.....	9
1.5.2.1. Östrogenrezeptoren.....	11
1.5.2.2. Progesteronrezeptoren.....	12
1.5.2.3. Progesteronrezeptor-Membran­komponente 1.....	13
1.5.2.3.1. Lokalisation in der Zelle.....	14
1.5.2.3.2. Funktion von PGRMC1.....	15
1.5.2.3.3. Stellt PGRMC1 selbst überhaupt einen PR dar?.....	16
1.5.2.3.4. Bedeutung von PGRMC1 im Mammakarzinom.....	17
1.6. Therapie des Mammakarzinoms.....	18
1.7. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	20
2. Materialien und Methoden.....	21
2.1. Materialien.....	21
2.1.1. Verwendete Chemikalien.....	21
2.1.2. Verwendete Lösungen und Puffer.....	22
2.1.3. Verwendete Reagenziensets.....	22
2.1.4. Verwendete Geräte und Materialien.....	23



2.1.5. Verwendete Antikörper und Blocking-Peptide .....	24
2.2. Methoden.....	25
2.2.1. Patientinnen .....	25
2.2.1.1. Chemotherapie-Schemata und Operation der Mammakarzinome .....	26
2.2.1.2. Therapieansprechen .....	26
2.2.2. Herstellung der Gewebeschnitte .....	26
2.2.2.1. Gewebegewinnung .....	26
2.2.2.2. Tissue Microarrays.....	27
2.2.2.2.1. Herstellung der Tissue Microarrays.....	27
2.2.3. Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	30
2.2.4. Immunhistochemie.....	30
2.2.4.2. Vorbereitung der Schnitte für die Immunhistochemie .....	31
2.2.4.3. Eigentliche Immunfärbung.....	32
2.2.5. Auswertung der TMA-Färbungen.....	34
2.2.5.1. Bewertung der Tumore.....	34
2.2.5.2. Entwicklung und Berechnung eines immunreaktiven Scores.....	34
2.2.6. IRS der Hormonrezeptoren und Ki-67.....	35
2.2.7. Statistische Auswertung.....	35
3. Ergebnisse.....	37
3.1. Studiendesgin .....	37
3.2. Klinische Daten der Patientinnen .....	37
3.2.1. Altersverteilung.....	37
3.2.2. Klinisch-histologische Daten der Patientinnen .....	38
3.2.3. Therapieansprechen.....	40
3.3. Auswertung des Hormonrezeptor-Status nach Altersgruppen .....	41

3.4. Auswahl der Antikörper zum Nachweis von PGRMC1 und pPGRMC1 .....	42
3.5. Validierung der Spezifität der Antikörperreaktion.....	43
3.5.1. „Peptid-Blocking“ von PGRMC1.....	43
3.5.2. Phosphatase-Behandlung vor pPGRMC1-Detektion.....	43
3.6. Expression von PGRMC1 .....	44
3.6.1. Expression in umgebendem Bindegewebe .....	45
3.6.2. Zusammenhang mit demographischen und klinischen Parametern .....	45
3.6.3. Koexpression mit Hormonrezeptoren und Ki-67.....	46
3.6.4. Assoziation mit Hormonrezeptoren und Ki-67, gewichtet nach dem Alter.....	46
3.6.5. Änderung der Expression nach neoadjuvanter Therapie.....	47
3.6.5.1. Assoziation der Expression mit Hormonrezeptoren und Ki-67 .....	47
3.7. Expression von pPGRMC1 .....	48
3.7.1. Expression in umgebendem Bindegewebe .....	48
3.7.2. Zusammenhang mit demographischen und klinischen Parametern .....	49
3.7.3. Korrelation mit Hormonrezeptoren und Ki-67 .....	50
3.7.4. Assoziation mit Hormonrezeptoren und Ki-67, gewichtet nach dem Alter.....	51
3.7.5. Änderung der Expression nach neoadjuvanter Therapie.....	51
3.7.5.1. Assoziation mit Hormonrezeptoren und Ki-67 .....	52
3.7.5.2. Assoziation mit Hormonrezeptoren, HER2/neu und Ki-67, gewichtet nach dem Alter.....	52
3.8. Vergleich von PGRMC1 mit pPGRMC1 .....	52
3.8.1. Expression von PGRMC1 und pPGRMC1 vor neoadjuvanter Therapie .....	52
3.8.2. Expression von PGRMC1 und pPGRMC1 nach neoadjuvanter Therapie .....	52
4. Diskussion .....	53
4.1. Stärken der Arbeit.....	53
4.2. Schwächen der Arbeit.....	53

4.3. Deutung der Ergebnisse .....	53
4.3.1. Expression im Mammakarzinom aber auch umgebenden Gewebe.....	53
4.3.2. Korrelation der Expression mit klinischen und histopathologischen Daten .....	54
4.3.3. Korrelation der Expression mit anderen Rezeptoren.....	55
4.3.4. Änderung der Expression nach neoadjuvanter Therapie.....	56
5.Zusammenfassung .....	59
6.Verzeichnisse .....	62
6.1. Abbildungsverzeichnis .....	62
6.2. Graphikverzeichnis .....	62
6.3. Tabellenverzeichnis .....	62
6.4. Literaturverzeichnis.....	63
7.Anhang.....	75

## Abkürzungsverzeichnis

### **Symbol/Abkürzung**   **Bedeutung**

$r_s$	Korrelationskoeffizient nach Spearman
AB	Antibody
Abb.	Abbildung
AD	Antibody Diluent
AK	Antikörper
CK	Zytokeratin
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
ER	Östrogenrezeptor
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Östrogenrezeptor $\beta$
ER $\beta$ 1	Östrogenrezeptor $\beta$ Isoform 1
ER $\beta$ 2	Östrogenrezeptor $\beta$ Isoform 2
ER $\beta$ t	Gesamt-Östrogenrezeptor $\beta$
G1	gut differenzierter Tumor
G2	mäßig differenzierter Tumor
G3	schlecht differenzierter Tumor
Gr.	Gruppe
H1	invasiv duktales Karzinom
H2	invasiv lobuläres Karzinom
H3	invasiv duktolobuläres Karzinom
H4	muzinöses Karzinom
HER2/neu	<i>human epidermal growth-factor receptor 2</i>
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
IZA1	<i>inner zone antigen 1</i>
Ki-67	Antigen Ki-67
M1	prämenopausaler Status

M2	perimenopausaler Status
M3	postmenopausaler Status
MB	Multiblock
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
n	Anzahl
Neo1	Anthrazyklin-Therapie
Neo2	Taxan-Therapie
Neo3	Aromatasehemmer-Therapie
p	p-Wert, Signifikanzwert
PAIRBP1	<i>plasminogen activator inhibitor-1 RNA-binding protein</i>
PGRMC1	Progesteronrezeptor-Membrankomponente 1
PP	Prozentsatz positiv angefarbter Zielzellen
pPGRMC1	phospho-S180- Progesteronrezeptor-Membrankomponente 1
PR	Progesteronrezeptor
pR	partial remission
PR-A	Progesteronrezeptor A
PR-B	Progesteronrezeptor B
sD	stable disease
SI	<i>staining intensity</i> , vorherrschende Färbenintensität
SIGCs	spontan immortalisierten Granulosa-Zellen
T	Mammakarzinomgewebe
TA, T-a	den Tumor umgebendes Bindegewebe
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue Microarray

# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom stellt weltweit insgesamt die zweithäufigste, bei Frauen die am häufigsten diagnostizierte und am fünfthäufigsten zum Tode führende Krebsart dar; dabei hatte es im Jahr 2008 einen Anteil von 23% (entsprechend 1,38 Millionen Menschen) aller neuen Krebserkrankungen, einen Anteil von 10,9% aller Krebserkrankungen insgesamt, hatte einen Anteil von 14% (entsprechend 458.400 Menschen) aller durch Krebs verursachten Todesfälle und stellt zudem in der Altersgruppe der 35 bis 55-jährigen Frauen (westliche Welt) die häufigste Todesursache dar [1, 2].

In etwa die Hälfte der Brustkrebsfälle und ca. 60% der durch das Mammakarzinom verursachten Todesfälle treten in Entwicklungsländern auf [3]. Dennoch gilt, dass die Inzidenz von Brustkrebs in der westlichen Welt hoch, in Regionen wie der Karibik, Nord- und Südafrika mäßig und in den Regionen der Subsahara Afrikas und Asiens niedrig ist [1]. Dies ist unter anderem (u.a.) den unterschiedlichen Lebensstandards in den verschiedenen Ländern zuzuschreiben, welche die unterschiedliche Verfügbarkeit von Früherkennungswerkzeugen, wie regelmäßige und fachmännische klinische Brustuntersuchungen und die Mammographie aber auch das Bewusstsein für Frühsymptome und -zeichen mit einschließt [4].

In Deutschland erkranken jedes Jahr ca. 60.000 Frauen an Brustkrebs [5]. Laut der Todesursachenstatistik der Gesundheitsberichterstattung des Bundes sind im Jahr 2009 17.066 Frauen an Brustkrebs verstorben.

Die Prognose einer erkrankten Frau hängt auch heute noch von einer Vielzahl verschiedener Faktoren ab, die sowohl klinisch, patho-morphologisch als auch immunhistochemisch definiert werden. Hierbei werden Erkrankungsalter, der klinische Befund, das Tumorigradung, der Hormonrezeptorstatus, vorliegende Multifokalität beziehungsweise -zentrität sowie die Expression von diversen Faktoren des Tumors (wie z. B. Antigen Ki-67, c-erbB1-3, p53 und weitere) mit einbezogen [6].

## 1.2. Entstehen und Genese des Mammakarzinoms

### 1.2.1. Risikofaktoren

Auch wenn die Ätiologie des Mammakarzinoms, abgesehen vom hereditären Typ, nach wie vor weitgehend unbekannt ist, haben während der letzten Jahrzehnte zahlreiche klinische Studien gezeigt, dass es viele verschiedene Faktoren gibt, die das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, deutlich erhöhen [7].

Dazu gehören vornehmlich das weibliche Geschlecht und das Alter [8]. Das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, ist bei Frauen über 50 Jahre im Vergleich zum Risiko bei Frauen unter 50 Jahre bis zu 6,5-fach erhöht [9].

Unter anderem spielt jedoch auch das Geburtsland beziehungsweise das Land, in dem man den Großteil seines Lebens verbracht hat, eine Rolle [10]. Dies wird dadurch erklärt, dass Frauen in der Menopause je nach Geburts- bzw. Aufenthaltsland ein anderes durchschnittliches Körpergewicht aufweisen [11]: ein vermehrtes Fettgewebe, ist – wie hinlänglich bekannt – in der Lage, Östrogen und Progesteron selbst zu produzieren [12], was zu erhöhten Spiegeln an endogenem Östrogen und Progesteron im Serum führt und bei diesen Frauen das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken steigert [11, 13, 14]. Zudem ist das Durchschnittsalter bei Eintritt in die Menopause in den verschiedenen Ländern unterschiedlich, sodass Frauen, die über eine längere Zeitspanne endogen produziertem Östrogen und Progesteron ausgesetzt sind, ebenfalls ein erhöhtes Brustkrebsrisiko aufweisen [15].

Ferner zählen zu weiteren Risikofaktoren eine erhöhte Brustgewebedichte in der Mammographie [16], atypische Hyperplasien mit einer etwas über vierfachen Erkrankungswahrscheinlichkeit [17], Spätgebärende über dem 30. Lebensjahr mit einem 1,2- bis 1,5-fach erhöhten Risiko [18], eine körpereigene erhöhte Östrogenproduktion [18], eine frühe Menarche, verbunden mit einem späten Eintritt in die Menopause [18], erhöhter Alkoholkonsum [19] sowie Nikotinabusus [20]. Als weiterer etablierter Risikofaktor gilt die für ein Mammakarzinom positive Familienanamnese. Eine Frau mit einer an Brustkrebs erkrankten Mutter oder Schwester hat ein bis zu dreifach erhöhtes Risiko, ebenfalls an Brustkrebs zu erkranken [21] (siehe hierzu auch 1.2.2.). Zudem steigt das Risiko weiter an, wenn mehrere Familienangehörige betroffen

sind, bei den Betroffenen ein junges Erkrankungsalter vorliegt oder beide Brüste betroffen sind.

### 1.2.2. Genetische Formen

Im Weiteren sind hereditäre Formen des Mammakarzinoms zu nennen, die etwa fünf bis zehn Prozent der Brustkrebsfälle ausmachen [22]. An erster Stelle sind da die Gene BRCA1 auf Chromosom 17q und BRCA2 auf Chromosom 13q sowie RAD51C zu nennen, welche sich durch eine hohe Penetranz auszeichnen. Eine Frau, die eine Mutation in einem der oben genannten Gene trägt, hat ein 80-90%iges Risiko, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken [5]. Veränderungen in diesem Gen führen zudem zu einem erhöhten Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Ferner sind noch die Gene ATM, CHEK2, BRIP1 und PALB2 zu erwähnen, die mit einer mäßigen Penetranz und dem 1,5 bis fünffach erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken einhergehen [23] sowie weitere Gene (FGFR2, TOX3, MAP3K1, CAMK1D, SNRPB, FAM84B/c-MYC, COX11, LSP1, CASP8, ESR1, ANKLE1, MERIT40 und andere), die mit einer geringen Penetranz und einem 0,7 bis 1,5 erhöhten Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken einhergehen [24].

Zudem können auch in den Mammakarzinomen selbst Veränderungen nachgewiesen werden, von denen angenommen wird, dass sie den malignen Phänotyp beeinflussen können. Es handelt sich hierbei um Genamplifikationen, oftmals auch amplifizierte Onkogene bezeichnet. Die wichtigsten hierbei sind das Gen FGFR1 auf dem Locus 8p12, FGFR2 auf 10q25, MYC auf 8q22 sowie ESR1 auf 6q25.1 [25]. Somit können Genmutationen, vererbt oder sporadisch, zur Aktivierung von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen führen.

Neben genetischen Faktoren spielen auch epigenetische Veränderungen (vererbare Veränderungen der Genfunktion, die nicht die primäre DNA-Sequenz sondern die Aktivität von Genen beeinflussen [26]) wie Histonmodifikationen (Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung [27]), die Methylierung der DNA [28] sowie Veränderungen der MicroRNA (zum Beispiel durch Herunterregulation [29, 30] oder Hypermethylierung [31, 32]) bei



der Karzinomentwicklung eine Rolle. Im invasiven Mammakarzinom enthalten zum Beispiel fast alle Gewebeproben zumindest ein hypermethyliertes Gen, 80% enthalten zwei und 60 % enthalten drei oder mehr methylierte Gene [33, 34]. Im Gegensatz dazu enthielt nur eine von acht Proben aus Brustverkleinerungen hypermethylierte Gene [33, 34].

### 1.3. Klassifikation des Mammakarzinoms

Das Brustgewebe besteht aus drei verschiedenen Gewebetypen, dem Drüsen-, Binde- sowie Fettgewebe. Drüsenläppchen (Lobuli) und Drüsenlappen bilden das Drüsengewebe. Die Drüsenläppchen produzieren die Milch, welche über die abführenden Gänge schließlich in die Mamille mündet. Die meisten aller malignen Mammakarzinome gehen von den Lobuli und den Milchgängen, den Duktuli, aus [35]. Circa (ca.) 15-20% der Mammakarzinome stellen *Carcinoma in situ* (CIS) dar, diese unterteilen sich zu ca. 95% in duktales CIS und zu ca. 5% in lobuläres CIS (lobuläre intraepitheliale Neoplasien) [36]. Die invasiven Mammakarzinome stellen zwischen 80-85% der Mammakarzinome dar und lassen sich in duktales, lobuläres, medulläres, tubuläres, muzinöses sowie papilläres Formen unterteilen; ca. 40-75% der invasiven Karzinome sind duktales und 5-15% lobulärer Genese [36].

Histologisch werden Mammakarzinome anhand der Tubuli-Ausbildung, der Kernpolymorphie (gering – mittel – stark) sowie der Mitosenanzahl bezüglich der Malignität und der Differenzierung (Grading [G]) eingeordnet, wobei G1 für eine gute, G2 für eine mäßige sowie G3 für eine schlechte Differenzierung steht [36]. Je höher dabei das Grading ist, desto schlechter sind die Prognose der Karzinomkrankung und deren Behandlungschancen. Offiziell erfolgt die Einteilung nach dem TNM-System (siehe hierzu auch <http://www.uicc.org/resources/tnm>), in dem die Tumorgöße (T1-4), Lymphknotenbefall (N0-3) sowie Metastasen (M0-1) einfließen. Eine immer wichtigere Rolle wird der molekularen Klassifikation von Tumoren zuerkannt, beim Mammakarzinom sind der Steroidhormonrezeptor- sowie der HER2-Status von großer Bedeutung, da sich dadurch unterschiedliche Behandlungsoptionen aber auch Prognosen herleiten [37].

## 1.4. Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms

In den letzten zehn Jahren haben Fortschritte auf dem Gebiet der molekularen Charakterisierung von Krebsgewebe unser Wissen über Heterogenität von Brustkrebs auf ein neues Niveau gehoben [38]. In ihrer bahnbrechenden Arbeit haben *Perou und Mitarbeiter* die Basis geschaffen, um die phänotypische Diversität der primären Brusttumoren entsprechenden Genexpressionsprofilen zuzuordnen. Sie ermöglichte die Klassifizierung von Brustkrebs in vier - später fünf - verschiedene molekulare Subtypen: Östrogen-Rezeptor (ER) - positive [ER+] / Luminal-A oder -B, *basal-like*, HER2+ und „*normal Breast-like*“ [39, 40]. Die Existenz dieser fünf molekularen Subtypen wurde später im unabhängigen Datensätzen [41] bestätigt und mit signifikanten Unterschieden bei der Tumorstreuung assoziiert - unabhängig von konventionellen klinisch-pathologischen Variablen [42].

Diese molekularen Subtypen, die ursprünglich auf die unterschiedliche Expression einer Reihe von Genen beruhte, wurden vor kurzem in eine klinisch-pathologische Klassifikations-Methode auf Basis der immunhistochemischen Bestimmung der ER/PR-Expression, dem HER2-Status, der Proliferation oder dem histologischen Grad übertragen [43][44]. Dies veranlasste Experten der 2011 *St. Gallen Consensus Conference* dazu diese „Ersatz-Definition“ für intrinsische Brustkrebs-Subtypen (*Luminal A-like*, *Luminal B-like* [HER2-], *Luminal B-like* [HER2+], HER2 und *basal-like*) in der klinischen Anwendung einzuführen um das Mammakarzinom besser definieren und folglich besser therapieren zu können [45].

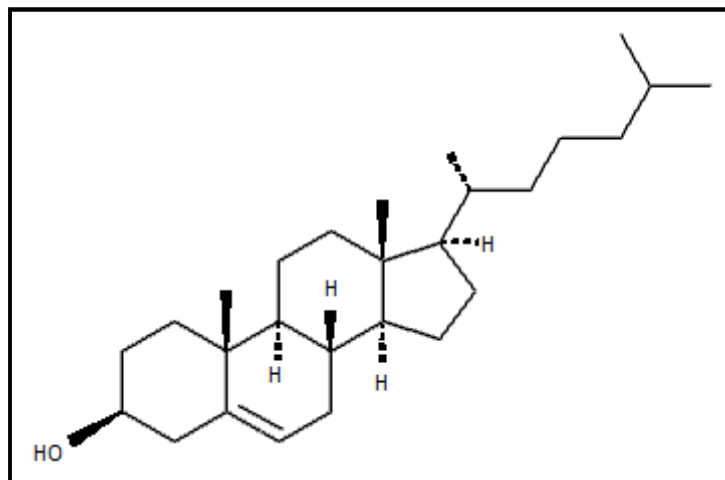
## 1.5. Bedeutung von Steroidhormonrezeptoren in der Genese und Behandlung von Mammakarzinomen

### 1.5.1. Steroidhormone

Hormone dienen zur Informationsübertragung und Regulierung von Wachstum, Entwicklung, Reproduktion, Verhalten, Aufrechterhaltung der Homöostase, Zellstoffwechsel sowie dem Energiehaushalt [46]. Als Steroidhormone werden

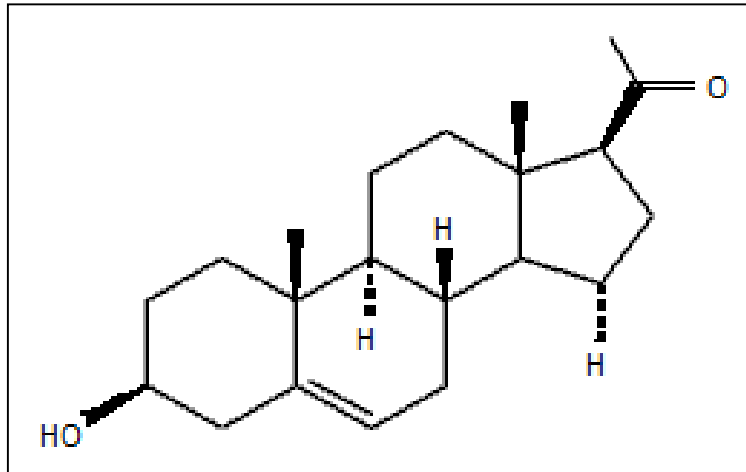
hormonell wirksame Steroide bezeichnet und sie machen ca. 15% der beim Menschen vorkommenden Hormone aus. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie sich vom Grundbaustein Cholesterin (siehe Abbildung [Abb.] 1) ableiten.

Zu ihnen gehören neben den Glucocorticoiden (Biosynthese in der Nebennierenrinde), die Androgene (Biosynthese in den Testes) sowie die Gestagene und Östrogene (Biosynthese in den Ovarien und der Plazenta) auch die Mineralocorticoide (Synthese in der Nebennierenrinde) [47]. Ein kleinerer Anteil der Steroidhormone wird auch im weißen Fettgewebe synthetisiert [48]. Bei allen oben genannten Steroidhormonen wird zunächst aus Cholesterin unter Zuhilfenahme des *steroid acute regulator*-Proteins, welches das Cholesterin von der Zellmembran transportiert, in den Mitochondrien durch das Enzym CYP11A1 das Prohormon Pregnenolon (siehe Abb. 2) synthetisiert (Pregnenolon entsteht durch Abspaltung der Cholesterin-Seitenkette) [48].



**Abb. 1:** Strukturformel von Cholesterin

Abkürzungen: O = Sauerstoffatom, H = Wasserstoffatom



**Abb. 2:** Strukturformel von Pregnenolon

Abkürzungen: O = Sauerstoffatom, H = Wasserstoffatom

Im Anschluss daran kann aus diesem Prohormon (Pregnenolon) in weiteren Schritten entweder direkt Progesteron oder über verschiedene Zwischenstufen Testosteron oder Cortisol katalysiert sowie aus den Androgenen (durch Aromatase-vermittelte enzymatische Oxidation) schließlich Östrogene synthetisiert werden [48].

Wichtige Aufgaben der unterschiedlichen Steroidhormone sind die Mediation bei Entzündungsprozessen und der Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel (Glukocorticoide), die Aufrechterhaltung der Homöostase (Mineralocorticoide), sowie die Entwicklung und der Erhalt der Fortpflanzungsorgane (Androgene, Östrogene, Gestagene) [46, 48]. Biologisch aktiv sind Steroidhormone bereits in kleinsten Mengen und daher werden sie in der Regel nur in geringen Mengen produziert [48]. Da sie durch ihren Steroidkern zwar lipophil aber dadurch eben auch hydrophob sind, sind für ihren Transport zum eigentlich Bestimmungsorte bestimmte Proteine (*sexual hormone binding globulins*) von Nöten [48]. Einmal an der Zielzelle angekommen, können Steroidhormone aufgrund ihrer Lipophilie durch die Zellmembran „hindurch diffundieren“ beziehungsweise an membranständige Rezeptoren von Trägerproteinen binden (dies entspricht einer Rezeptor-vermittelten Endozytose) und im Zellinneren somit an spezifische Rezeptoren binden [48, 49].

Das Wachstum und die Entwicklung der weiblichen Brustdrüse wird durch Steroidhormone (Östrogene und Gestagene) und über deren Hormonrezeptoren reguliert [50] und unterliegen in der Pubertät wie auch in der Schwangerschaft deren Einfluss [51]. Östrogene führen zu raschem Wachstum und auch zur Verzweigung des Brustdrüsengangsystems. Es konnte jedoch bereits frühzeitig nachgewiesen werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Östrogenexposition im Brustdrüsengewebe und der Genese von Mammakarzinomen besteht [52-56]. Die stimulierende Östrogen-Wirkung auf die Zellproliferation besteht nicht nur in gesundem, sondern auch malignem Brustgewebe. Über welche genauen Mechanismen Östrogen auf die Entstehung von Tumoren Einfluss ausübt, konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden, jedoch wird eine mögliche Verbindung der mutagenen Wirkung von 17- $\beta$ -Estradiol und seiner Abbauprodukte auf Brustepithelzellen [57, 58] angenommen. Zudem steuern die Steroidhormone die Synthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche über Steigerung der Zellproliferation sowie Signalaktivierung zu einem Wachstumsstimulus für Tumorzellen führen [59-61].

Zur Differenzierung des lobuloalveolären Systems der Brustdrüse erfordert es die Wirkung von Progesteron [62]. Zudem hemmt Progesteron, welches in der zweiten Zyklushälfte im *Corpus luteum*, während der Schwangerschaft in der Plazenta, bei Männern in den Gonaden sowie bei Männern und Frauen zu geringen Anteilen in den Nebennierenrinden gebildet wird [46], die sekretorische Aktivität des alveolären Epithels [63]. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Maximum an Mitosen im Brustepithel zum kurz vorher auftretenden Progesteron-Konzentrationsmaximum besteht [64]. Seine Wirkungen entfaltet Progesteron jedoch erst durch Bindung an und damit Aktivierung zytosolischer und membranständiger Progesteronrezeptoren (PR) [65, 66].

Im Weiteren hemmt Progesteron die Neusynthese von Estradiolrezeptoren durch Aktivierung von 17 $\beta$ -Estradiolhydrogenase, welche Estradiol zum weitaus schwächer wirksamen Estron metabolisiert [62].

#### 1.5.2. Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormone üben im Gegensatz zu Protein- und Peptidhormonen, die über Zellmembran-gebundene Rezeptoren wirken [67, 68], ihre zellspezifischen Wirkungen durch Reaktion mit intrazellulären Rezeptorproteinen aus [69-71]. Steroidhormonrezeptoren kommen in den Zielzellen an der Plasmamembran, dem Zytosol sowie Nukleus vor [69].

Der „klassische“, das heißt genomische, Steroidhormonrezeptor kommt in hormonreaktiven Zellen intrazellulär vor und stellt damit einen potentiellen Regulator der Genexpression dar beziehungsweise schaltet nach spezifischer Bindung des Steroidhormons die spezifische Genfunktion an und bewirkt dadurch die zell- und hormonspezifische Reaktion [62, 70, 71]. Ohne Hormonbindung sind die Steroidhormonrezeptoren mit anderen intrazellulär vorkommenden Proteinen, dabei vor allem Hitzeschock-Proteinen, assoziiert, welche die DNA-bindende Region der Rezeptoren blockieren und sie somit in inaktivem Zustand halten [72, 73]. Reagiert der Rezeptor jedoch mit dem spezifischen Hormon, wird diese Verbindung durch eine Konformationsänderung auseinandergerissen, wodurch der Rezeptor in der Lage ist, als Dimer an das *hormone responsive element* eines spezifischen Gens anzudocken und dadurch zum Beispiel die Synthese von mRNA zu initiieren (dieser Vorgang wird Transkription genannt) oder zu inhibieren [62]. Die durch die Hormonbindung an den Rezeptor induzierte Konformationsänderung in die aktive Form des Hormonrezeptors wird Transformation genannt, nur in dieser Form kann der Rezeptor an den Zellkern binden und dort die Transkription auslösen. Nach erfolgreicher Transformation erfolgt der Transfer des Hormon-Rezeptor-Komplexes an eine spezifische DNA-Bindungsstelle beziehungsweise an eine spezifische Nukleotidsequenz (*hormone response element*) durch die Kernporen in den Zellkern. Dieser Vorgang wird Translokation genannt und ist Folge der Konformationsänderung

des Rezeptors mit Freilegung einer Kernlokalisationssequenz [46, 71, 74, 75]. Zu den klassischen Steroidhormonrezeptoren gehören die Östrogenrezeptoren (ER), Östrogen-ähnliche Rezeptoren (zum Beispiel ERR $\alpha$ ) sowie die 3-Ketosteroidrezeptoren (Glucocorticoid-Rezeptoren, Mineralocorticoidrezeptoren, Progesteron- und Androgenrezeptoren) und sie alle gehören der Superfamilie der nukleären Rezeptoren *nuclear receptor family 3* an [76]. Allen nukleären Rezeptoren ist eine charakteristische Proteinstruktur eigen, die sich aus fünf bis sechs Homologiedomänen zusammensetzt. Eine Domäne ist eine Proteinabfolge mit evolutionär festgelegter Sequenz und Funktion [77]. Die Domänen A und B beschreiben die variable N-terminale transkriptionsaktivierende Rezeptorfunktion; in der sich anschließenden C-Domäne interagiert der Rezeptor mit der DNA und bindet diese; die D-Domäne enthält die Kernlokalisationssequenz; die E-Domäne stellt die Bindungsstelle des Rezeptors für das Steroidhormon dar; über die nicht bei jedem Steroidrezeptor vorkommende F-Domäne, die am C-terminalen Ende liegt, ist bisher noch wenig bekannt [77].

Neben den klassischen Steroidhormonrezeptoren gibt es membranständige Steroid-bindende Rezeptoren, die sich sowohl strukturell als auch funktionell von den klassischen Rezeptoren unterscheiden [78-80]. Häufig vermitteln sie rasche Steroideffekte für beinahe alle Steroidtypen, deren Wirkung bereits Sekunden bis Minuten nachweisbar ist und deren Effekte über eine Signalkaskade bis in den Zellkern geleitet werden [78, 81, 82]. Diese raschen Wirkungen von Steroiden können neben den membranständigen Steroid-bindenden Rezeptoren auch über in der Plasmamembran verankerte klassische Steroidrezeptoren, membranöse Signalproteine (zum Beispiel G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) oder Ionenkanäle vermittelt werden [78-80]. Als wichtiges Beispiel der Vertreter der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren ist hierbei der membranständige Progesterinrezeptor als herauszustreichen [83], der eine hohe Affinität für Progesteron aufweist und einer seiner Subtypen durch Reduktion der Adenylatcyclaseaktivität eine wichtige Funktion in Fortpflanzungsorganen zugesprochen wird [84]. Ein anderes wichtiges Beispiel

der membranständigen Rezeptoren sind die membran-assoziierten Progesteronrezeptor-Proteine [85], auf deren besonderen Vertreter Progesteronrezeptor-Membran Komponente 1 (PGRMC1) nochmals gesondert im Folgenden eingegangen wird.

#### 1.5.2.1. Östrogenrezeptoren

Seit der Entdeckung des ersten Östrogenrezeptors (ER $\alpha$ ) im Jahre 1966 [86], ist dieser zum Forschungsmittelpunkt vieler verschiedener Forschungsgruppen geworden und es konnte aufgrund dessen im Jahr 1996 ein weiterer ER (ER $\beta$ ) identifiziert werden [87, 88]. Die Rezeptoren werden durch zwei verschiedene Gene auf Chromosom 6q (ER $\alpha$ ) und Chromosom 14q (ER $\beta$ ) kodiert. Von beiden Östrogenrezeptoren existieren verschiedene Isoformen [89].

ER $\alpha$  ist für die im Wesentlichen durch Estradiol vermittelten Wirkungen insbesondere an Brustdrüsen, Endometrium, Arterien und Knochen zuständig. ER $\beta$  wirkt ebenfalls an den Brustdrüsen, jedoch auch in den Ovarien, Lunge, ZNS, Muskeln und der Leber. Da die Hormonbindungsdomäne der beiden Rezeptoren nur zu ca. 50% identisch ist, ergibt sich hieraus die Chance, gezielt als Medikament nutzbare Agonisten und Antagonisten zu entwickeln, die selektiv einzelne östrogene Effekte hemmen oder fördern können. Diese Möglichkeit ist von besonderer Bedeutung, da bereits früh in Tiermodellen als auch in klinischen Beobachtungsstudien nachgewiesen werden konnte, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Östrogen-Exposition im Brustdrüsengewebe und der Genese von Mammakarzinomen besteht [52-56]. Als Beispiel ist hierbei der Wirkstoff Tamoxifen zu nennen, der durch Bindung seines Metaboliten Endoxifen an die ER die Östrogenwirkung in Mammakarzinomzellen hemmt, aber östrogenartige Effekte an Knochen und Endometrium vermittelt [90]. Im Vergleich zum normalen, nicht entarteten Brustgewebe weist das Mammakarzinom eine veränderte Expression der Östrogenrezeptoren auf, es wird dabei eine Zunahme der ER $\alpha$ - sowie eine Abnahme der ER $\beta$ -Expression beobachtet [91, 92]. Bemerkenswert ist auch die vermehrte Expression einer ER $\alpha$ -Isoform im Mammakarzinom, die eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Estradiol besitzt [93]. Dies alles deutet



darauf hin, dass die Veränderung der Hormonrezeptor-Expression eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese des Mammakarzinoms einnehmen muss.

#### 1.5.2.2. Progesteronrezeptoren

Neben den ER stellen die PR die zweite wichtige Rezeptorgruppe im Brustgewebe dar. Die PR befinden sich im Nucleus sowie im Zytoplasma und es können auch bei den PR Isoformen unterschieden werden, PR-A und PR-B [94], die phosphoryliert vorliegen [95]. Die beiden Isoformen werden von demselben Gen (PGR auf 11q22) codiert. Es werden jedoch unterschiedliche Promotoren und zwei unterschiedliche Startstellen der Translation benutzt, um die zwei Isoformen herzustellen, wobei PR-B zusätzlich 165 Aminosäuren an seinem N-terminalen Ende aufweist [96, 97]. PR-A und PR-B weisen einige strukturelle Gemeinsamkeiten auf, beide Isoformen bestehen aus DNA-Bindungsdomäne, Liganden-Bindungsdomäne und zwei transkriptionellen Aktivierungsfunktionen. Jedoch unterscheidet sich der transkriptionell potenter wirkende PR-B von PR-A durch eine zusätzlich an seinem N-Terminalen Ende vorliegende Aktivierungsfunktion [98, 99]. Funktionell hemmt PR-A die Östrogen- und Progesteron-vermittelte Zellproliferation, wohingegen PR-B alleine durch Interaktion mit dem ER eine unterstützende Wirkung auf Proliferation aufweist [100]. Augenfällig ist zudem, dass die beiden Isoformen unterschiedliche und sich nicht-überlappende Gen-Domänen regulieren [101].

Die Aktivierung der PR erfolgt zum einen klassisch über die Ligandenbindungsstelle, die über die Schritte einer Translokation im Zellkern, Bindung in der Promotorregion an *progesterone response elements*, die Anlagerung von Koaktivatoren in einer Translation der Zielgene mündet [102]. Daneben ist jedoch auch eine Translationsregulierung von Genen durch einen aktivierten PR möglich, deren Promotorregion keine *progesterone response elements* aufweisen, PR nimmt dabei eine Brückenfunktion zwischen Koaktivatoren und Transkriptionsfaktoren ein [103-105]. Darüberhinaus haben PR die Fähigkeit, die Genexpression indirekt über zytoplasmatische Kinasekaskaden zu beeinflussen [100, 106]. Auch das PGR-Gen selbst stellt eine

wichtige Zielstruktur für aktivierte Östrogenrezeptoren dar [107]. Die Expressionsstärke der PR kann daher als ein Maß für die Aktivität der Östrogenrezeptor-Kaskade angesehen werden. Einen regulierenden Effekt der zeitgleichen Expression von ER $\alpha$  und ER $\beta$  zeigt sich, dass bei Vorhandensein von ER $\beta$ 2 in ER $\alpha$ - positiven Mammakarzinomen die schwache Expression von PR mit der von ER $\beta$ 2 korreliert [108]. Der PR kommt nicht nur im Brustgewebe vor, sondern kann auch im Ovar, dem Endometrium, dem zentralen Nervensystem, dem Thymus, dem Pankreas sowie in der Lunge nachgewiesen werden [109-112]. Das Hormon Estradiol, das einen wachstumsfördernden Effekt auf Brustgewebe vermittelt, führt auch zur Induktion von Progesteronrezeptoren [62].

#### 1.5.2.3. Progesteronrezeptor-Membrankomponente 1

PGRMC1 ist ein bei Wirbeltieren vorkommendes Protein mit einer sich am N-Ende befindenden Transmembran-Domäne und einer sich im Zytosol befindenden Cytochrom-b5-Domäne. Es gehört zu der sogenannten Membran-assoziierten Progesteronrezeptor Protein Familie (MAPR), welche in Eukaryonten weit verbreitet ist [85]. PGRMC1 wird auf Chromosom Xq22-q24 kodiert [113]. Trotz seines Namens bindet PGRMC1 nicht direkt an Progesteron [114] und hat keine biologische Übereinstimmung mit Steroid-Rezeptoren weder nukleär noch membran-assoziiert [115].

In vorangehenden Studien zeigte sich, dass jeweils zwei Formen von PGRMC1, einmal phosphoryliert (phospho-S180-PGRMC1 = pPGRMC1) und einmal nicht-phosphoryliert (PGRMC1), vorliegen [116, 117]. PGRMC1 kann in mehreren Karzinomarten und Krebszelllinien, wie zum Beispiel in Mammakarzinomen nachgewiesen werden [118, 119], und wird auch in Lungen- und Ovarialkarzinomen überexprimiert [120-122]. Laut *The Human Protein Atlas* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) wird PGRMC1 mäßig in normalem, epithelalem Brustgewebe exprimiert und im Gegensatz dazu wird in Mammakarzinomen PGRMC1 in etwa einem Drittel der untersuchten Gewebe stark exprimiert.

Auch Spermazellen scheinen auf ihrer Zelloberfläche PGRMC1 zu besitzen, da in Versuchen gezeigt wurde, dass ein Antikörper (AK) gegen die N-terminale-

Region spezifisch die Progesteron-gesteuerte Akrosomenreaktion, welche die Spermien-Fusion mit der Eibefruchtung begleitet, blockieren konnte [123].

#### 1.5.2.3.1. Lokalisation in der Zelle

Erstmals wurde PGRMC1 aus mikrosomalen Membranteilen der Schweineleber aufgereinigt [124]. Dabei wurde gezeigt, dass PGRMC1 mit dem endoplasmatischen Retikulum zusammen in Leberextrakten eine Fraktion bildet [125, 126]. Zudem wird eine perinukleare Lokalisation, als Übereinstimmung mit der Lokalisation des ER selbst, in Michigan Cancer Foundation-7-Zellen (MCF-7) beobachtet [127]. PGRMC1 liegt sowohl als 28 Kilodalton-Isoform in mikrosomalen und mitochondrialen Fraktionen als auch als 58 Kilodalton-Isoform im Zytosol vor [128]. Im Jahr 2005 konnte von *Min et al.* eine diffuse Verteilung von *inner zone antigen 1* (IZA1) im Zellinnern beschrieben werden, die vesikuläre Formen bildete, was die Assoziation von IZA1 mit Membrankomponenten und mit Cytochrom b5 des endoplasmatischen Retikulums in HeLa-Zellen co-lokalisiert [114]. Immunhistochemische Färbungen von neonatalen hippocampalen Purkinje-Zellen zeigen eine Verteilung am endoplasmatischen Retikulum und am Golgi-Apparat [129] und es konnte eine PGRMC1-Fraktion in spontan immortalisierten Granulosa-Zellen (SIGCs) nachgewiesen werden [130, 131].

Das HC5-Protein, welches im Wesentlichen dem verkürzten N-terminalen Ende von PGRMC1 einschließlich der Transmembrandomäne entspricht, scheint sich selbst jedoch nicht in der Membran selbst zu befinden, da in Versuchen ein genau für diese Region hergestellter AK, ein 10 Kilodalton Protein, im Zytosol der Leber, nicht aber die mikrosomalen Fraktionen zu erkennen im Stande war. Die Anti-HC5-AK und die monoklonalen IZA-AK erkannten die 25 und 28 Kilodalton Proteine in den mikrosomalen Fraktionen, aber nur ein 25 Kilodalton Protein in den zytosolischen Fraktionen, was darauf hindeutet, dass PGRMC1 in der Lage ist, zwischen Membran-gebundenen und zytosolischen Formen zu wechseln [132].

Zuletzt veröffentlichte experimentelle Daten zeigen, dass zusätzlich zu den intrazellulär lokalisierten Rezeptoren [126, 133] PGRMC1 mit einer Membran-

assoziierten Progesteronrezeptor-Aktivität assoziiert ist [84], was bedeutet, dass PGRMC1 sowohl in der Plasmamembran als auch im Zellkern gefunden werden kann [131, 134, 135]. Zudem enthält PGRMC1 mehrere Angriffspunkte für Protein-Wechselwirkungen [136, 137] und Phosphorylierungen [116, 138], sodass der Phosphorylierungsstatus mit der Lokalisierung in der Zelle selbst korrelieren könnte [117, 139].

#### 1.5.2.3.2. Funktion von PGRMC1

Die einzige bisher bekannte biochemische Funktion von PGRMC1 stellt die Bindung zu Häm dar [140, 141]. PGRMC1 teilt markante Strukturelemente mit Cytochrom  $b_5$  [115], einem Häm-bindenden Protein, welches für die Aktivierung von Cytochrom P450-Proteinen zuständig ist [142]. Und auch PGRMC1 bindet an und aktiviert dadurch Cytochrom P450-Proteine [114, 143, 144], welche für die Metabolisierung von Lipiden, Hormonen und Medikamenten zuständig sind, Bemerkenswerterweise benötigt PGRMC1 dieselben Strukturen, die für die Häm-Bindung notwendig sind auch für seine Assoziation mit einem unbekanntem Progesteron-bindenden Protein [133].

In unizellulären Eukaryoten interagieren Homologe von PGRMC1 mit P450-Proteinen, vornehmlich Cyp51 und Erg 11, zur Sterolsynthese und zum Schutz der Zellen vor DNA-Schäden [144-148]. In höheren Organismen bindet PGRMC1 an weitere P450-Proteine und hat zusätzliche Bindungspartner mit möglichen Funktionen im Medikamenten- und Hormon-Metabolismus, der Apoptose-Suppression (über PAIRBP1) und die Regulation des Cholesteroll-Stoffwechsels (über SCAP und Insig) [85, 133].

Es besteht darüber hinaus der Hinweis, dass PGRMC1 Teil eines Proteinkomplexes ist, der den anti-apoptotischen Effekt von Progesteron auf Granulosa-Zellen vermittelt, ein Effekt, den man sich bei Krebserkrankungen zu Nutzen machen könnte [131, 149]. Zudem war PGRMC1 Teil einer Hypoxie-voraussagenden Proteinsignatur was für seine Induktion durch Zellstress, wie zum Beispiel Hypoxie, spricht [144, 150]. Interessanterweise liegt der PGRMC1-Promotor in Ovarialkarzinomen hypermethyliert vor [151].

Einer der P450-vermittelten Wege zu dem PGRMC1 beisteuern könnte, ist die Synthese und der Metabolismus von Östrogen und Progesteron, die beide aus Cholesterol durch multiple P450-Proteine hergestellt werden [152], jedoch gibt es für eine Beeinflussung oder Teilnahme von PGRMC1 zum Hormon-Metabolismus noch keinerlei wissenschaftliche Beweise für ein solche Annahme.

#### 1.5.2.3.3. Stellt PGRMC1 selbst überhaupt einen PR dar?

Es besteht eine bereits langjährig nachgewiesene Beziehung zwischen PGRMC1 und dem Signalweg von Progesteron [152]. Jedoch wurde PGRMC1 erstmals in Mikrosomen der Leber identifiziert [124], es wird sowohl in männlichen als auch weiblichen Individuen exprimiert [134] und hat Homologe in Organismen, die Progesteron nicht synthetisieren [152]. Gereinigtes PGRMC1 bindet nicht an Progesteron [114] und die überwiegende Mehrheit von PGRMC1 ist nicht an der Plasmamembran lokalisiert [118, 126, 153], sodass zuletzt die Hypothese entstand, dass PRMC1 nicht selbst als PR fungiert [85, 136].

Die PGRMC1-assoziierte Progesteron-Bindung benötigt ein bisher nicht bekanntes Protein, das nur in teilweise gereinigten PGRMC1 Präparationen vorkommt [133]. Die PGRMC1-assoziierte Progesteron-Bindung ist funktionell (in Tumorzellen) wichtig da Progesteron die Apoptose in Granulosa-Zellen inhibiert und diese anti-apoptotische Aktivität benötigt PGRMC1 [131, 133] Es ist jedoch unklar, wie PGRMC1 den anti-apoptotischen Signalweg von Progesteron durchführt. *Plasminogen activator inhibitor 1 RNA binding protein* (PAIRBP1) bindet an PGRMC1, aber eine veränderte PGRMC1-Variante, die an PAIRBP1 bindet, wird nicht mit einer Progesteron-bindenden Aktivität geklärt [133], sodass die Bindung von PAIRBP1 und Progesteron womöglich nicht funktionell verlinkt ist [152].

Die PGRMC1-assoziierte Progesteron-Bindungsaktivität hat eine ähnliche Affinität zu Kortikosteronen, Testosteronen und Kortisol [124], sodass eine nur limitierte Spezifität für Hormonbindungen diskutiert werden muss. Bemerkenswerterweise „ringt“ die PGRMC1-assoziierte Progesteron-Bindung

mit dem Antipsychotikum Haloperidol [154]. Da die Progesteron-Bindung auch durch andere Stoffe wie Fluphenazin, Carbetapentan, Citrate gehemmt wird, könnte der PGRMC1-Komplex einen gemischten Steroid-/Medikamenten-Bindungskomplex darstellen [154].

Ein mögliches Modell könnte die Bindung von Progesteron an den PGRMC1 Steroid-/Medikamenten-Bindungskomplex darstellen, der ein Signal aussendet und sich dann zu einem Cyp21-Komplex wandelt, welcher dann Progesteron metabolisiert. Theoretisch könnte derselbe Komplex an Steroide oder körperfremde Stoffe binden und diese dann zu weiteren P450-Proteinen leiten. Während die genaue Funktion von PGRMC1 im Progesteron-Signalweg noch unbekannt ist, reguliert Progesteron die Expression von PGRMC1 im Ovar [155] und im Corpus luteum (mit einer Zunahme der Expression während der Schwangerschaft) [156]. Im Endometrium von Affen wird PGRMC1 von Progesteron herunterreguliert [157] wie auch im Hypothalamus von Mäusen [134].

#### 1.5.2.3.4. Bedeutung von PGRMC1 im Mammakarzinom

Im Jahr 2005 wurde mittels Western Blot gezeigt, dass PGRMC1 häufiger in Mammakarzinomen als im gesunden Brustgewebe überexprimiert wird [118]. Im selben Jahr zeigte dieselbe Forschergruppe, dass PGRMC1 zu einer Gruppe von Genen gehört, die in der Lage sind, die Chemotherapie-Sensitivität von Krebszellen zu regulieren [158]. Von *Neubauer et al.* und der ProteoSys AG in Mainz wurden drei PGRMC1-Isoformen in Mammakarzinomen mittels zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) identifiziert, von denen zwei häufiger in Tumoren mit negativem ER-Status vorkamen [138, 159, 160]. Die Expression von PGRMC1 konnte in Versuchen durch die Behandlung mit Doxorubicin (Inhibitor der Topoisomerase II, Stoffgruppe der Anthracycline angehörend) und Camptothecin (Inhibitor der Topoisomerase I, Gruppe der Chinolinalkaloiden angehörend) erhöht werden [141]. Durch die Hemmung der Expression von PGRMC1 konnte eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Doxorubicin und auch Camptothecin erreicht werden [141]. Womöglich ist die Induktion von PGRMC1 Folge von Schäden an der DNA und

PGRMC1 könnte daher eine wichtige Rolle im Unterdrücken des Schaden-induzierten Zelltods in Krebszellen sein [152] und somit theoretisch durch PGRMC1-Antagonisten in Kombination mit Chemotherapeutika eine verbesserte Krebstherapie darstellen, da es die oben genannten Effekte von PGRMC1 abschwächen könnte.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PGRMC1 Einfluss auf ein erhöhtes Überleben von Karzinomzellen unter Chemotherapie haben könnte, beziehungsweise dass eine Störung der PGRMC1-Expression in Tumoren eine erhöhte Sensitivität der Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika ermöglichen könnte [153].

Die mutmaßliche Struktur von PGRMC1 weist eine prominente Stelle für die Ligandenbindung auf [152]. Zudem ist PGRMC1 mit einer Hormon- und/oder Medikamenten-bindenden Untereinheit assoziiert. All diese Eigenschaften der Struktur von PGRMC1 lassen darauf schließen, dass es direkt angesteuert werden kann und durch gezielte Inhibition das klinische Outcome von Mammakarzinomtherapien verbessern kann [152].

## 1.6. Therapie des Mammakarzinoms

Da das Mammakarzinom eine potentiell systemische Erkrankung darstellt, ist ein mehrstufiges therapeutisches Vorgehen sinnvoll. Zu den drei Therapieansätzen gehören die chirurgische Resektion, die Strahlentherapie sowie die systemische Therapie. Ziel der chirurgischen Resektion sollte dabei immer sein, den Tumor möglichst vollständig und *in sano* zu entfernen. Die Aufgabe der Strahlentherapie ist es, entweder das Risiko eines Lokalrezidivs zu senken oder bei zuerst inoperablem Befund, den Primärtumor auf eine Größe schrumpfen zu lassen, die dann reseziert werden kann. Bei der systemischen Therapie kann zwischen zwei verschiedenen Therapieansätzen unterschieden werden, dem neoadjuvanten oder dem adjuvanten Ansatz.

Beim neoadjuvanten oder auch präoperativen Therapieansatz ist das Ziel, das Tumolvolumen zu reduzieren. Dieser Ansatz erlaubt es später, mehr Frauen mit einer brusterhaltenden Therapie chirurgisch zu behandeln. Zudem kann mit

seiner Hilfe bereits *in vivo* eine Sensitivitätstestung von systemischen Therapeutika erfolgen. Dafür ist es notwendig, vor Therapiebeginn Brust- bzw. Tumorgewebe zu entnehmen und auf dessen histologische Merkmale hin zu untersuchen [161]. Die wichtigste Rolle hierbei spielt die pathologische Komplettremission (pCR), da sie mit dem Gesamt- sowie dem rückfallfreien Überleben korreliert. Ihr kommt daher eine wichtige Rolle als Surrogat-Marker für das Therapieansprechen zu [162]. Zudem bietet das Modell den Vorteil, dass schnell Informationen über die Chemosensitivität und Art des Tumors gewonnen und diese Informationen für die Auswahl der anschließenden adjuvanten Therapie nutzbar gemacht werden können.

Bei der neoadjuvanten Therapieform werden meist Taxane (Docetaxel und Paclitaxel) oder Anthrazykline (Adriamycin und Epirubicin) eingesetzt. Seltener kommen endokrine Therapeutika zum Einsatz. Als Voraussetzung für den Therapieansatz gilt allerdings, dass sich die Patientin bereits in der Menopause befindet und der Tumor einen positiven Hormonrezeptor-Status hat [163].

Die adjuvante oder postoperative Therapie setzt sich zum Ziel, disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen zu zerstören. In diesem Fall kommen drei ganz unterschiedliche Prinzipien zum Einsatz, nicht nur eine Chemotherapie, sondern auch eine Immuntherapie sowie eine endokrine Therapie. Dabei werden wie auch schon bei der neoadjuvanten Therapie vor allem Taxane und Anthrazykline eingesetzt [163]. Bei der Immuntherapie besteht die Möglichkeit eine Therapie mit einem monoklonalen gegen *human epidermal growth-factor receptor 2* (HER2/neu)-gerichteten AK, Trastuzumab (Herceptin®), durchzuführen. Dies wird jedoch nur bei Betroffenen als Option angeboten, bei denen eine HER2/neu-Überexpression im Tumor nachgewiesen werden konnte. Für die endokrine Therapie stehen vornehmlich Antiöstrogene (Toremifen und Tamoxifen), *Gonadotropin Releasing-Hormon-Analoga* (Goserelin und Leuprorelin) sowie Aromatase-Inhibitoren (Anastrozol, Exemestan und Letrozol) zur Verfügung [163].

Leider verstirbt trotz dieser verschiedenen Therapieoptionen ca. ein Drittel der betroffenen Patientinnen an ihrem Mammakarzinom [164]. Dabei sind die mit Abstand häufigste Todesursache Fernmetastasen [161]. Aus diesem Grund



nimmt der Steroidrezeptor-Nachweis zur Abschätzung und Wahl einer spezifischen Therapie beim Mammakarzinom unverändert einen hohen Stellenwert ein [165, 166].

Neue und eventuell medikamentös gezielt ansteuerbare Strukturen würden daher eine weitere Individualisierbarkeit der Therapie und somit eventuell eine verbesserte Prognose bedeuten.

## 1.7. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Da wie bereits erwähnt, immer noch rund ein Drittel der an Mammakarzinomen erkrankten Frauen verstirbt, müssen neue zelluläre Strukturen in Mammakarzinomzellen gefunden und nachgewiesen werden, die durch alte, neue oder noch zu entwickelnde Therapeutika angesteuert werden können und somit eine weitere Option für Erkrankte darstellen könne.

Eine dabei vielversprechende Struktur stellt dabei PGRMC1 dar.

Mit dieser Arbeit möchten wir:

1. die zelluläre Expression von PGRMC1 und deren Intensität in histologisch verschiedenen klassifizierbaren Mammakarzinomen mittels Immunhistochemie (IHC) beschreiben
2. Assoziationen mit zusätzlich exprimierten Hormonrezeptoren wie ER $\alpha$ , Gesamt-ER $\beta$  (ER $\beta$ t), ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2 und PR, dem Marker für die Tumor-Proliferationsrate Antigen Ki-67 (Ki-67), HER2/neu und dem Alter finden sowie
3. gegebenenfalls eine Änderung der Expression von PGRMC1 nach neoadjuvanter Therapie beschreiben.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Verwendete Chemikalien

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die in der folgenden Tabelle 1 (Tab.) aufgeführten Chemikalien verwendet.

**Tab. 1:** *Verwendete Chemikalien*

Produkt	Bezugsquelle/Hersteller
Ammoniaklösung 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y Solution Aqueous	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxyd (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin Lösung (Mayers)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Salzsäure (HCl) 1M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Papanicolaous Lösung 1a Harris' Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pertex® Medite	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris Base (TRIZMA® Base)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol, Isomerengemisch	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2. Verwendete Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer sowie, soweit während der Experimente notwendig gewordene Herstellung ebendieser, werden in Tab. 2 aufgeführt.

**Tab. 2:** *Verwendete Lösungen und Puffer*

Puffer-Lösung	Herstellung
Zitratpuffer (10x, pH 6)	58,8g Trinatriumcitratdihydrat auf 2000ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen und mit 0,1M Zitronensäure auf pH 6,0 einstellen, wird zur Anwendung 1:10 verdünnt
Zitronensäure 0,1M	4,2g Zitronensäure Monohydrat auf 200ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Tris/NaCl (10x, pH 7,6)	60,55g Tris (base) und 85,20g NaCl auf 1000ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen und mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen, wird zur Anwendung 1:10 verdünnt
Tris (base) 1M	60,57g Tris (base) auf 500ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen und mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen
Tris 0,1M/Tween 0,05% (Waschpuffer)	50ml 1M Tris (base) auf 500ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen mit 250µl Tween
3%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	10ml 30%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und 90ml Tris/NaCl (1x)line

### 2.1.3. Verwendete Reagenziensets

Die verwendeten Reagenziensets sowie deren Bezugsquelle werden in Tab. 3 dargestellt.

**Tab. 3:** *Verwendete Reagenziensets*

Produkt	Bezugsquelle/Hersteller
Antibody Diluent (AD)	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
CytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spektrum	Zytomed GmbH, Berlin, Deutschland
3,3'-Diamminobenzidin (DAB) Substrate Kit Brown	Zytomed GmbH, Berlin, Deutschland

#### 2.1.4. Verwendete Geräte und Materialien

Zuletzt werden die während der Arbeit verwendeten Geräte in Tab. 4 sowie deren Hersteller aufgeführt.

**Tab. 4:** *Verwendete Geräte*

Produkt	Bezugsquelle/Hersteller
Deckgläser	R. Langenbrink, Teningen, Deutschland
Färbeschalen	Hecht, Sondheim, Deutschland
Kochplatte	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Koordinatentisch K70	Proxxon, Niersdorf, Deutschland
Magnetrührer	ARE LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Mikroskop TE 2000-U	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrotom HM 355 S	MICROM, Walldorf, Deutschland
PAP-Pen	MBT, Gießen, Deutschland
Pasteurpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Perkutannadel (1,0 Millimeter)	Bard, New Jersey, USA
pH-Meter MP225	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Sauger	Schubert & Weiss, München, Deutschland
Schnellkochtopf	Fissler, Idar-Oberstein, Deutschland
Software Mikroskop: ACT ver. 2	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Superfrost-Objektträger	R. Langenbrink, Teningen, Deutschland
Vortex	VELP, Mailand, Italien

Waage CP 3235-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wärmeplatte (Slide Drying Bench)	Barnstead Electrothermal, Dubuque, Iowa, USA

### 2.1.5. Verwendete Antikörper und Blocking-Peptide

Die AK zum Nachweis von PGRMC1 und pPGRMC1 wurden von der ProteoSys AG in Mainz hergestellt und sind sowie alle anderen verwendeten AK, deren Verdünnung und Bezugsquelle in Tab. 5 dargestellt.

**Tab. 5:** Verwendete Antikörper

Antikörper	Charakteristika	Verdünnung	Bezugsquelle/Hersteller
3G11A2	Maus, monoklonal [spezifisch für pPGRMC1 (Phosphoserin 180)]	1:4000 [Konzentration unbekannt, da selbst hergestellt]	ProteoSys AG, Mainz, Deutschland
5G7	Maus, monoklonal [spezifisch gegen zytoplasmatischen Anteil von PGRMC1]	1:5 [Konzentration unbekannt, da selbst hergestellt]	ProteoSys AG, Mainz, Deutschland
CK (Zytokeratin) 18	Maus, monoklonal [DC 10]	1:2000 [keine Konzentrationsangabe des Herstellers]	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
ER $\alpha$	Kaninchen, monoklonal [SP1, spezifisch gegen das C-terminale Peptid von ER $\alpha$ ]	1:200 [keine Konzentrationsangabe des Herstellers]	DCS, Hamburg, Deutschland
ER $\beta$ 1	Maus, monoklonal [PPG5/10, spezifisch gegen das C-terminale Peptid von ER $\beta$ 1], 1,0mg/ml	1:1000	Serotec, Oxford, Großbritannien

ERβ2	Maus, monoklonal [57/3, spezifisch gegen das C-terminale Peptid von ERβ2]	spezifisch	1:500 [keine Konzentrationsangabe des Herstellers]	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
ERβt	Maus, monoklonal [14C8; spezifisch für die Peptide 1-153 des menschlichen ERβ], 1mg/ml	spezifisch	1:1000	GeneTex, Inc., San Antonio, USA
Ki-67	Maus, monoklonal [Mib-1], 1mg/ml	spezifisch	1:200	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
PR	Kaninchen, monoklonal [SP2, spezifisch für die Peptide 412-526 des menschlichen PR]	spezifisch	1:200 [keine Konzentrationsangabe des Herstellers]	DCS, Hamburg, Deutschland
Blocking peptide	Maus, monoklonal [spezifisch gegen 5G7], 1mg/ml	spezifisch	1:10	ProteoSys AG, Mainz, Deutschland

## 2.2. Methoden

Die Arbeiten an den Zellschnitten wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Arbeitsfläche wurde vor Beginn und nach Beendigung der Arbeitsschritte mit Alkohol (70%) abgewischt und es wurde immer mit Latexhandschuhen gearbeitet.

Bezüglich der beschriebenen Methoden verweisen wir auch auf die bereits veröffentlichte Arbeit von Dr. med. Martin F. Wurster [167].

### 2.2.1. Patientinnen

Es wurden insgesamt Tumorproben von 127 Patientinnen in die Studie einbezogen, von denen letztendlich 69 Proben ausgewertet werden konnten. Proben von 58 Patientinnen konnten nicht in die Auswertung aufgenommen werden, da entweder die Gewebeprobe vom Objektträger abgeschwommen

war oder anstatt dem Tumorgewebe Fett- und Bindegewebe ausgestanzt wurden. Die Zeitpunkte für die Stanzbiopsien und Probeentnahmen der Primärtumore lagen zwischen den Jahren 1999 und 2003 und wurden jeweils in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen durchgeführt.

#### 2.2.1.1. Chemotherapie-Schemata und Operation der Mammakarzinome

Die Patientinnen erhielten nach der Stanzbiopsie entweder eine neoadjuvante Therapie basierend auf vier bis sechs Zyklen entweder mit Anthrazyklinen (Anzahl [n] = 17) oder Taxanen (n = 30) in einem 21-Tage-Intervall oder eine tägliche endokrine neoadjuvante Therapie mit Letrozol oder Exemestan (n = 22) über sechs Monate. Die operative Tumorentfernung erfolgte ca. einen Monat nach Beendigung des letzten Chemotherapie-Intervalls.

#### 2.2.1.2. Therapieansprechen

Das Therapieansprechen wurde über histopathologische Schnitte der entnommen Tumore im Pathologischen Institut der Universität Tübingen beurteilt. Hierbei wurden die regressiven Veränderungen im Tumor unter Zuhilfenahme eines semiquantitativen Bewertungssystems von null bis vier (0 = kein Effekt, 1 = Resorption und Tumorsklerose, 2 = minimal vorhandener invasiver Resttumor [ $< 0,5$  Zentimeter], 3 = nur nicht-invasiver Tumor, 4 = kein Tumor mehr nachweisbar) nach dem von *Sinn et al. [168]* beschriebenen Tumor-Regressions-Grading bewertet und die Proben anhand dieser Bewertung in zwei Gruppen einsortiert (siehe Graphik 2).

### 2.2.2. Herstellung der Gewebeschnitte

#### 2.2.2.1. Gewebegewinnung

Zuerst wurde den Patientinnen vor dem Beginn der präoperativen Therapie wird Tumorgewebe durch eine Stanzbiopsie unter sonographischer Kontrolle entnommen. Das so gewonnene Gewebe wird in Formalin fixiert, in Paraffin-Blöcke eingebettet und anschließend histopathologisch begutachtet. Mit Hilfe des histopathologisch erhobenen Befundes wird die für die Patientin geeignete präoperative Therapie ausgewählt. Nach Ende der neoadjuvanten Therapie

wird bei Patientinnen, die unter dieser Therapie keine Komplettremission gezeigt haben, der Primärtumor chirurgisch reseziert. Wie zuvor auch schon die Proben der Stanzbiopsie, wird nun auch das Tumorsektat in Formalin fixiert, in Paraffin-Blöcke eingebettet und erneut histopathologisch begutachtet. Um die eindeutige Zuordnung zwischen Patientin und dem entnommenen Gewebe sicherzustellen, werden alle untersuchten Gewebeproben komplett erfasst und mit einer einzigartigen Identifikationsnummer versehen, die eine genaue Zuordnung gewährleistet. Diese Identifikationsnummer wird aus folgenden Teilen zusammengesetzt: der Buchstabe „K“ steht für „Klinikum“, es folgen das Entnahmejahr der Probe sowie eine fortlaufende Nummer (z.B.: K-2002-23790). So war es möglich, die Patientinnen bzw. deren Proben anonymisiert in diese Studie aufzunehmen.

#### 2.2.2.2. Tissue Microarrays

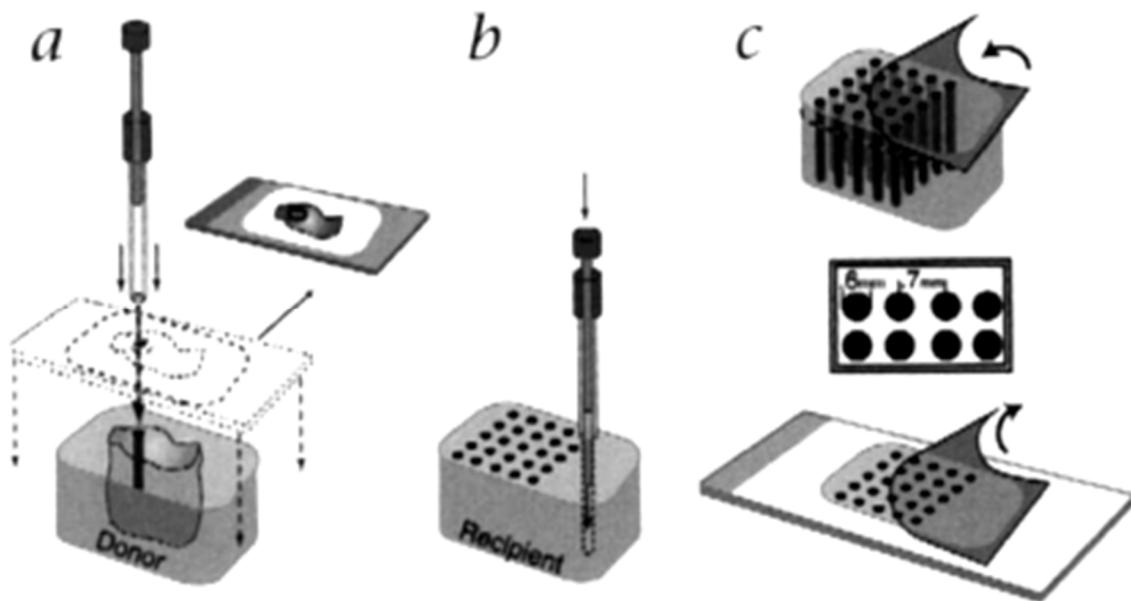
Seit der Entwicklung der Tissue Microarray (TMA)-Technik ist eine schnelle Sichtbarmachung von Zielstrukturen im molekularen Bereich an tausenden verschiedener Gewebearten zur gleichen Zeit nicht nur auf Protein-, sondern auch auf DNA- und RNA-Niveau möglich [169, 170]. Als besonders vorteilhaft ist hierbei u.a. die Möglichkeit Untersuchungen an großen Kollektiven, das heißt (d.h.) die gleichzeitige Einbringung von bis zu mehreren Hundert Tumorproben in einen Paraffinblock, durchzuführen [171-173].

##### 2.2.2.2.1. Herstellung der Tissue Microarrays

Nach der meist in 4%-Formalin-gepufferten Fixation des zu untersuchenden Gewebes werden als Donor-, d.h. Spenderblöcke diejenigen ausgewählt, bei denen besonders viel Tumorgewebe und möglichst wenig Bindegewebe oder nekrotisches Material zu finden ist [174]. Die zu untersuchenden Gewebeproben werden direkt aus einem Donorblock ausgestanzt und in einen Paraffin-Akzeptorblock eingefügt. Zur Herstellung eines Akzeptorblocks werden in einen leeren Paraffinblock (1,5x3 Quadratzentimeter) mit einer Ständerbohrmaschine Löcher gebohrt, in welche die Gewebestänze eingefügt werden müssen. Der Paraffinblock sollte, um den optimalen Sitz der Stanze



sicherzustellen, nur durch einen X/Y-Koordinatentisch bewegt werden, siehe hierzu Abb. 3.

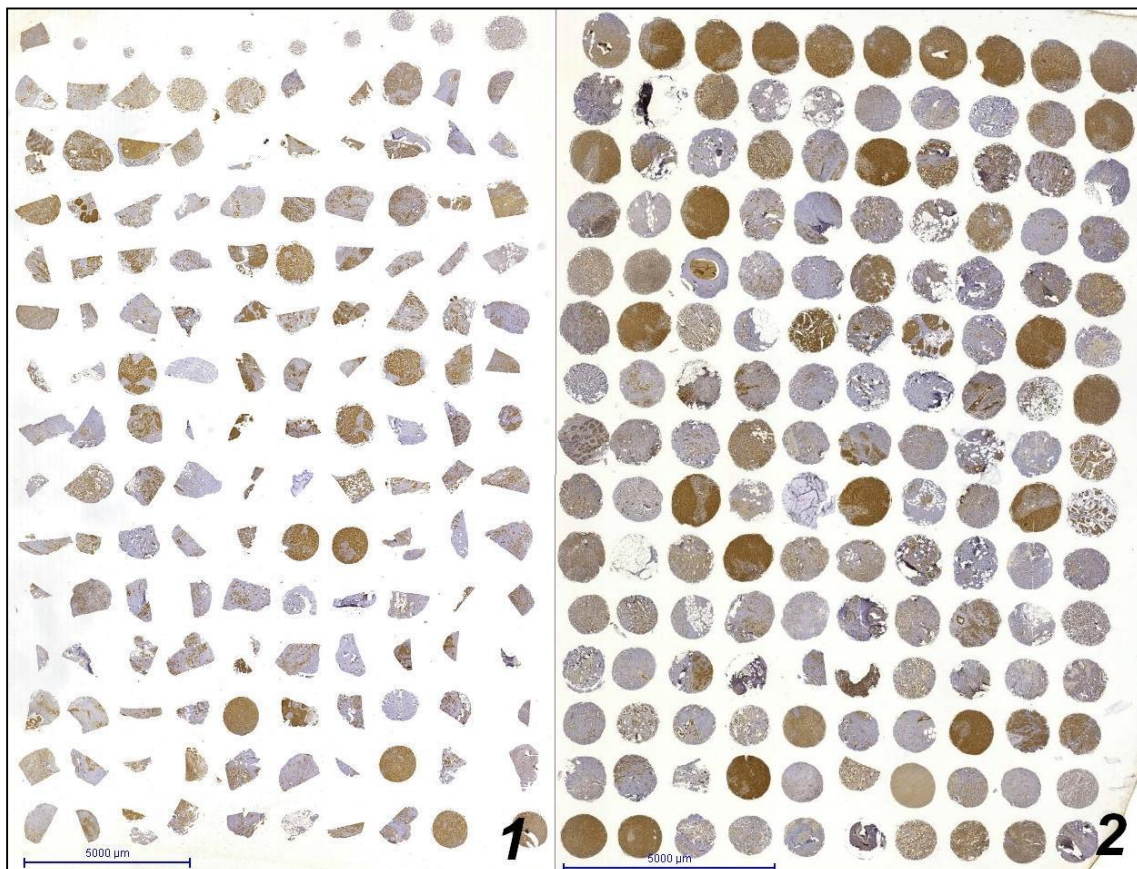


**Abb. 3:** Herstellung eines Tissue Microarray (Quelle [175])

- a** Kleine Tumorgewebestücke werden aus den ausgewählten Regionen des Donorblocks von einem mit einer dünnen rostfreien Nadel ausgestatteten Bohrinstrument gewonnen.
- b** Diese Gewebestücke werden in die dafür vorgesehenen Löcher im Empfänger-Paraffinblock eingebracht.
- c** Selbstklebende Folie wird auf den angeschnittenen Block aufgeklebt, jeder dann mit einem Mikrotom angefertigte Schnitt hat dann eine Dicke von 3-5µm und kann samt der Folie auf einen Objektträger aufgebracht werden.

Zur Auswahl eines geeigneten Gewebeareals für eine solche Gewebeprobe wird in einem Hämatoxylin/Eosin-Färbungs-(HE)-Schnitt das Tumorgewebe mikroskopisch untersucht. Wenn die optimale Stelle gefunden ist, wird der HE-Schnitt über den Tumorblock gelegt, um sicherzustellen, auch dort die entsprechende Stelle zu finden. An dieser Stelle wird mittels der Stanzen ein Gewebezylinder manuell entnommen und in das für die Probe vorgesehene Loch des Paraffin-Akzeptorblocks eingefügt. Aus den so entstandenen TMAs werden durch ein Mikrotom vier µm dicke Schnitte erzeugt. Die Schnitte müssen in einem warmen Wasserbad geglättet, anschließend auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und getrocknet werden. Zur Vermeidung von Verwechslungen werden die Tumornummern in Listen gesammelt, in denen die genaue Position des Gewebes auf dem TMA vermerkt ist. Als Landmarken zur

Orientierung werden am Anfang des Arrays zwei und am Ende zehn Positionen mit Leberzirrhose bestückt (entsprechend Position 1-1 bis 1-2 und Position 15-1 bis 15-10). Für dieses Projekt werden insgesamt zwei TMAs hergestellt, von diesen jeder 150 einzelne Positionen hat, in die Tumorgewebe eingebracht werden kann. Der eine TMA, Multiblock (MB) 191 enthält Tumorgewebe aus Stanzbiopsien, die vor Beginn der präoperativen Therapie entnommen worden sind. Der andere TMA (MB192) enthält Gewebeproben der operativ entfernten Primärtumore, auf welche bereits die neoadjuvante Therapie einwirken konnte. Jeder einzelne dieser zwei TMAs beinhaltet Gewebeproben sämtlicher in die Studie aufgenommenener Patientinnen, wobei in die einzelnen TMAs Gewebeproben unterschiedlicher Tumorareale eingefügt wurden (siehe Abb. 4).



**Abb. 4:** *Verwendete Tissue Microarray/Multiblocke*

**1** Multiblock 191 vor neoadjuvanter Therapie; **2** Multiblock 192 nach neoadjuvanter Therapie; 1 und 2 wurden mit Zytokeratin 18 in einer Verdünnung von 1:1000 immunhistochemisch gefärbt; alle Gewebeprobe wurde in 4,5% gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet; Vergrößerung 1x10, Abkürzungen: µm = Mikrometer

### 2.2.3. Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Vor den eigentlichen immunhistochemischen Färbungen werden orientierende Färbungen mit Hämatoxylin (Mayer's) und Eosin durchgeführt. Zuerst müssen hierfür die TMA von Paraffin befreit und anschließend rehydriert werden, was eine Behandlung mit Xylol als auch das Eintauchen der Schnitte in unterschiedliche Ethanollösungen und Aqua destillata erfordert. Anschließend werden die TMA in Hämatoxylin vorsichtig auf und ab bewegt, in herkömmlichem Leitungswasser gebläut und erneut in Aqua destillata und Ethanol getaucht. Im Anschluss daran werden die TMA vorsichtig in Eosin auf und ab bewegt und erneut mehrmals in Ethanol in unterschiedlichen Verdünnungen gebadet. Abschließend werden die TMA in Xylol dehydriert und mit Pertex® wasserfrei eingedeckt, sodass eine lichtmikroskopische Beurteilung erfolgen kann.

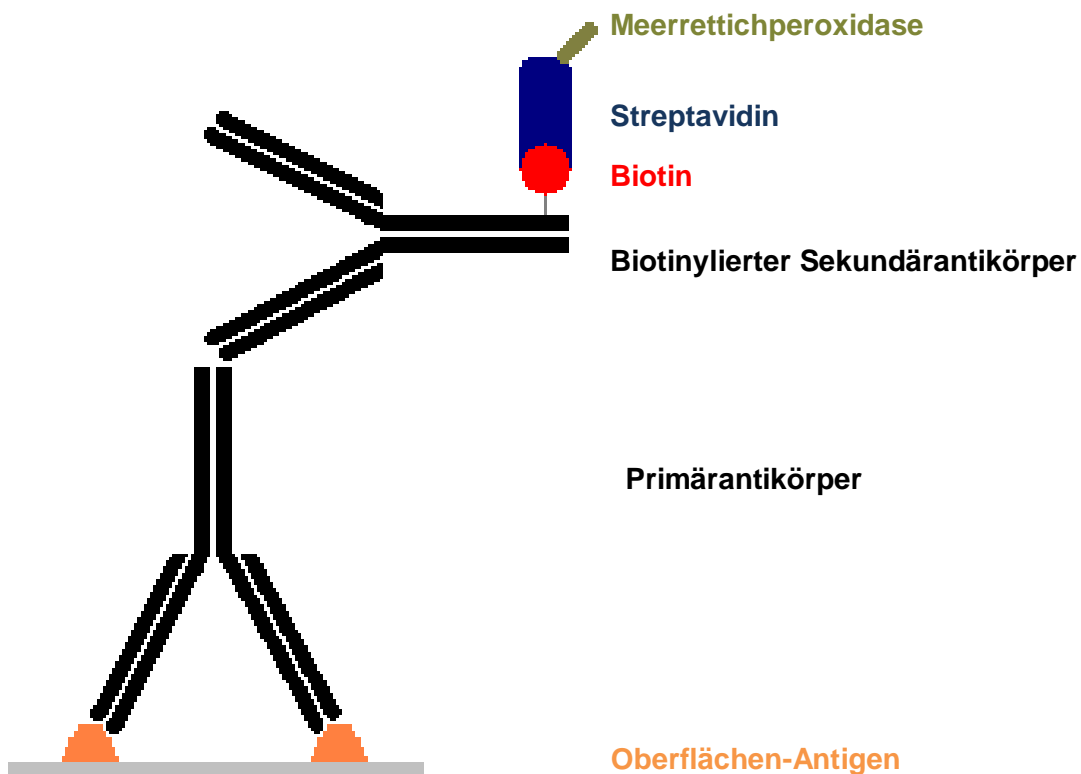
### 2.2.4. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) wird sowohl in der Medizin als auch in der Biologie verwendet, um neben unterschiedlichen Zelltypen [176] auch Zellstrukturen bzw. Oberflächenproteine oder -saccharide oder eben auch Hormonrezeptoren unter Zuhilfenahme von markierten AK unter dem Mikroskop zu identifizieren und sichtbar zu machen [177, 178]. Somit ist bei Tumoren eine Charakterisierung möglich, welche nur durch die reine Lichtmikroskopie nicht möglich wäre [179]. Dabei handelt es sich meist um in Paraffin eingebettete oder schockgefrostete Gewebeproben [178]. Beim Prinzip immunhistochemischer Färbungen macht man sich die Antikörpereigenschaft zu eigen, dass sie mit ihrer Antigenbindungsstelle spezifisch sogenannte Epitope erkennen und an diese binden können [178]. Diese spezifische Antikörper-Antigenbindung ermöglicht die optisch sichtbare Darstellung von Peptid- und Proteinstrukturen in Zellen und Zellkompartimenten.

#### 2.2.4.1. Verwendete Methode

Im Rahmen dieser Arbeit kommt die sogenannte indirekte „Sandwich“- Methode zum Einsatz. Es wird dabei ein Primärantikörper eingesetzt, der spezifisch an

Proteinstrukturen bindet. Jedoch wird darauffolgend ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt, der an den Primärantikörper bindet. In einem weiteren Schritt wird eine Meerrettichperoxidase (HRP) hinzugegeben, an welche ein Streptavidinmolekül gebunden ist. Streptavidin bildet mit Biotin einen Komplex, wodurch die HRP in der Lage ist, an den Sekundärantikörper zu binden (siehe dazu auch Abb.5). Zuletzt wird ein Chromogen, in diesem Falle 3,3'-Diaminobenzidin, hinzugegeben, das wiederum von HRP oxidiert und dadurch sichtbar gemacht wird. Durch diese Methode bildet sich am Ort der Primärantikörperbindung in der Zelle indirekt ein lichtmikroskopisch sichtbarer Farbniederschlag.



**Abb. 5:** Prinzip der indirekten Immunhistochemie

#### 2.2.4.2. Vorbereitung der Schnitte für die Immunhistochemie

Die Schnitte werden mehrfach in Xylol gestellt. Im Anschluss daran werden die TMA in absteigende Ethanol-Konzentrationen und Ampuwa® gestellt.

Die Antigendemaskierung erfolgt durch Kochen der TMA in einem 1:10 verdünnten Citratpuffer mit pH 6,0 und 900ml Aqua destillata. Anschließend folgt zwei Mal ein Bad in einer 0,05M-Tris/0,15M-NaCl-Lösung. Abschließend werden die Schnitte mit einem DAKO-Pen® lückenlos umrandet und einmal mit 0,1M TRIS/0,05%-Tween-Waschpuffer gewaschen.

#### 2.2.4.3. Eigentliche Immunfärbung

Als Waschpuffer wird in den folgenden Schritten Tris-0,1M/Tween-0,05% verwendet. Dies ermöglicht die gleichmäßige Verteilung der eingesetzten Lösungen und Substanzen auf dem Objektträger.

#### Inaktivierung der endogenen Peroxidase

Da die gewebeeigene endogene Peroxidase ebenfalls in der Lage ist, die in der IHC eingesetzten Farb- und Färbestoffe zu oxidieren und so unspezifische Färbungen zu erzeugen, muss diese vor Färbebeginn inaktiviert werden. Dies erfolgt durch das Auftragen von 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anschließend werden die TMA erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Die nun in folgenden beschriebenen Schritten verwendeten Reagenzien entstammen dem CytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spektrum, welches einen Proteinblock, den biotinylierten Sekundärantikörper und den Streptavidin-HRP-Komplex enthält.

#### Proteinblock

Vor dem Aufbringen der Primärantikörper muss zuerst ein Proteinblock aufgetragen werden, in diesem Fall Blocking Solution – SuperBlock, welcher nach einer Einwirkzeit von 5 Min. wieder abgesaugt wird. Die Proteine des Proteinblocks binden selbst an die hydrophoben Bindungsstellen des Gewebes und verhindern so eine unspezifische Anlagerung der AK.

#### Primärantikörper

Für die Primärantikörper müssen bereits vorab die idealen Verdünnungsstufen, Inkubationszeiten und die Inkubationstemperatur ermittelt werden. Die

Immunglobuline wurden in Antibody Diluent (AB) auf die gewünschte Konzentration verdünnt (siehe Tab.5).

#### Biotinylierter Sekundärantikörper

Das verwendete ZytoChem-Plus HRP Kit enthält eine AK-Mischung, die in der Lage ist, an den eingesetzten Primärantikörper zu binden. Wie der Name schon verrät, ist der Sekundärantikörper mit Biotin konjugiert, welches für den Streptavidin-HRP-Komplex als Bindungsstelle verwendet wird. Nach dem Auftragen muss der TMA mehrmals mit Waschpuffer behandelt werden.

#### Streptavidin-HRP-Komplex

Die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin wird hierbei ausgenutzt, um die HRP (Meerrettichperoxidase) an den sekundären AK binden zu können. HRP besitzt als aktives Zentrum eine eisenhaltige Hämgruppe, die es ihm ermöglicht, unterschiedliche Substanzen, wie z.B. Polyphenole und Nitrate, zu oxidieren. Nach Aufbringen des Streptavidin-HRP-Komplexes auf den TMA verbindet sich der Komplex mit dem Biotin des Sekundär-Immunglobulins. Danach müssen die Schnitte viermal gewaschen werden.

#### 3,3'-Diaminobenzidin

Der letzte Schritt des Färbeprotokolls bildet die eigentliche sichtbare Färbung. Das DAB ist für die HRP ein Elektronenspender und wird daher oxidiert. Das Reaktionsprodukt selbst ist ein dunkel bräunlicher, in organischen Lösungsmitteln nicht löslicher Farbstoff. Die eigentliche Farbreaktion wird mit dem Waschpuffer abgestoppt, man sollte dabei die Einwirkzeit von DAB von 5 Min. nicht überschreiten, da es sonst zu einer verstärkten und unspezifischen Hintergrundfärbung kommen kann, was die spätere Auswertung erschwert.

#### Kontroll-Färbungen

Bei jeder der vorgenommenen Färbungen werden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle angefertigt. Als Positivkontrolle für die Färbungen dient die Gewebeprobe eines Mammakarzinoms, das sicher positiv für die zu

untersuchenden Marker ist und welches mit CK 18 angefärbt wird. Als Negativkontrolle fungiert ebenfalls ein Schnitt des als Positivkontrolle verwendeten Mammakarzinoms. Jedoch wird dieser nur mit AD und nicht mit dem Primärantikörper inkubiert. Die restlichen Schritte unterscheiden sich nicht vom vorher aufgeführten Färbeprotokoll.

#### Gegenfärbung und abschließende Behandlung

Die Immunfärbungen werden mit einer „Gegenfärbung“ versehen, um den vorhandenen Kontrast zwischen angefärbten und nichtgefärbten Arealen zu erhöhen. In dieser Arbeit wurde Papanicolaous Lösung 1a (Harris' Hämatoxylin) verwendet, welches Zellkerne und Bindegewebe in einem kräftigen Blauton einfärbt. Zum Abschluss werden die TMA 60 Sek. in Xylol getaucht, die Objektträger wasserfrei mit Pertex® und einem Deckglas abgedeckt.

#### 2.2.5. Auswertung der TMA-Färbungen

Die Ergebnisse werden in die für jeden einzelnen TMA separat geführte und anonymisierte Liste eingetragen. Wichtig für die Auswertung ist zu bemerken, dass die Tumore auf den TMA nicht nach Therapieschema, sondern nach Probeneingang sortiert worden sind. Dies schließt aus, dass der Auswertende direkte Rückschlüsse auf den Therapiearm ziehen kann. Alle Tumorpräparate werden digitalmikroskopisch erfasst und gespeichert.

##### 2.2.5.1. Bewertung der Tumore

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden in enger Zusammenarbeit und unter Supervision mit und von Dr. med. U. Vogel vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen mittels Score-Systemen semiquantitativ ausgewertet, wie nun folgend beschrieben.

##### 2.2.5.2. Entwicklung und Berechnung eines immunreaktiven Scores

Zur Beurteilung und Vergleichbarkeit der Färbungen wurde ein immunreaktiver Score (IRS) nach *Remmele und Stegner* [180] erstellt. Entsprechend diesem

IRS werden die Tumore von 0 bis 12 bewertet. Ein solcher Score setzt sich aus dem Prozentsatz positiv angefärbter Zielzellen (PP) sowie der vorherrschenden Färbeintensität (*staining intensity* [SI]) zusammen, dem jeweils ein Wert zwischen 0 bis 4 zugeordnet wird. Die numerischen Werte von PP und SI werden multipliziert und ergeben somit einen Score, der Werte von 0 bis 12 annehmen kann. Dabei gilt es, folgendes in Tab. 6 aufgeführtes Schema zu beachten.

**Tab. 6:** Berechnung des immunreaktiven Scores

Prozentsatz positiver Zielzellen	PP	vorherrschende Färbeintensität	SI	Immunreaktiver Score	IRS = PP x SI
0%	0	negativ	0	negativ	0
<10%	1	schwach	1	schwach positiv	1-3
10-50%	2	mäßig	2	mäßig positiv	4-7
51-80%	3	stark	3	stark positiv	8-12
>80%	4	-	-	-	-

Abkürzungen: % = prozentualer Anteil positiv angefärbter Zielzellen, < = kleiner als, > = größer als, x = Multiplikation, IRS = immunreaktiver Score, PP = positive Zielzellen, SI = staining intensity (vorherrschende Färbeintensität)

#### 2.2.6. IRS der Hormonrezeptoren und Ki-67

Um den IRS von PGRMC1 und pPGRMC1 auch mit anderen tumorspezifischen Markern, in diesem Falle Hormonrezeptoren wie ER $\alpha$ , Gesamt-ER $\beta$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2, PR, HER2/neu und Antigen Ki-67, in Beziehung setzen zu können, griffen wir, nach Versicherung seines Einverständnisses, auf die bereits vorhandenen Ergebnisse der IRS-Färbungen von Dr. med. Martin F. Wurster [181] zurück, welcher an den gleichen TMA Färbungen mit AK gegen ER $\alpha$ , Gesamt-ER $\beta$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2, PR, HER2/neu und Antigen Ki-67 durchgeführt hatte. Zu den einzelnen IRS-Werten siehe hierzu Tab. 11-14 im Anhang.

#### 2.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 20.0 für Windows SPSS (Inc, Chicago, IL, III, USA). Die Daten waren nicht normalverteilt, so dass die Werte jeweils als Median mit Minimum und Maximum angegeben werden. Für die



statistischen Analysen wurden der Mann-Whitney-U-Test, der Wilcoxon-, der Vorzeichen- und der Friedman-Test angewendet. Bei Berechnungen von Korrelationen wurde zusätzlich der Korrelationskoeffizient Spearman rho ( $r_s$ ) angegeben. P-Werte mit einem  $\alpha$ -Level  $<0,05$  wurden als signifikant angesehen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Studiendesgin

In diese Studie wurden ausschließlich Patientinnen mit einem Mammakarzinom aufgenommen, die eine systemische und neoadjuvante Therapie erhalten hatten. Es wurde jeweils vor als auch nach der neoadjuvanten Therapie Proben des Tumorgewebes entnommen, diese Proben in Paraffin eingebettet und schließlich als TMA aufgearbeitet. Diese TMA wurden zur Entwicklung der IRS von PGRMC1 und der phosphorylierten Form (pPGRMC1) sowie der möglichen Änderung der Expressivität nach erfolgter neoadjuvanter Therapie genutzt. Da es sich um eine Pilot-Studie handelte, wurde keine Fallschätzung vorgenommen.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen immunpathologischen Färbungen zum Nachweis von pPGRMC1 und PGMRC1 wurden an Tumorproben vorgenommen, von denen analoge Schnitte zur Markierung mit anderen Antikörpern verwendet worden waren. Die Ergebnisse daraus – nicht die Resultate für PGRMC1 und pPGRMC1, jedoch die klinischen und histopathologischen Daten wurden bereits veröffentlicht [181].

### 3.2. Klinische Daten der Patientinnen

#### 3.2.1. Altersverteilung

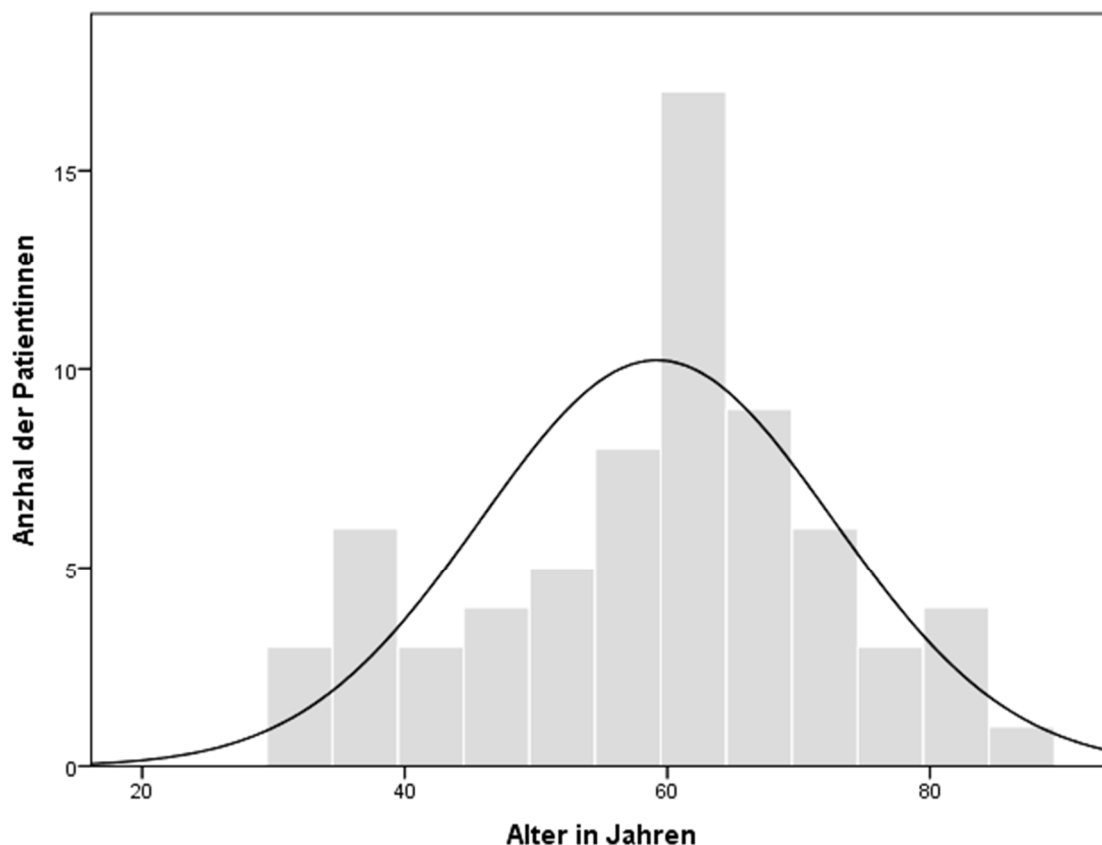
Die Altersverteilung in der Gesamtkohorte war nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test,  $p = 0,444$ ), siehe Graphik 1. Der Altersmedian zum Zeitpunkt der ersten Operation bzw. Tumorgewebeentnahme betrug 59,20 Jahre, wobei die jüngste Patientin zum Zeitpunkt der ersten Probeentnahme 32 Jahre und die älteste 85 Jahre alt waren.

Anhand des Alters bei der ersten Gewebeentnahme wurden die Patientinnen in vier Gruppen einsortiert, siehe hierzu Tab. 6. Die dabei zu Grunde liegende Überlegung waren die unterschiedlichen Hormonkonzentrationen vor, während und nach der Menopause [182], die einen Unterschied oder gar direkten Einfluss auf die Rezeptorexpression von PGRMC1 darstellen könnten.

**Tab. 7: Altersgruppen**

Altersgruppe	Durchschnittsalter	n (%)
Gr.1	37,50 (32 bis 49 Jahre)	16 (23,2)
Gr.2	56,00 (50 bis 59 Jahre)	13 (18,8)
Gr.3	64,00 (60 bis 69 Jahre)	26 (37,7)
Gr.4	77,00 (70 bis 85 Jahre)	14 (20,3)

Abkürzungen: Gr. = Gruppe, n = Anzahl, %= prozentualer Anteil an der Gesamtgruppe  
 Die Gesamtgruppengröße beträgt 69. Die Werte der einzelnen Altersgruppen sind als Median mit Minimum und Maximum angegeben



**Graphik 1: Altersverteilung der Patientengruppe**

### 3.2.2. Klinisch-histologische Daten der Patientinnen

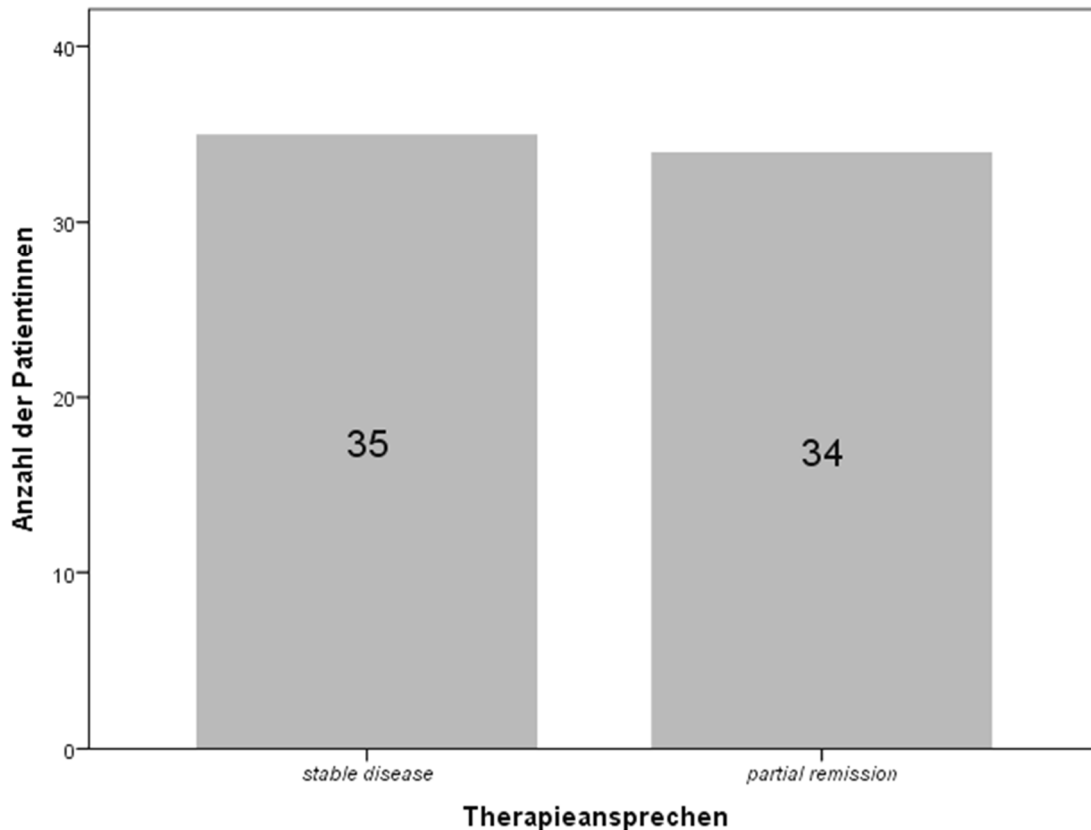
Die klinischen und histopathologischen Daten der Patientinnen und Mammakarzinomgewebe auf Basis der AGO-Leitlinien [161] werden in Tab. 8 dargestellt, siehe hierzu auch die Veröffentlichung von *Wurster et al.* aus dem

Jahr 2010 [181]. Die Einteilung des Tumorgrading richtet sich nach der offiziellen Einteilung nach *Hunt et. al.* [183].

**Tab. 8:** *Klinische und histopathologische Daten*

<b>Menopausaler Status</b>	<b>n (%)</b>
prämenopausal (M1)	12 (17,4)
perimenopausal (M2)	8 (11,6)
postmenopausal (M3)	49 (71,0)
<b>Histopathologischer Befund</b>	<b>n (%)</b>
duktal (H1)	45 (65,2)
lobulär (H2)	14 (20,3)
duktulo-lobulär (H3)	8 (11,6)
muzinös (H4)	2 (2,9)
<b>Grading (nach <i>Hunt et al.</i>)</b>	<b>n (%)</b>
gut differenziert (G1)	2 (2,9)
mäßig differenziert (G2)	47 (68,1)
schlecht differenziert (G3)	20 (29,0)

Abkürzungen: , % = prozentualer Anteil an der Gesamtgruppe, G1 = gut differenzierter Tumor, G2 = mäßig differenzierter Tumor, G3 = schlecht differenzierter Tumor, H1= invasiv duktales Karzinom, H2 = invasiv lobuläres Karzinom, H3 = invasiv duktolobuläres Karzinom, H4 = muzinöses Karzinom, M1 = prämenopausaler Status, M2 = perimenopausaler Status, M3 = postmenopausaler Status, n = Anzahl der Proben  
Größe der Gesamtgruppe n = 69

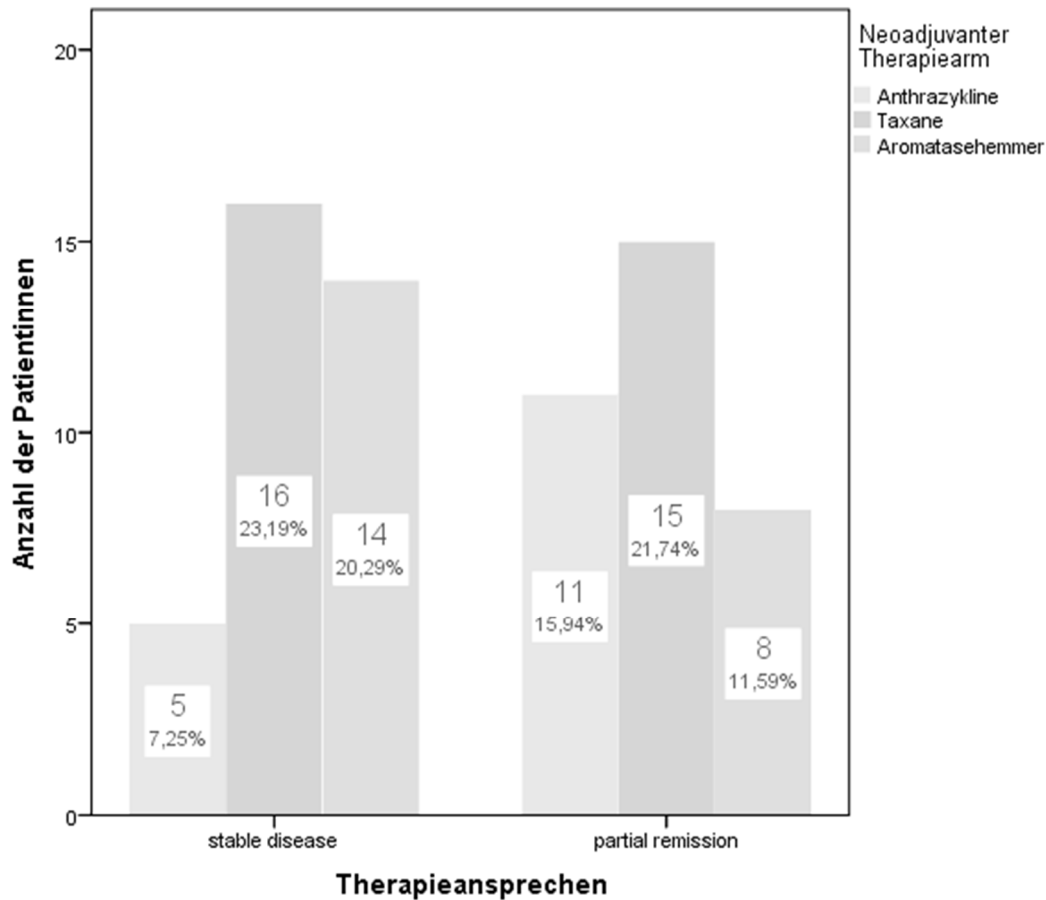


**Graphik 2:** Therapieansprechen der Gesamtkohorte

### 3.2.3. Therapieansprechen

Das Therapieansprechen der Gesamtkohorte unabhängig vom Therapiearm ist in Graphik 2 dargestellt (vergleiche hierzu auch *Wurster et al. [181]*).

Betrachtet man das Therapieansprechen in den einzelnen neoadjuvanten Therapiearmen, so fällt auf, dass es zwar auf den ersten Blick einen Unterschied zu geben scheint, in welchem Therapiearm sich die Patientin bezüglich eines Ansprechens befand (siehe Graphik 3 und vergleiche *Wurster et al. [181]*), jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Chi<sup>2</sup>-Test: Anthrazykline versus Taxane  $p = 0,226$ , Taxane versus Aromataseinhibitoren  $p = 0,415$ ; Anthrazykline versus Aromataseinhibitoren  $p = 0,099$ ).



**Graphik 3:** Therapieansprechen in den unterschiedlichen Therapiearmen

### 3.3. Auswertung des Hormonrezeptor-Status nach Altersgruppen

Die bereits von Dr. med. Martin K. F. Wurster ausgewerteten TMA-Schnitte und die daraus gewonnenen IRS-Werte wurden nochmals neu und nach oben beschriebenen Altersgruppen ausgewertet (siehe Tab. 7).

Hierbei ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Rezeptorexpression von ER $\alpha$  in der Gruppe der 32 bis 49-Jährigen im Vergleich zu den Gruppen der 60 bis 69- und der 70 bis 85-Jährigen ( $p = 0,02$  und  $p < 0,001$ ) und zumindest ein Trend im Vergleich der Gruppe der 50 bis 59-Jährigen zu der Gruppe der 70 bis 85-Jährigen ( $p = 0,067$ ). Mit zunehmendem Alter zeigte sich eine Zunahme der ER $\alpha$ -Expression in der hier untersuchten Probandengruppe.

Im Vergleich des Median-IRS von ER $\beta$ 1 in der Gruppe der über 70- Jährigen zu dem der 50 bis 59-Jährigen ( $p = 0,045$ ) und zu dem der 60 bis 69-Jährigen ( $p = 0,014$ ) zeigte sich, dass der IRS in der ältesten Gruppe jeweils höher ausfiel.

Die Expressionsintensität von PR war in der jüngsten Altersgruppe (Gr.1) am geringsten und zeigte hierbei einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Gruppe der 60 bis 69-Jährigen ( $p = 0,021$ ).

Die IRS von ER $\beta$ t, ER $\beta$ 2, HER2/neu und Ki-67 zeigten jeweils keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Altersgruppen.

### 3.4. Auswahl der Antikörper zum Nachweis von PGRMC1 und pPGRMC1

Für unsere Fragestellung verwendeten wir AK, die von der ProteoSys AG in Mainz hergestellt und uns für die Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden.

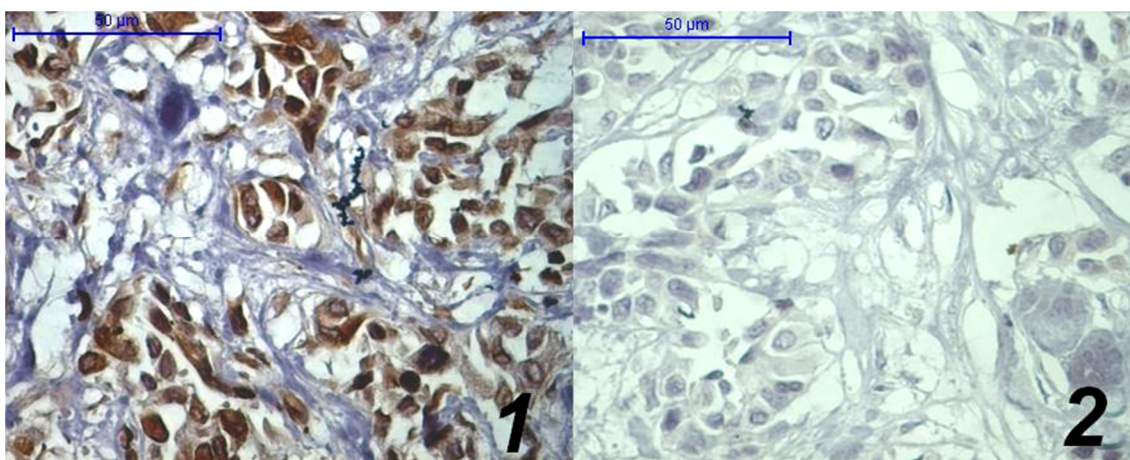
Aus einer Auswahl von zehn AK wählten wir nach Testung auf einem Kontroll-Mammakarzinom-Paraffinschnitt die zwei AK aus, die das stärkste und am besten reproduzierbare Signal in der IHC zeigten, ohne dabei eine zu starke unspezifische Hintergrundfärbung zu erzeugen.

Qualität und Spezifität dieser AK wurden anhand der IHC nach ausführlicher Titrierung der beiden verschiedenen AK nachgewiesen. Die Konzentration, welche reproduzierbare Ergebnisse und das beste Signal-Rausch-Verhältnis ergab, wurde für weitere Untersuchungen gewählt (siehe Tab. 5). Die Reaktionen wurden in einer befeuchteten Kammer durchgeführt. Gegenfärbungen wurden jeweils mit Papanicolaous Lösung 1a (Harris' Hämatoxylin) für 30 Sek. durchgeführt. Für jeden getesteten AK sowie für jeden verwendeten und neuen TMA wurde jeweils eine positive Gewebeprobe als Positiv-Kontrolle verwendet, zudem wurde der zu betrachtende und als interessant eingestufte Gewebebereich jeweils mit CK 18 angefärbt. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Abschnitt, jedoch ohne Aufbringung der primären AK, sondern nur mit AD inkubiert und anschließend nach Protokoll gefärbt.

## 3.5. Validierung der Spezifität der Antikörperreaktion

### 3.5.1. „Peptid-Blocking“ von PGRMC1

Um die Spezifität des von uns verwendeten AK gegen PGRMC1 nachzuweisen, wurde dieser in einem zweiten Schritt mit einem spezifischen Peptid-Block behandelt. In zehnfacher Verdünnung wurde der reine AK mit dem von der ProteoSys AG freundlicherweise zur Verfügung gestellten Blocking-Peptid für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte die Anfertigung einer immunhistochemischen Färbung, bei der das AK-Blocking-Peptid-Gemisch als Primärantikörper eingesetzt wurde (siehe Abb. 6).



**Abb. 6:** *Peptid-Blocking von PGRMC1*

**1** konventionelle Immunhistochemie mit Antikörper gegen PGRMC1 in einer Verdünnung 1:5 eingesetzt; **2** immunhistochemische Färbung nach Immunabsorption des primären Antikörpers gegen PGRMC1 durch Blocking-Peptid; bei den Gewebeproben in 1 und 2 handelt es sich um nicht direkt aufeinander folgende Bereiche desselben PGRMC1-positiven Mammakarzinoms; alle Gewebeproben wurde in 4,5% gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet; Vergrößerung 1:40

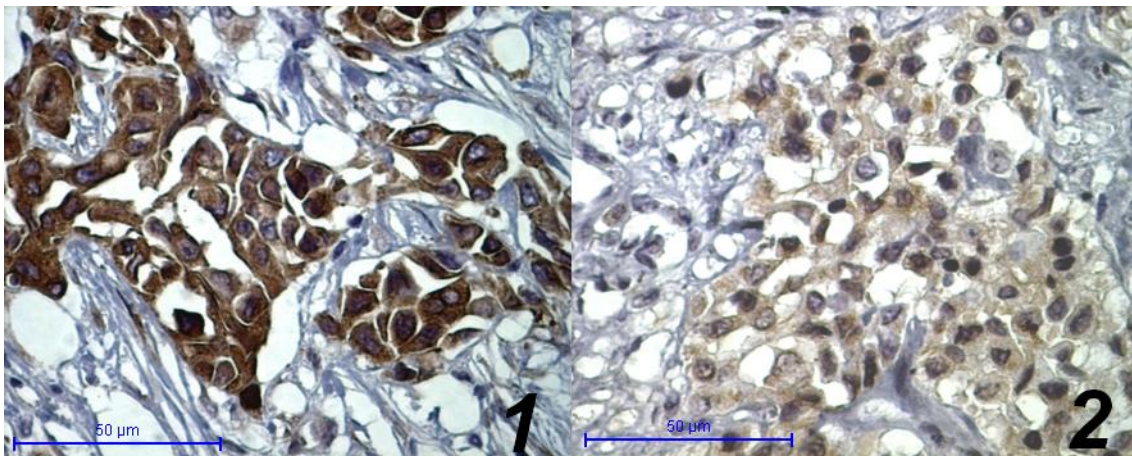
Abkürzungen: PGRMC1 = Progesteronrezeptor-Membran Komponente 1, µm = Mikrometer

### 3.5.2. Phosphatase-Behandlung vor pPGRMC1-Detektion

In bereits veröffentlichten Daten dieser Arbeitsgruppe durch Arbeiten an mit Phosphatase-behandelte Proteinlysaten ergaben sich Hinweise drauf, dass PGRMC1 auch in phosphorylierter Form vorliegt [184]. In Western blot Untersuchungen konnten zwei Banden unter Verwendung eines hergestellten S180-phospho-spezifischen monoklonalen AK (in unserer Arbeit 3G11A2 genannt) detektiert werden und beide Banden verschwanden bei Behandlung der Proteinlysate mit Phosphatase vor Durchführung des Western blot [184]. Es



wurde daher in Zusammenschau der Ergebnisse die Aussage bekräftigt, dass der hierfür hergestellte AK (3G11A2), phosphospezifisch ist. Unter diesen Ergebnissen der Vorarbeiten und dass somit auch in der IHC eine phosphorylierte Form von PGRMC1 sichtbar gemacht werden kann, erfolgte die Vorinkubation der Gewebeschnitte für 20 Min. mit Phosphatase. Im Anschluss daran erfolgte nach Behandlung der Gewebeschnitte mit dem Waschpuffer die Färbung nach vorher ausführlich beschriebenem Protokoll (siehe Abb. 7).



**Abb. 7:** Phosphatase-Behandlung vor pPGRMC1-Detektion

**1** konventionelle immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen pPGRMC1 in einer Verdünnung 1:1000 eingesetzt; **2** immunhistochemische Färbung nach Präinkubation des Gewebes mit Phosphatase; bei den Gewebeproben in 1 und 2 handelt es sich um nicht direkt aufeinander folgende Bereiche desselben pPGRMC1-positiven Mammakarzinoms, alle Gewebeproben wurden in 4,5% gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, Vergrößerung 1:40;

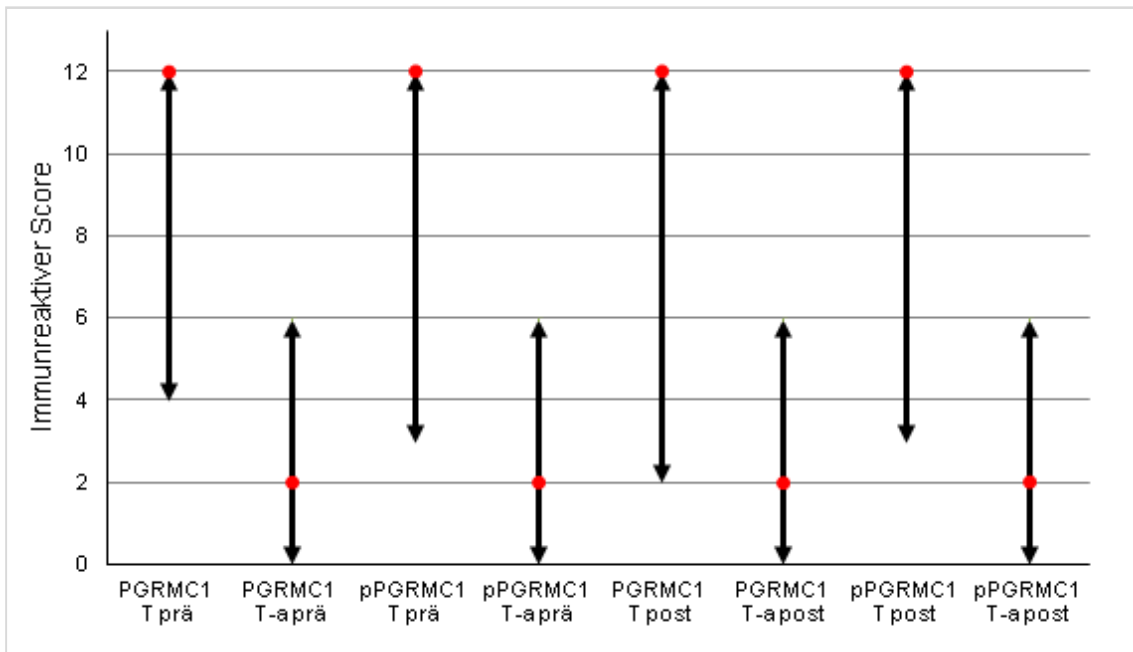
Abkürzung: pPGRMC1 = phospho-S180-Progesteronrezeptor-Membran Komponente 1,  $\mu\text{m}$  = Mikrometer

### 3.6. Expression von PGRMC1

Alle untersuchten und ausgewerteten Tumorproben waren mindestens mäßig positiv für PGRMC1 und erreichten einen IRS-Median von 12,00 (Minimum = 4, Maximum = 12). Die Expressionslokalisierung von PGRMC1 – detektiert mit dem monoklonalen AK 5G7 – konnte sehr nahe am Nucleus und im Zytoplasma der Tumorzellen beobachtet werden (siehe Abb. 8).

### 3.6.1. Expression in umgebendem Bindegewebe

Darüber hinaus fiel eine deutlich schwächere Expression von PGRMC1 im Vergleich zum Tumorgewebe (Vorzeichen-Test  $p > 0,001$ ) im das eigentliche Tumorgewebe umgebenden Bindegewebe auf (IRS-Median = 2,00 [Minimum = 0, Maximum = 6]), siehe hierzu auch Graphik 4.



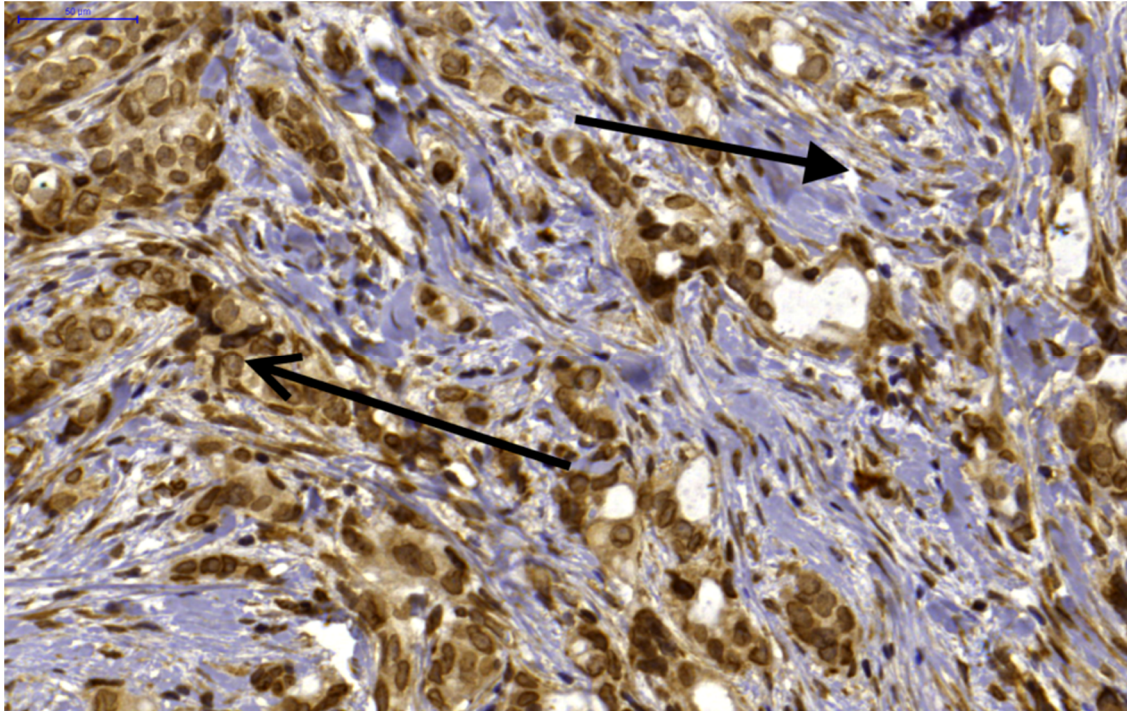
**Graphik 4:** Übersicht über die Werte des Immunreaktiven Scores für PGRMC1 und pPGRMC1

Dargestellt sind jeweils der Median des Immunreaktiven Score (roter Punkt) sowie mit Pfeilspitzen gekennzeichnet, sind der minimale und der maximale Wert, den der immunreaktive Score angenommen hat, abgebildet

Abkürzungen: PGRMC1 = Progesteronrezeptor-Membrankomponente 1, pPGRMC1 = phospho-S180-Progesteronrezeptor-Membrankomponente 1, T = Mammakarzinomgewebe, T-a = den Tumor umgebendes Bindegewebe

### 3.6.2. Zusammenhang mit demographischen und klinischen Parametern

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede oder Korrelationen der Expression von PGRMC1 in Zusammenhang mit dem histopathologischen Befund oder der Menopausenphase, in der sich die Patientinnen zur Gewebeentnahme befanden, festgestellt werden (siehe Tab. 9). Im Weiteren wurde die Gesamtgruppe in die oben genannten vier Alters-Subgruppen aufgeteilt, jedoch zeigten sich auch dort keine Unterschiede der IRS zwischen den einzelnen Altersgruppen.



**Abb. 8:** Lokalisation der Expression von PGRMC1

PGRMC1-positives Mammakarzinom; Gewebeprobe wurde in 4,5% gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, Vergrößerung 1:20; gefüllte Pfeilspitze: Bindegewebe; ungefüllte Pfeilspitze: Nucleus von Mammakarzinom-Zellen  
 Abkürzungen: PGRMC1 = Progesteronrezeptor-Membran Komponente 1,  $\mu\text{m}$  = Mikrometer

### 3.6.3. Koexpression mit Hormonrezeptoren und Ki-67

Es konnte eine signifikante positive Korrelation für die Expression von PGRMC1 mit Koexpression von ER $\beta$ 1 ( $p = 0,005$ ;  $T_s = 0,338$ ) und ER $\beta$ 2 ( $p = 0,016$ ;  $T_s = 0,294$ ) sowie ein Trend mit der Koexpression von dem Gesamt-ER $\beta$  ( $p = 0,058$ ;  $T_s = 0,166$ ) gezeigt werden. Kein Zusammenhang von PGRMC1 konnte in der Koexpression von ER $\alpha$ , PR, HER2/neu oder Ki-67 beobachtet werden.

### 3.6.4. Assoziation mit Hormonrezeptoren und Ki-67, gewichtet nach dem Alter

In der Gruppe der 60 bis 69-Jährigen war die Expression von ER $\alpha$  ( $p = 0,017$ ,  $T_s = 0,465$ ) und ER $\beta$ 1 ( $p = 0,014$ ,  $T_s = 0,475$ ) stärker mit der Koexpression von PGRMC1 verknüpft. In der Gruppe der 50 bis 59-Jährigen zeigte sich eine stärkere Expression von ER $\beta$ t ( $p = 0,006$ ,  $T_s = 0,743$ ) und PR ( $p = 0,015$ ,  $T_s = 0,680$ ) mit der Expression von PGRMC1. Es zeigten sich keine Unterschiede in den anderen Altersgruppen, auch nicht für die Koexpression von PGRMC1 mit HER2/neu und Ki-67.

**Tab. 9:** IRS PGRMC1 nach demographischen und klinischen Merkmalen

Merkmal	IRS PGRMC1	
	Tumor	TA
Gr.1	12,00 (4-12)	4,00 (0-6)
Gr.2	12,00 (4-12)	2,00 (0-6)
Gr.3	10,50 (4-12)	2,00 (0-6)
Gr.4	12,00 (4-12)	4,00 (0-6)
M1	12,00 (4-12)	4,00 (0-6)
M2	12,00 (8-12)	3,00 (2-6)
M3	12,00 (4-12)	2,00 (0-6)
H1	12,00 (4-12)	2,00 (0-6)
H2	12,00 (6-12)	2,00 (0-6)
H3	10,00 (4-12)	2,00 (0-6)
H4	12,00 (12)	4,00 (4)
G1	8,00 (4-12)	2,00 (0-4)
G2	12,00 (4-12)	2,50 (0-6)
G3	8,00 (4-12)	2,00 (0-6)

Abkürzungen: G1 = gut differenzierter Tumor, G2 = mäßig differenzierter Tumor, G3 = schlecht differenzierter Tumor, Gr.1 = Alter von 30 bis 49 Jahren, Gr.2 = Alter von 50 bis 59 Jahren, Gr.3 = Alter von 60 bis 69 Jahren, Gr.4 = Alter über 70 Jahre, H1= invasiv duktales Karzinom, H2 = invasiv lobuläres Karzinom, H3 = invasiv duktolobuläres Karzinom, H4 = muzinöses Karzinom, IRS = immunreaktiver Score, M1 = prämenopausaler Status, M2 = perimenopausaler Status, M3 = postmenopausaler Status, PGRMC1 = Progesteronrezeptor-Membrankomponente 1, TA = den Tumor umgebendes Bindegewebe, Tumor = Mammakarzinom  
 \* Werte sind jeweils als Median mit Minimum und Maximum angegeben.

### 3.6.5. Änderung der Expression nach neoadjuvanter Therapie

Im Weiteren wurden die IRS im eigentlichen Tumorgewebe und dem den Tumor umgebenden Bindegewebe vor und nach der neoadjuvanten Therapie verglichen. Hierbei konnte ein niedrigerer IRS-Median von PGRMC1 nach Therapie im umgebenden Bindegewebe (Wilcoxon-Test  $p > 0,001$ ), jedoch nicht im eigentlichen Tumorgewebe festgestellt werden.

#### 3.6.5.1. Assoziation der Expression mit Hormonrezeptoren und Ki-67

Wir sahen eine Korrelation der Koexpression von PGRMC1 mit dem Gesamt-ER $\beta$  ( $p = 0,012$ ,  $T_s = 0,317$ ), ER $\alpha$  ( $p = 0,001$ ,  $T_s = 0,414$ ) und Ki-67 ( $p > 0,001$ ,

$T_s = 0,572$ ). Dagegen konnte jedoch keine Korrelation gefunden werden, nachdem die Gesamtgruppe in die oben erwähnten vier Altersgruppen aufgeteilt wurde. Darüber hinaus konnte kein Unterschied in den IRS von PGRMC1 in den drei verschiedenen neoadjuvanten Therapiearmen gezeigt werden, wohl aber in der Gruppe mit Teilremission. Dort zeigte sich ein verminderter IRS im Vergleich zu der Gruppe, die eine stabile Erkrankung zeigte ( $p = 0,006$ ,  $T_s = 0,220$ ).

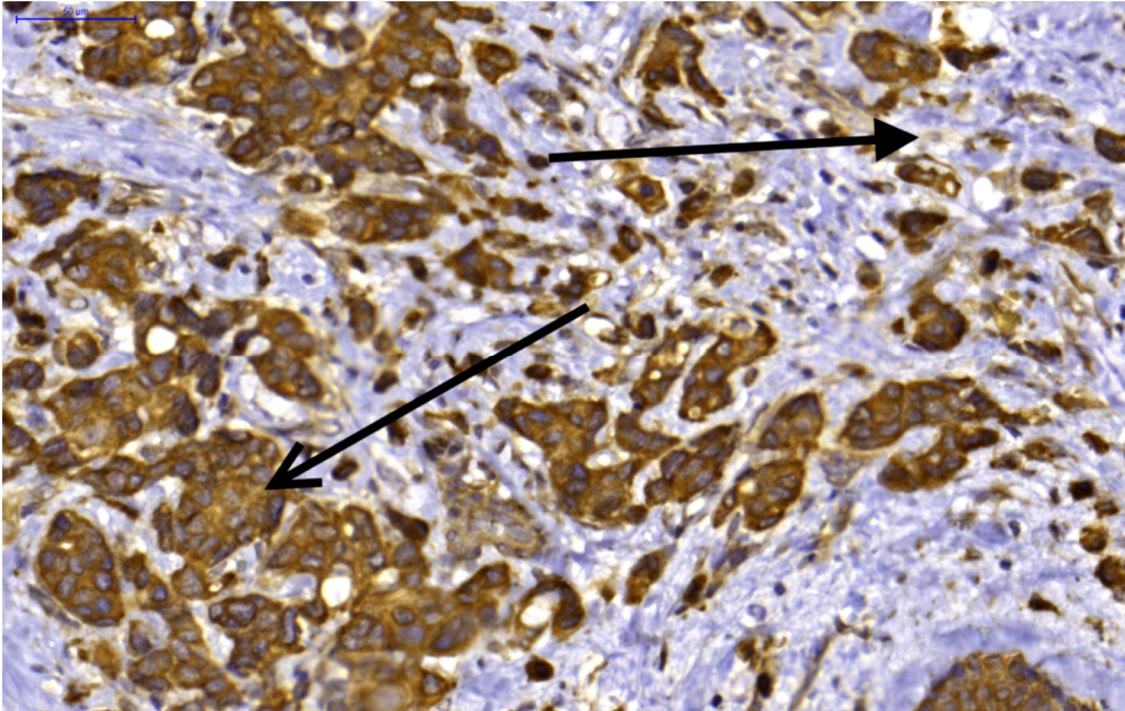
### 3.7. Expression von pPGRMC1

Jedes im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Mammakarzinom zeigte eine starke Expression von pPGRMC1 - detektiert mit dem monoklonalen AK 3G11A2 - im Zytoplasma der Tumorzellen (siehe Abb. 9). Der IRS-Median lag dabei bei 12,00 (Minimum = 3, Maximum = 12). Ebenso konnten, wie bereits für die Expression von PGRMC1, keine Unterschiede der pPGRMC1-Expression in Abhängigkeit vom histopathologischen Befund, der Menopausenphase, dem Tumor-Grading oder dem Alter der Patientinnen festgestellt werden (siehe Tab. 10).

#### 3.7.1. Expression in umgebendem Bindegewebe

Ein deutlich und statistisch signifikantes schwächeres Signal von pPGRMC1 (IRS-Median = 2,00 [Minimum = 0, Maximum = 6]) konnte in dem das Tumorgewebe umgebenden Bindegewebe beobachtet werden ( $p > 0,001$ ), siehe dazu auch Abb. 9.





**Abb. 9:** Lokalisation der Expression von pPGRMC1

pPGRMC1-positives Mammakarzinom; Gewebeprobe wurde in 4,5% gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, Vergrößerung 1:20; gefüllte Pfeilspitze: Bindegewebe; ungefüllte Pfeilspitze: Zytoplasma von Mammakarzinom-Zellen  
 Abkürzungen: pPGRMC1 = Phospho-S180-Progesteronrezeptor-Membran­komponente 1,  $\mu\text{m}$  = Mikrometer

### 3.7.2. Zusammenhang mit demographischen und klinischen Parametern

Auch die Expression von pPGRMC1 zeigte keine Unterschiede in Abhängigkeit zum Alter der Patientinnen. Zusätzlich teilen wir wie bereits bei PGRMC1 (siehe Tab. 6) die Gesamtgruppe in vier Alters-Subgruppen auf. Die Expression von pPGRMC1 ist in der Patientinnengruppe über 70 Jahre stärker verglichen mit der Gruppe der 50 bis 59-Jährigen ( $p = 0,005$ ), und der 60 bis 69-Jährigen ( $p = 0,036$ ) (siehe Tab. 10).

Bezüglich der Menopausenphase und des histopathologischen Befundes konnten keine Unterschiede der Expressivität von pPGRMC1 festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied im Vergleich der verschiedenen Tumor-Gradings, so war der IRS von pPGRMC1 in mäßig differenzierten Tumoren (G2) statistisch signifikant höher als der IRS in schlecht differenzierten Mammakarzinomen (G3) ( $p = 0,021$ ), siehe Tab. 10.

**Tab. 10:** IRS pPGRMC1 nach demographischen und klinischen Merkmalen

Merkmal	IRS pPGRMC1	
	Tumor	TA
Gr.1	12,00 (8-12)	2,00 (0-6)
Gr.2	8,00 (3-12)	2,00 (0-6)
Gr.3	12,00 (3-12)	2,00 (0-6)
Gr.4	12,00 (8-12)	3,00 (0-6)
M1	12,00 (8-12)	2,00 (0-4)
M2	12,00 (4-12)	1,00 (0-6)
M3	12,00 (3-12)	2,00 (0-6)
H1	12,00 (4-12)	2,00 (0-6)
H2	12,00 (3-12)	2,00 (0-6)
H3	10,00 (3-12)	3,50 (1-6)
H4	12,00 (12)	2,00 (0-4)
G1	12,00 (12)	1,00 (0-2)
G2	12,00 (3-12)	2,00 (0-6)
G3	8,00 (3-12)	2,00 (0-6)

Abkürzungen: G1 = gut differenzierter Tumor, G2 = mäßig differenzierter Tumor, G3 = schlecht differenzierter Tumor, Gr.1 = Alter von 30 bis 49 Jahren, Gr.2 = Alter von 50 bis 59 Jahren, Gr.3 = Alter von 60 bis 69 Jahren, Gr.4 = Alter über 70 Jahre, H1= invasiv duktales Karzinom, H2 = invasiv lobuläres Karzinom, H3 = invasiv duktolobuläres Karzinom, H4 = muzinöses Karzinom, IRS = immunreaktiver Score, M1 = prämenopausaler Status, M2 = perimenopausaler Status, M3 = postmenopausaler Status, pPGRMC1 = phospho-S180- Progesteronrezeptor-Membran­komponente 1, TA = den Tumor umgebendes Bindegewebe, Tumor = Mammakarzinom

\* Werte sind jeweils als Median mit Minimum und Maximum angegeben.

### 3.7.3. Korrelation mit Hormonrezeptoren und Ki-67

Wir fanden positive Korrelation der Expression von pPGRMC1 mit ER $\beta$ 1 ( $p = 0,018$ ,  $T_s = 0,287$ ), ER $\beta$ 2 ( $p = 0,041$ ,  $T_s = 0,251$ ) und Gesamt-ER $\beta$  ( $p = 0,002$ ,  $T_s = 0,370$ ) im Tumorgewebe. Wie auch schon bei PGRMC1, zeigte sich auch für pPGRMC1 keine Korrelation mit der Koexpression von ER $\alpha$ , PR, HER2/neu oder Ki-67.

3.7.4. Assoziation mit Hormonrezeptoren und Ki-67, gewichtet nach dem Alter  
Wie wir bereits für das Gesamtprotein PGRMC1 beobachten konnten, war auch die Expression von pPGRMC1 stärker bei höheren Expressionsleveln von ER $\alpha$  ( $p = 0,001$ ,  $T_s = 0,614$ ) und ER $\beta$ 1 ( $p = 0,012$ ,  $T_s = 0,484$ ) bei Patientinnen im Alter von 60 bis 69 Jahren. In dieser Altersgruppe zeigte sich darüber hinaus auch die Expression von pPGRMC1 höher mit Koexpression von PR ( $p = 0,035$ ,  $T_s = 0,415$ ).

In der Altersgruppe von 32 bis 49 Jahren zeigte sich eine stärkere Expression pPGRMC1 mit der Koexpression von Gesamt-ER $\beta$  ( $p = 0,026$ ,  $T_s = 0,571$ ) und ER $\beta$ 2 ( $p = 0,014$ ,  $T_s = 0,617$ ).

Wie schon bei PGRMC1 konnten wir auch für pPGRMC1 nach Altersgruppen gewichtet keine Unterschiede in anderen Altersgruppen und für die Koexpression von HER2/neu und Ki-67 finden.

### 3.7.5. Änderung der Expression nach neoadjuvanter Therapie

Nach erfolgter neoadjuvanter Therapie, egal welchem Therapiearm die Patientin zugeführt wurde, zeigte sich ein niedrigerer IRS von pPGRMC1 im Tumorgewebe im Vergleich zur Expressivität vor neoadjuvanter Therapie ( $p = 0,003$ ), jedoch nicht im den Tumor umgebenden Bindegewebe. Aufgegliedert nach Art der Therapie zeigte sich jedoch keine Änderung der Expressivität von pPGRMC1 in der Anthrazykline-Gruppe ( $p = 0,739$ ,  $T_s = 0,751$ ), wohl jedoch in der Gruppe, welche mit Taxanen ( $p = 0,041$ ,  $T_s = -0,069$ ) und auch in der Gruppe, die mit Aromatase-Inhibitoren ( $p = 0,010$ ,  $T_s = 0,336$ ) behandelt worden ist. Die Expression von pPGRMC1 nach der Therapie war in beiden Fällen niedriger als vor der Therapie.

Darüber hinaus konnte nach Gewichtung nach Altersgruppen, dass sich in der Gruppe der 30 bis 49-Jährigen im Vergleich zur Gruppe der über 70-Jährigen eine geringere Expressivität von pPGRMC1 ( $p = 0,009$ ) zeigte.



#### 3.7.5.1. Assoziation mit Hormonrezeptoren und Ki-67

Wir sahen eine Korrelation in der Koexpression von pPGRMC1 mit ER $\beta$ t ( $p = 0,005$ ,  $T_s = 0,348$ ) und einen zumindest Trend in der Koexpression mit ER $\alpha$  ( $p = 0,080$ ,  $T_s = 0,219$ ).

#### 3.7.5.2. Assoziation mit Hormonrezeptoren, HER2/neu und Ki-67, gewichtet nach dem Alter

Wir konnten keinen Unterschied der Expressivität von pPGRMC1 in Korrelation mit Hormonrezeptoren finden, nachdem wir nach dem Alter gewichtet die Expressivität von pPGRMC1 untersuchten. Auch zwischen den einzelnen Therapiearmen gab es keinen Unterschied der Expressionsintensität.

### 3.8. Vergleich von PGRMC1 mit pPGRMC1

#### 3.8.1. Expression von PGRMC1 und pPGRMC1 vor neoadjuvanter Therapie

Es stellt sich auch die Frage, ob sich der IRS von PGRMC1, der das Gesamtprotein repräsentiert, von dem IRS von pPGRMC1, der die phosphorylierte Form detektiert, unterscheidet. Im aufgrund dessen angewandten Wilcoxon-Test zeigte sich jedoch kein Unterschied der IRS im Tumorgewebe und in dem das Tumorgewebe umgebenden Bindegewebe.

#### 3.8.2. Expression von PGRMC1 und pPGRMC1 nach neoadjuvanter Therapie

Der IRS von PGRMC1 und pPGRMC1 nach neoadjuvanter Therapie unterschied sich in unserer Gruppe statistisch signifikant voneinander (Wilcoxon-Test  $p = 0,015$ ), dabei wies die Expressivität von PGRMC1 (Median = 10,12 [2-12]) im Gegensatz zu pPGRMC1 (Median = 9,14 [3-12]) einen höheren Durchschnittswert auf.

Im tumorassoziierten Gewebe zeigten sich hinsichtlich der Expressivität von PGRMC1 und pPGRMC1 keine Unterschiede.

## 4. Diskussion

### 4.1. Stärken der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste, die sich mit einer genauen immunhistochemischen Darstellung von PGRMC1 und pPGRMC1 sowohl im Mammakarzinomgewebe selbst als auch im umgebenden Gewebe vor und nach neoadjuvanter Therapie befasst. Es konnten hierbei erstmals Expressionsunterschiede von pPGRMC1 und PGRMC1 nach neoadjuvanter Therapie im Mammakarzinom sowie auch im tumorassoziierten Gewebe nachgewiesen werden.

### 4.2. Schwächen der Arbeit

Limitierend für die Bewertung der vorliegenden Ergebnisse ist die relativ kleine Fallzahl mit 69 auswertbaren Tumorproben, die zudem verschiedene klinische und histopathologische Merkmale aufweisen. Zudem haben wir keine Daten zum Langzeitverlauf der Behandlung erhalten, sodass über pPGRMC1 als mögliche Einflussgröße bezüglich der Überlebensrate oder dem Langzeittherapieansprechen hier nur spekuliert werden kann. Jedoch handelt es sich hier um eine Pilotstudie, die Anhalte für mögliche weitere intensivere Studien geben kann.

### 4.3. Deutung der Ergebnisse

#### 4.3.1. Expression im Mammakarzinom aber auch umgebenden Gewebe

Sowohl PGRMC1 als pPGRMC1 sind in allen in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorgeweben sehr stark exprimiert. Der Nachweis von PGRMC1 in Mammakarzinom-Zellen gelang sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Bei pPGRMC1 zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung im Gegensatz zu PGRMC1 eine starke Lokalisation im Zytoplasma, jedoch nicht im Zellkern. Im Tumor-umgebenden Bindegewebe sind sowohl pPGRMC1 als auch PGRMC1 im Vergleich zu den Tumorzellen relativ schwach exprimiert, wobei pPGRMC1 noch deutlich schwächer exprimiert ist als PGRMC1.

Diese Ergebnisse werden durch Daten anderer Forschungsgruppen unterstützt, die zeigen konnten, dass die Expression von PGRMC1 in Mammakarzinomen im Vergleich zu nicht-malignen Brustgewebe signifikant erhöht ist [118, 185]. Auch in Endometriumkarzinom-Zelllinien konnte die Expression von PGRMC1 nachgewiesen werden [121, 186]. Analog zu den hier vorliegenden Ergebnissen der unterschiedlichen Expressionsstärke ist PGRMC1 dort im Tumor hoch exprimiert, und deutlich niedriger im umgebenden, nicht tumorösen Gewebe [133].

4.3.2. Korrelation der Expression mit klinischen und histopathologischen Daten  
Wir konnten keine Korrelation zwischen den Expressionsunterschieden für PGRMC1/pPGRMC1 mit typischen klinischen Daten wie dem Alter bei Probeentnahme, dem Menopausenstatus, in dem sich die Patientin befand oder der Tumorart feststellen. Jedoch war pPGRMC1 in mäßig differenzierten Tumoren statistisch signifikant stärker als in schlecht differenzierten exprimiert. In anderen Studien ist PGRMC1 signifikant mit Lymphknotenmetastasen, Tumorgröße, TNM-Stadium, allgemeiner und Tumor-freier Überlebensrate, jedoch nicht mit dem Alter der Patienten oder des Differenzierungsgrades der Tumore assoziiert [187]. In der multivariaten Überlebensanalyse stellte sich PGRMC1 als ein unabhängiger prognostischer Faktor von Brustkrebs dar [187]. In der vorgelegten Arbeit war pPGRMC1 in der Gruppe mit Patientinnen von 70-79 Jahren am stärksten exprimiert. Derzeit wissen wir nicht, ob diese Phosphorylierung aktivierend oder inhibierend wirkt. Wenn wir davon ausgehen, dass die Hormonspiegel – also der Ligand – in dieser Patientinnengruppe allgemein niedrig ist, wäre es denkbar, dass PGRMC1 in einer Art Kompensationsmechanismus durch die Phosphorylierung aktiviert werden könnte. Ein ähnlicher Vorgang wurde in Rattenhirnen beobachtet. Allerdings steigert sich hier im Alter die Expression von PGRMC1, wobei es sich dabei wohl um einen Kompensationsmechanismus handelt, da PGRMC1 im voranschreitendem Alter die Bindungsaffinität verliert [188]. Es gibt aber Studiendaten darüber, dass die mRNA-Level von PGRMC1 mit steigendem Patientenalter signifikant abnehmen [189].

Diese unterschiedlichen Ergebnisse können aufgrund unterschiedlicher Nachweismethoden zustande kommen, da, wie bekannt ist, die Expression von mRNA nicht immer auf Protein-Ebene übertragen werden kann. Ein weiterer möglicher Grund könnte sein, dass verschiedene ethnische Gruppen untersucht wurden, eine aus China [187], während die anderen Studien in den USA durchgeführt wurden [189] und es bei der PGRMC1-Expression ethnische oder geographische Unterschiede geben könnte.

Die Expression von PGRMC1 steht bei Ovarialkarzinomen in Beziehung zu den histopathologischen Tumordifferenzierungsgraden wie auch zur Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapien: wenn PGRMC1 reduziert wird, steigert sich Empfindlichkeit ovarialer Tumorzellen gegenüber Cisplatin. Die Tumorzellen wachsen *in vitro* langsamer und die erzielten Tumorgrößen in Nacktmäusen waren signifikant kleiner als in Kontrollen [133, 153, 190, 191]. Der nachgeschaltete beziehungsweise die nachgeschalteten Mechanismen sowie Interaktionen zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren, durch welche PGRMC1 seine Tumor-entwickelnden Aktivitäten möglicherweise ausüben könnte, bleibt bisher weiterhin unklar.

Allgemein ist wenig über die Funktion von PGRMC1 bekannt. Es verfügt über die Fähigkeit, an PAIRBP1 zu binden [130, 133]. Diese Bindungsfähigkeit konnte sowohl in Brustgewebezellen von Nagetieren als auch in menschlichen MCF-7-Zellen nachgewiesen werden [192, 193]. Es wird angenommen, dass die Interaktion von PAIRBP1 und PGRMC1 ein wesentlicher Bestandteil des Mechanismus ist, durch den Progesteron seine Apoptose-inhibierende Wirkung vermittelt [194] und somit auch Einfluss auf die Kanzerogenese nehmen könnte.

#### 4.3.3. Korrelation der Expression mit anderen Rezeptoren

In dieser Arbeit sind die Expressionen PGRMC1 und ER $\beta$ 1 positiv korreliert (je stärker PGRMC1 exprimiert wurde, desto stärker wurde auch ER $\beta$ 1 im Tumor exprimiert). In der Altersgruppe der 60-69 Jährigen zeigte sich eine positive Korrelation der Expression von PGRMC1 mit ER $\alpha$  und ER $\beta$ 1.

Die meisten klinischen Studien stellten bereits fest, dass eine hohe Expression ER $\beta$ -ähnlicher Proteine mit einem besseren klinischen Outcome assoziiert ist,

obwohl einige Studien mit kontroversen Ergebnissen veröffentlicht wurden [195-198]. Somit scheinen Einflussfaktoren, die auf die Expression ER $\beta$  im Tumorgewebe wirken, vielleicht auch PGRMC1 und pPGRMC1 mitbeeinflussen zu können. Eine mögliche Hypothese wäre, dass PGRMC1 durch P450-Proteine auf den Hormon-Haushalt wirken könnte oder direkt die Expression von ER $\beta$  beeinflusst.

In bereits vorliegenden und veröffentlichten *in vitro* Untersuchungen konnte eine Hochregulation von ER $\alpha$  in Brustkrebszellen, die PGRMC1 überexprimieren, gezeigt werden [185]. Die *in vitro*-Daten deuten zudem darauf hin, dass ER $\alpha$  für den vermuteten PGRMC1-vermittelten „proliferativen Effekt“ notwendig ist [185], sodass eine gemeinsame Expression von PGRMC1 und ER $\alpha$  biologisch sinnvoll sein könnte.

Zhang *et al.* stellte die Hypothese auf, dass eine hohe Expression von PGRMC1 durch Interaktion mit ER $\alpha$  zu einer erhöhten Brustkrebswahrscheinlichkeit führt, insbesondere, wenn eine Hormon-Therapie im Vorfeld erfolgt ist [199].

In unserer Studie finden wir keinen Zusammenhang zwischen der Expression von PGRMC1 und den ER $\alpha$  Levels.

#### 4.3.4. Änderung der Expression nach neoadjuvanter Therapie

Nach neoadjuvanter Therapie nahm die PGRMC1-Expression nur im tumorassoziierten Gewebe ab, nicht jedoch im eigentlichen Tumorgewebe. Zudem war die Expression von PGRMC1 nach erfolgter neoadjuvanter Therapie mit der Expression von ER $\alpha$ , ER $\beta$  und Ki-67 korreliert. Es spielte dabei keine Rolle, in welchem Therapiearm sich die Patientin befunden hatte. Als wichtiges Resultat ergab sich jedoch, dass die Gruppe der Patientinnen, die sich in Teilremission befand, eine geringere PGRMC1-Expression aufwies.

Nach neoadjuvanter Therapie war pPGRMC1 niedriger exprimiert als vor Therapie. Hier machte es jedoch einen Unterschied, in welchem Therapiearm sich die Patientinnen befanden, sowohl in der Gruppe, die Taxane als auch in der, die Aromatase-Inhibitoren erhalten hatten, war die Expression von pPGRMC1 im Tumorgewebe nach Therapie geringer als vor Therapie. In der

Gruppe der 30-49 Jährigen zeigte sich unabhängig von ihrer Therapieart eine geringere Expression von pPGRMC1. Zudem waren die Expressionen von pPGRMC1 mit ERβ positiv korreliert. Die Expression von pPGRMC1 und PGRMC1 unterschied sich vor neoadjuvanter Therapie sowohl im Tumorgewebe als auch im Tumor-assoziierten Gewebe nicht voneinander, posttherapeutisch zeigte sich jedoch eine höhere Expression von PGRMC1 als von pPGRMC1 im Tumorgewebe. Im Tumor-assoziierten Gewebe hingegen gab es keinen Unterschied nach Therapie.

Entgegen bereits veröffentlichter Ergebnisse, zeigen unsere Daten nicht, dass es unter der Therapie mit Anthrazyklinen zu einer Reduktion von (p)PGRMC1 kommt [200]. Die Expression von pPGRMC1 reduzierte sich in unserer Arbeit in den beiden Gruppen, die mit Taxanen oder mit Aromatase-Inhibitoren behandelt worden waren. Die Wirkweise von Taxanen mündet in einem Abbau des Mikrotubuliapparats und kann somit wirksam in die Mitose- und Interphase des Zellzyklus eingreifen. Die Wirkweise der Aromatase-Inhibitoren vermittelt sich durch die Unterdrückung der Östrogenbiosynthese durch die spezifische Hemmung des Enzyms Aromatase. Letrozol zum Beispiel ist ein nicht-steroidaler Aromatase-Inhibitor, der die Aromatase durch kompetitive Bindung an das Häm des Cytochrom P450 der Aromatase hemmt und dadurch die Östrogenbiosynthese in all den Geweben reduziert, wo diese vorkommt. Unsere Ergebnisse sprechen für die allgemeine Annahme, dass die Expression von PGRMC1 auch durch Östrogene beeinflusst werden kann.

Die mögliche Rolle und Einflussgröße von PGRMC1 bei und in der Entwicklung von Mammakarzinomen könnte von besonderer Bedeutung im Hinblick auf eine mögliche Rolle von Gestagenen, welche das Brustkrebsrisiko unter Hormontherapie in der Postmenopause oder durch die hormonelle Empfängnisverhütung steigern, sein. Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass Gestagene eine entscheidende Rolle spielen können, aber auch, dass vermutlich Unterschiede innerhalb der Gestagen-Klasse bestehen [201]. Möglicherweise ist auch PGRMC1 an Gestagen-vermittelten Effekten beteiligt. Diese Annahme wird durch unsere *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen unterstrichen, in denen gezeigt werden konnte, dass bestimmte Gestagene

proliferativ über PGRMC1 auf menschliche Mammakarzinomzellen wirken, während andere Gestagene eine neutrale Funktion einnehmen [192, 193]. Es wurde zudem gezeigt, dass PGRMC1 anti-mitotische und/oder Zellüberlebensstrategien von Progesteron in verschiedenen Zelltypen (wie zum Beispiel in immortalisierten Granulosa-Zellen [133] oder Ovarialkarzinomzellen [153]) vermittelt [200]. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass es eine Zunahme von Zelltoden beziehungsweise Abnahme der Tumormasse in Zelllinien, in denen die PGRMC1-Expression reduziert war, und die mit Doxorubicin und Progesteron behandelt wurden [200]. Herauszustreichen ist die in der Studie formulierte Annahme, dass Progesteron neben des Signalwegs durch den PR seine Effekte auch durch andere Signalwege vermitteln kann, da bestimmte Progesteron-vermittelte Effekte in Zellen auftraten, die keine PR aber verschiedene Membran-Progestin Rezeptoren (unter anderem PGRMC1) exprimieren.

Es wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass PGRMC1 Progesteron mit hoher Affinität an Progesteron bindet [133] und für den antiapoptotischen Effekt von Progesteron zuständig ist. Daher könnte PGRMC1 als spezifisches Target für neue Karzinomtherapien auch über gynäkologische Tumorerkrankungen hinaus von wichtiger Bedeutung sein [200].

## 5. Zusammenfassung

Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit war in 69 zur Auswertung stehenden Mammakarzinomproben

1. die zelluläre Expression von PGRMC1 und deren Intensität in histologisch verschieden klassifizierbaren Mammakarzinomen mittels IHC zu beschreiben;
2. Assoziationen mit zusätzlich exprimierten Hormonrezeptoren wie ER $\alpha$ , Gesamt-ER $\beta$  (ER $\beta$ t), ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2 und PR, dem Marker für die Tumor-Proliferationsrate Antigen Ki-67 (Ki-67), HER2/neu und dem Alter zu finden;
3. gegebenenfalls eine Änderung der Expression von PGRMC1 nach neoadjuvanter Therapie zu beschreiben.

Sowohl PGRMC1 als pPGRMC1 sind in allen in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorgeweben sehr stark exprimiert. Der Nachweis von PGRMC1 in Mammakarzinom-Zellen gelang sowohl im Zytoplasma aber auch im Zellkern. Bei pPGRMC1 zeigte sich eine starke Lokalisation im Zytoplasma, jedoch nicht im Zellkern. Es fielen keine Expressionsunterschiede von PGRMC1 in den unterschiedlichen Tumorarten auf, jedoch war pPGRMC1 in mäßig differenzierten Tumoren stärker als in schlecht differenzierten exprimiert. Sowohl bei pPGRMC1 als auch bei PGRMC1 zeigte sich, wenn auch im Vergleich zu den Tumorzellen eine relativ schwache Expression im den Tumorumgebenden Bindegewebe, wobei pPGRMC1 deutlich schwächer exprimiert wurde als PGRMC1. Wir konnten keine Unterschiede der Expression von PGRMC1 nach typischen klinischen Parametern wie Alter, Menopausenstatus, Tumorart und Wachstum (durch Ki-67) feststellen. Es zeigte sich eine positive Korrelation der Koexpression von PGRMC1 und ER $\beta$ 1 (je stärker PGRMC1 exprimiert wurde, desto stärker wurde auch ER $\beta$ 1 im Tumor exprimiert). In der Altersgruppe der 60-69 Jährigen zeigte sich eine positive Korrelation der Expression von PGRMC1 mit ER $\alpha$  und ER $\beta$ 1. pPGRMC1 war in der ältesten Patientinnengruppe (der Gruppe der 70-79-Jährigen) am stärksten exprimiert. Es zeigten sich positive Korrelationen der Expression von pPGRMC1 mit ER $\beta$ t, ER $\beta$ 1 und ER $\beta$ 2. Die pPGRMC1-Expression nach Altersgruppen gewichtet zeigte, dass bei älteren Patientinnen die Expression von pPGRMC1 positiv mit



der Expression von ER $\alpha$  und ER $\beta$ 1 korreliert. Nach neoadjuvanter Therapie zeigte sich eine Abnahme der PGRMC1-Expression nur im tumorassoziierten Gewebe, nicht jedoch im eigentlichen Tumorgewebe. Zudem zeigten sich nach erfolgter neoadjuvanter Therapie positive Korrelationen von PGRMC1 mit der Koexpression mit ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1 und Ki-67. Es spielte dabei keine Rolle in welchem Therapiearm sich die Patientin befunden hatte. Als wichtiges Resultat ergab sich jedoch, dass die Gruppe von Patientinnen, die sich in Teilremission befand eine geringere PGRMC1-Expression aufwies. Nach neoadjuvanter Therapie war pPGRMC1 niedriger exprimiert als vor Therapie. Hier machte es einen Unterschied, in welchem Therapiearm sich die Patientinnen befanden, sowohl in der Gruppe, die Taxane als auch in der, die Aromatase-Inhibitoren erhalten hatten, war die Expression von pPGRMC1 im Tumorgewebe geringer als vor Therapie. In der Gruppe der 30-49 Jährigen zeigte sich unabhängig von ihrer Therapieart eine geringere Expressivität von pPGRMC1. Zudem konnten positive Korrelationen der Expression von pPGRMC1 mit ER $\beta$ 1 gezeigt werden. Die Expression von pPGRMC1 und PGRMC1 unterschied sich vor neoadjuvanter Therapie sowohl im Tumorgewebe als auch im Tumorassoziierten Gewebe nicht voneinander, posttherapeutisch zeigte sich jedoch eine höhere Expression von PGRMC1 als von pPGRMC1 im Tumorgewebe. Im Tumor-assoziierten Gewebe hingegen gab es keinen Unterschied nach Therapie.

Obwohl die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Proben klein ist, liefert diese Arbeit zum ersten Mal Anhaltspunkte dafür, dass die Stärke der Expression von pPGRMC1 möglicherweise mit der Koexpression von ER $\beta$ 1, und für die nicht-phosphorylierte Form mit ER $\beta$ 2 in Brustkrebsgewebeproben in einer bestimmten Altersgruppe korreliert. Diese Ergebnisse deuten passend zu anderen Forschungsergebnissen auf eine enge Beziehung zwischen den Östrogenrezeptoren und PGRMC1 und damit auch auf eine mögliche Modulation der Mammakarzinomentwicklung hin. Durch ein verbessertes Verständnis über Funktion und Einflussgröße von PGRMC1, ergäben sich neue Erkenntnisse darauf, wie man einen neuen Therapieansatz entwickeln könnte, der eine Modulation des Einflusses von PGRMC1 auf Brust- und Tumorgewebe

ermöglicht. Hierdurch könnte sich in der Zukunft für an Mammakarzinomen erkrankte Patientinnen eine neue Möglichkeit der Behandlung ergeben beziehungsweise eine noch individualisiertere Form des Therapiekonzeptes zugeschnitten auf bestimmte Tumoreigenschaften entstehen.

## 6. Verzeichnisse

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Cholesterin .....	6
Abb. 2: Strukturformel von Pregnenolon .....	7
Abb. 3: Herstellung eines Tissue Microarray .....	28
Abb. 4: Verwendete Tissue Microarray/Multiblocke .....	29
Abb. 5: Prinzip der indirekten Immunhistochemie .....	31
Abb. 6: Peptid-Blocking von PGRMC1 .....	43
Abb. 7: Phosphatase-Behandlung vor pPGRMC1-Detektion .....	44
Abb. 8: Lokalisation der Expression von PGRMC1 .....	46
Abb. 9: Lokalisation der Expression von pPGRMC1 .....	49

### 6.2. Graphikverzeichnis

Graphik 1: Altersverteilung der Patientengruppe .....	38
Graphik 2: Therapieansprechen der Gesamtkohorte .....	40
Graphik 3: Therapieansprechen in den unterschiedlichen Therapiearmen .....	41
Graphik 4: Übersicht über die Werte des Immunreaktiven Scores für PGRMC1 und pPGRMC1 .....	45

### 6.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Chemikalien .....	21
Tab. 2: Verwendete Lösungen und Puffer .....	22
Tab. 3: Verwendete Reagenziensets .....	22
Tab. 4: Verwendete Geräte .....	23
Tab. 5: Verwendete Antikörper .....	24
Tab. 6: Berechnung des immunreaktiven Scores .....	35
Tab. 7: Altersgruppen .....	38
Tab. 8: Klinische und histopathologische Daten .....	39
Tab. 9: IRS PGRMC1 nach demographischen und klinischen Merkmalen .....	47
Tab. 10: IRS pPGRMC1 nach demographischen und klinischen Merkmalen .....	50
Tab. 11: IRS der Hormonrezeptoren nach klinischen Parametern vor neoadjuvanter Therapie .....	75
Tab. 12: IRS der Hormonrezeptoren nach klinischen Parametern nach neoadjuvanter Therapie .....	76
Tab. 13: IRS von HER2/neu und Ki-67 nach klinischen Parametern vor neoadjuvanter Therapie .....	77
Tab. 14: IRS von HER2/neu und Ki-67 nach klinischen Parametern nach neoadjuvanter Therapie .....	78

## 6.4. Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010.
3. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
4. Anderson, B.O., et al., *Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007*. Cancer, 2008. **113**(8 Suppl): p. 2221-43.
5. Meindl, A., et al., *Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(19): p. 323-30.
6. Regierer, A.C. and K. Possinger, *Mammakarzinom : Manual Diagnostik und Therapie*. 2005, Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. XII, 140.
7. Armstrong, K., A. Eisen, and B. Weber, *Assessing the risk of breast cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 564-71.
8. *Cancer incidence in five continents. Volume VII*. IARC Sci Publ, 1997(143): p. i-xxxiv, 1-1240.
9. Ries, L.A., et al., *The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer*. Cancer, 2000. **88**(10): p. 2398-424.
10. Hulka, B.S. and P.G. Moorman, *Breast cancer: hormones and other risk factors*. Maturitas, 2001. **38**(1): p. 103-13; discussion 113-6.
11. Shimizu, H., et al., *Serum oestrogen levels in postmenopausal women: comparison of American whites and Japanese in Japan*. Br J Cancer, 1990. **62**(3): p. 451-3.
12. Stoll, B.A., *Adiposity as a risk determinant for postmenopausal breast cancer*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(5): p. 527-33.
13. Cauley, J.A., et al., *The epidemiology of serum sex hormones in postmenopausal women*. Am J Epidemiol, 1989. **129**(6): p. 1120-31.
14. Thomas, H.V., G.K. Reeves, and T.J. Key, *Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review*. Cancer Causes Control, 1997. **8**(6): p. 922-8.
15. Osei-Hyiaman, D., et al., *Timing of menopause, reproductive years, and bone mineral density: a cross-sectional study of postmenopausal Japanese women*. Am J Epidemiol, 1998. **148**(11): p. 1055-61.
16. Boyd, N.F., et al., *Mammographic densities and breast cancer risk*. Breast Dis, 1998. **10**(3-4): p. 113-26.
17. Dupont, W.D. and D.L. Page, *Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease*. N Engl J Med, 1985. **312**(3): p. 146-51.
18. Rockhill, B., C.R. Weinberg, and B. Newman, *Population attributable fraction estimation for established breast cancer risk factors: considering the issues of high prevalence and unmodifiability*. Am J Epidemiol, 1998. **147**(9): p. 826-33.

19. Schatzkin, A. and M.P. Longnecker, *Alcohol and breast cancer. Where are we now and where do we go from here?* Cancer, 1994. **74**(3 Suppl): p. 1101-10.
20. Palmer, J.R., et al., *Breast cancer and cigarette smoking: a hypothesis.* Am J Epidemiol, 1991. **134**(1): p. 1-13.
21. Thompson, W.D., *Genetic epidemiology of breast cancer.* Cancer, 1994. **74**(1 Suppl): p. 279-87.
22. Honrado, E., J. Benitez, and J. Palacios, *The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications.* Mod Pathol, 2005. **18**(10): p. 1305-20.
23. Ripperger, T., et al., *Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling.* Eur J Hum Genet, 2009. **17**(6): p. 722-31.
24. Easton, D.F., et al., *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.* Nature, 2007. **447**(7148): p. 1087-93.
25. Wagener, C. and O. Müller, *Molekulare Onkologie : Entstehung, Progression, klinische Aspekte; 95 Tab. 3., komplett aktualis. und erw. Aufl. ed. 2010, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XIX, 404.*
26. Berdasco, M. and M. Esteller, *Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry.* Dev Cell, 2010. **19**(5): p. 698-711.
27. Munshi, A., et al., *Histone modifications dictate specific biological readouts.* J Genet Genomics, 2009. **36**(2): p. 75-88.
28. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.* N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
29. Schrauder, M.G., et al., *Circulating Micro-RNAs as Potential Blood-Based Markers for Early Stage Breast Cancer Detection.* Plos One, 2012. **7**(1).
30. Ferracin, M., et al., *MicroRNAs: toward the clinic for breast cancer patients.* Semin Oncol, 2011. **38**(6): p. 764-75.
31. Lujambio, A. and M. Esteller, *CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer.* Cell Cycle, 2007. **6**(12): p. 1455-9.
32. Kanwal, R. and S. Gupta, *Epigenetic modifications in cancer.* Clin Genet, 2012. **81**(4): p. 303-11.
33. Pu, R.T., et al., *Methylation profiling of benign and malignant breast lesions and its application to cytopathology.* Mod Pathol, 2003. **16**(11): p. 1095-101.
34. Fackler, M.J., et al., *DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma.* Int J Cancer, 2003. **107**(6): p. 970-5.
35. Silverstein, M.J., et al., *A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast.* Cancer, 1996. **77**(11): p. 2267-74.
36. Sedlacek, H.-H., *Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen : Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten.* 2013, Berlin [u.a.]: De Gruyter. XIV, 1102 S.

37. Goldhirsch, A., et al., *Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007*. Ann Oncol, 2007. **18**(7): p. 1133-44.
38. Schmidt, M., et al., *Biomarkers in breast cancer – an update*. Geburtsh Frauenheilk, 2012. **72**: p. 819–832.
39. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
40. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
41. Yu, K., et al., *Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5508-17.
42. Kennecke, H., et al., *Metastatic behavior of breast cancer subtypes*. J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3271-7.
43. Sotiriou, C. and L. Pusztai, *Gene-expression signatures in breast cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 790-800.
44. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.
45. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
46. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. 7. Aufl. ed. Springer-Spektrum-Lehrbuch. 2013, Berlin; Heidelberg: Springer Spektrum. XLI, 1196.
47. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen : mit über 1000 Abbildungen; große Falttafel mit Stoffwechselübersicht*. 1. Aufl. ed, ed. M. Scharl and M. Arand. 2009, München: Elsevier, Urban & Fischer. XXII, 1034 S.
48. Kleine, B. and W.G. Rossmanith, *Hormone und Hormonsystem : Lehrbuch der Endokrinologie*. 2., erw. Aufl. ed. Springer-Lehrbuch. 2010, Berlin: Springer. XIX, 358 S.
49. Lin, B.C. and T.S. Scanlan, *Few things in life are "free": cellular uptake of steroid hormones by an active transport mechanism*. Mol Interv, 2005. **5**(6): p. 338-40.
50. Sternlicht, M.D., et al., *Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis*. Differentiation, 2006. **74**(7): p. 365-81.
51. Saji, S., et al., *Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 337-42.
52. Russo, I.H. and J. Russo, *Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies*. Environ Health Perspect, 1996. **104**(9): p. 938-67.
53. Beral, V. and C. Million Women Study, *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 419-27.
54. de Waard, F. and J.H. Thijssen, *Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special*

- reference to nutritional status and first pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. **97**(5): p. 451-8.
55. Bernstein, L., *The risk of breast, endometrial and ovarian cancer in users of hormonal preparations*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006. **98**(3): p. 288-96.
  56. Reeves, G.K., et al., *Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(11): p. 910-8.
  57. Cavalieri, E., E. Rogan, and D. Chakravarti, *The role of endogenous catechol quinones in the initiation of cancer and neurodegenerative diseases*. *Methods Enzymol*, 2004. **382**: p. 293-319.
  58. Russo, J. and I.H. Russo, *The role of estrogen in the initiation of breast cancer*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **102**(1-5): p. 89-96.
  59. Osborne, C.K., *Steroid hormone receptors in breast cancer management*. *Breast Cancer Res Treat*, 1998. **51**(3): p. 227-38.
  60. Henderson, I.C., *Risk factors for breast cancer development*. *Cancer*, 1993. **71**(6 Suppl): p. 2127-40.
  61. Fisher, B., et al., *Findings from recent National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies in stage I breast cancer*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2001(30): p. 62-6.
  62. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte : 107 Tab. 4.*, vollst. überarb. u. erw. Aufl. ed, ed. F.A. Leidenberger. 2009, Heidelberg: Springer. XII, 778 S.
  63. Haslam, S.Z. and G. Shyamala, *Progesterone receptors in normal mammary glands of mice: characterization and relationship to development*. *Endocrinology*, 1979. **105**(3): p. 786-95.
  64. Clarke, C.L. and R.L. Sutherland, *Progesterin regulation of cellular proliferation*. *Endocr Rev*, 1990. **11**(2): p. 266-301.
  65. Clarke, C.L., *Cell-specific regulation of progesterone receptor in the female reproductive system*. *Mol Cell Endocrinol*, 1990. **70**(3): p. C29-33.
  66. Clarke, C.L., et al., *Progesterone receptor regulation by retinoic acid in the human breast cancer cell line T-47D*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(21): p. 12694-700.
  67. Landis, C.A., et al., *GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours*. *Nature*, 1989. **340**(6236): p. 692-6.
  68. Iiri, T., et al., *Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function*. *Nature*, 1994. **371**(6493): p. 164-8.
  69. Beato, M., *Gene regulation by steroid hormones*. *Cell*, 1989. **56**(3): p. 335-44.
  70. Carson-Jurica, M.A., W.T. Schrader, and B.W. O'Malley, *Steroid receptor family: structure and functions*. *Endocr Rev*, 1990. **11**(2): p. 201-20.
  71. Tsai, M.J. and B.W. O'Malley, *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. *Annu Rev Biochem*, 1994. **63**: p. 451-86.
  72. Pratt, W.B., *Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts*. *Mol Cell Endocrinol*, 1990. **74**(1): p. C69-76.

73. Smith, D.F. and D.O. Toft, *Steroid receptors and their associated proteins*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(1): p. 4-11.
74. Hollenberg, S.M. and R.M. Evans, *Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor*. Cell, 1988. **55**(5): p. 899-906.
75. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
76. Germain, P., et al., *Overview of nomenclature of nuclear receptors*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(4): p. 685-704.
77. Giguere, V., *Orphan nuclear receptors: from gene to function*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 689-725.
78. Valverde, M.A., et al., *Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit*. Science, 1999. **285**(5435): p. 1929-31.
79. Hammes, S.R., *The further redefining of steroid-mediated signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2168-70.
80. Falkenstein, E., et al., *Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 513-56.
81. Brinton, R.D., et al., *Progesterone receptors: form and function in brain*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(2): p. 313-39.
82. Cato, A.C., A. Nestl, and S. Mink, *Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways*. Sci STKE, 2002. **2002**(138): p. re9.
83. Zhu, Y., J. Bond, and P. Thomas, *Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2237-42.
84. Thomas, P., *Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(2): p. 292-312.
85. Cahill, M.A., *Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **105**(1-5): p. 16-36.
86. Toft, D. and J. Gorski, *A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **55**(6): p. 1574-81.
87. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema, *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett, 1996. **392**(1): p. 49-53.
88. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5925-30.
89. Hanstein, B., M.W. Beckmann, and H.G. Bender, *[Role of estrogen receptor isoforms in the pathogenesis and treatment of endometrial cancer]*. Zentralbl Gynakol, 2002. **124**(1): p. 17-9.
90. Jordan, V.C., et al., *Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antioestrogen tamoxifen (I.C.I. 46,474) in the rat*. Mol Cell Endocrinol, 1977. **7**(2): p. 177-92.



91. Roger, P., et al., *Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors*. *Cancer Res*, 2001. **61**(6): p. 2537-41.
92. Leygue, E., et al., *Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis*. *Cancer Res*, 1998. **58**(15): p. 3197-201.
93. Fuqua, S.A., et al., *A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions*. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4026-9.
94. Horwitz, K.B. and P.S. Alexander, *In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation*. *Endocrinology*, 1983. **113**(6): p. 2195-201.
95. Zhang, Y., et al., *Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(6): p. 823-32.
96. Bain, D.L., et al., *The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural analysis and the influence of the DNA binding domain*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(10): p. 7313-20.
97. Kastner, P., et al., *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. *EMBO J*, 1990. **9**(5): p. 1603-14.
98. Skildum, A., E. Faivre, and C.A. Lange, *Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(2): p. 327-39.
99. Conneely, O.M. and J.P. Lydon, *Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms*. *Steroids*, 2000. **65**(10-11): p. 571-7.
100. Migliaccio, A., et al., *Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor*. *EMBO J*, 1998. **17**(7): p. 2008-18.
101. Sartorius, C.A., T. Shen, and K.B. Horwitz, *Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts*. *Breast Cancer Res Treat*, 2003. **79**(3): p. 287-99.
102. Horwitz, K.B., et al., *Progestin action and progesterone receptor structure in human breast cancer: a review*. *Recent Prog Horm Res*, 1985. **41**: p. 249-316.
103. Bamberger, A.M., et al., *Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 6169-74.
104. Owen, G.I., et al., *Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(17): p. 10696-701.
105. Wardell, S.E., et al., *Jun dimerization protein 2 functions as a progesterone receptor N-terminal domain coactivator*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(15): p. 5451-66.

106. Boonyaratanakornkit, V., et al., *Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 269-80.
107. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 358-417.
108. Saji, S., et al., *Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4849-53.
109. Romano, G.J., A. Krust, and D.W. Pfaff, *Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an in situ hybridization study*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(8): p. 1295-300.
110. Kato, J., et al., *Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain*. Horm Behav, 1994. **28**(4): p. 454-63.
111. Bergqvist, A., K. Carlstrom, and O. Ljungberg, *Histochemical localization of estrogen and progesterone receptors: evaluation of a method*. J Histochem Cytochem, 1984. **32**(5): p. 493-500.
112. Press, M.F. and G.L. Greene, *Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterone receptor*. Endocrinology, 1988. **122**(3): p. 1165-75.
113. Gerdes, D., et al., *Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors*. Biol Chem, 1998. **379**(7): p. 907-11.
114. Min, L., et al., *Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein*. FEBS J, 2005. **272**(22): p. 5832-43.
115. Mifsud, W. and A. Bateman, *Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain*. Genome Biol, 2002. **3**(12): p. RESEARCH0068.
116. Beausoleil, S.A., et al., *Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12130-5.
117. Sauer, G., et al., *Proteome analysis of the human mitotic spindle*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(1): p. 35-43.
118. Crudden, G., R. Loesel, and R.J. Craven, *Overexpression of the cytochrome p450 activator hpr6 (heme-1 domain protein/human progesterone receptor) in tumors*. Tumour Biol, 2005. **26**(3): p. 142-6.
119. Neubauer, H., et al., *The presence of a membrane-bound progesterone receptor sensitizes the estradiol-induced effect on the proliferation of human breast cancer cells*. Menopause, 2011. **18**(8): p. 845-50.
120. Shin, B.K., et al., *Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7607-16.
121. Peluso, J.J., *Progesterone signaling mediated through progesterone receptor membrane component-1 in ovarian cells with special emphasis on ovarian cancer*. Steroids, 2011. **76**(9): p. 903-9.
122. Mir, S.U., et al., *Elevated progesterone receptor membrane component 1/sigma-2 receptor levels in lung tumors and plasma from lung cancer patients*. Int J Cancer, 2012. **131**(2): p. E1-9.

123. Buddhikot, M., et al., *Recognition of a human sperm surface protein involved in the progesterone-initiated acrosome reaction by antisera against an endomembrane progesterone binding protein from porcine liver*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **158**(1-2): p. 187-93.
124. Meyer, C., et al., *Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes*. Eur J Biochem, 1996. **239**(3): p. 726-31.
125. Falkenstein, E., et al., *Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(1): p. 86-9.
126. Nolte, I., et al., *Localization and topology of ratp28, a member of a novel family of putative steroid-binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1543**(1): p. 123-30.
127. Hand, R.A. and R.J. Craven, *Hpr6.6 protein mediates cell death from oxidative damage in MCF-7 human breast cancer cells*. J Cell Biochem, 2003. **90**(3): p. 534-47.
128. Raza, F.S., et al., *Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor*. Eur J Biochem, 2001. **268**(7): p. 2141-7.
129. Sakamoto, H., et al., *Expression and localization of 25-Dx, a membrane-associated putative progesterone-binding protein, in the developing Purkinje cell*. Neuroscience, 2004. **126**(2): p. 325-34.
130. Peluso, J.J., et al., *Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability*. Biol Reprod, 2005. **73**(2): p. 261-70.
131. Peluso, J.J., et al., *Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action*. Endocrinology, 2006. **147**(6): p. 3133-40.
132. Leel, V., et al., *Identification of a truncated ratp28-related protein expressed in kidney*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(3): p. 872-7.
133. Peluso, J.J., J. Romak, and X. Liu, *Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations*. Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 534-43.
134. Krebs, C.J., et al., *A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12816-21.
135. Peluso, J.J., et al., *Progesterone inhibits apoptosis in part by PGRMC1-regulated gene expression*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **320**(1-2): p. 153-61.
136. Losel, R.M., et al., *Progesterone receptor membrane component 1--many tasks for a versatile protein*. Steroids, 2008. **73**(9-10): p. 929-34.

137. Peluso, J.J., J. DeCerbo, and V. Lodde, *Evidence for a genomic mechanism of action for progesterone receptor membrane component-1*. Steroids, 2012. **77**(10): p. 1007-12.
138. Neubauer, H., et al., *Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(5): p. R85.
139. Neubauer, H., et al., *Membrane-initiated effects of progesterone on proliferation and activation of VEGF in breast cancer cells*. Climacteric, 2009. **12**(3): p. 230-9.
140. Ghosh, K., et al., *Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p*. Biochemistry, 2005. **44**(50): p. 16729-36.
141. Crudden, G., R.E. Chitti, and R.J. Craven, *Hpr6 (heme-1 domain protein) regulates the susceptibility of cancer cells to chemotherapeutic drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(1): p. 448-55.
142. Schenkman, J.B. and I. Jansson, *The many roles of cytochrome b5*. Pharmacol Ther, 2003. **97**(2): p. 139-52.
143. Min, L., et al., *Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (inner zone antigen) and its role in the steroidogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **215**(1-2): p. 143-8.
144. Hughes, A.L., et al., *Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes*. Cell Metab, 2007. **5**(2): p. 143-9.
145. Hand, R.A., et al., *Saccharomyces cerevisiae Dap1p, a novel DNA damage response protein related to the mammalian membrane-associated progesterone receptor*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(2): p. 306-17.
146. Mallory, J.C., et al., *Dap1p, a heme-binding protein that regulates the cytochrome P450 protein Erg11p/Cyp51p in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1669-79.
147. Craven, R.J., J.C. Mallory, and R.A. Hand, *Regulation of iron homeostasis mediated by the heme-binding protein Dap1 (damage resistance protein 1) via the P450 protein Erg11/Cyp51*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36543-51.
148. Thompson, A.M., et al., *Measurement of the heme affinity for yeast dap1p, and its importance in cellular function*. Biochemistry, 2007. **46**(50): p. 14629-37.
149. Engmann, L., et al., *Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(12): p. 4962-8.
150. Dressman, H.K., et al., *Gene expression profiles of multiple breast cancer phenotypes and response to neoadjuvant chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 819-26.
151. Wei, S.H., et al., *Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(9): p. 2788-94.
152. Rohe, H.J., et al., *PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding*. Pharmacol Ther, 2009. **121**(1): p. 14-9.

153. Peluso, J.J., et al., *Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(5): p. 1592-9.
154. Meyer, C., et al., *Are high-affinity progesterone binding site(s) from porcine liver microsomes members of the sigma receptor family?* Eur J Pharmacol, 1998. **347**(2-3): p. 293-9.
155. Nilsson, E.E., J. Stanfield, and M.K. Skinner, *Interactions between progesterone and tumor necrosis factor-alpha in the regulation of primordial follicle assembly*. Reproduction, 2006. **132**(6): p. 877-886.
156. Cai, Z.L. and C. Stocco, *Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5522-5532.
157. Ace, C.I. and W.C. Okulicz, *Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 54.
158. Mallory, J.C., et al., *A novel group of genes regulates susceptibility to antineoplastic drugs in highly tumorigenic breast cancer cells*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(6): p. 1747-56.
159. Neubauer, H., et al., *Breast cancer proteomics by laser capture microdissection, sample pooling, 54-cm IPG IEF, and differential iodine radioisotope detection*. Electrophoresis, 2006. **27**(9): p. 1840-52.
160. Neubauer, H., et al., *Proteomic expression profiling of breast cancer*. Recent Results Cancer Res, 2007. **176**: p. 89-120.
161. *Gynäkologie und Geburtshilfe : Gynäkologische und geburtshilfliche Eingriffe*, in *Gynäkologie und Geburtshilfe ; DVD*, B. Schauf and D. Wallwiener, Editors. 2005, Schattauer: Stuttgart.
162. Bafaloukos, D., *Neo-adjuvant therapy in breast cancer*. Ann Oncol, 2005. **16 Suppl 2**: p. ii174-81.
163. *Mammakarzinom : Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 3., überarb. Aufl. ed. Schriftenreihe Therapieempfehlungen des ITZ Tübingen, ed. M. Haen. 2003, Tübingen: Interdisziplinäres Tumorzentrum, ITZ. 47 S.
164. Guarneri, V. and P.F. Conte, *The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004. **31 Suppl 1**: p. S149-61.
165. DeSombre, E.R., et al., *Special report. Steroid receptors in breast cancer*. N Engl J Med, 1979. **301**(18): p. 1011-2.
166. McGuire, W.L., *Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy*. Semin Oncol, 1978. **5**(4): p. 428-33.
167. Wurster, M.K.F., *Expressionsanalyse von Hormonrezeptor-Isoformen bei neoadjuvant behandelten Mammakarzinom-Patientinnen*. 2009. p. Online-Ressource.
168. Sinn, H.P., et al., *[Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy]*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 1994. **54**(10): p. 552-8.
169. Moch, H., et al., *Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology?* Adv Anat Pathol, 2001. **8**(1): p. 14-20.

170. Bubendorf, L., et al., *Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies*. J Pathol, 2001. **195**(1): p. 72-9.
171. Kallioniemi, O.P., et al., *Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 657-62.
172. Nocito, A., et al., *Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research*. Int J Cancer, 2001. **94**(1): p. 1-5.
173. Milanes-Yearsley, M., et al., *Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups*. Mod Pathol, 2002. **15**(12): p. 1366-73.
174. Mirlacher M, S.M., "Gewebe-Chips" für die molekulare Herstellung von Tumoren. Histo Journal 2000, 2000(19): p. 7-18.
175. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
176. Eissele, R., et al., *Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man*. Eur J Clin Invest, 1992. **22**(4): p. 283-91.
177. Ganten, D., et al., *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen: mit 36 Tabellen*. 2006: Springer.
178. Burry, R.W., *Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research*. 2010: Springer New York. 1.
179. Mawrin, C., et al., *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2013: Thieme.
180. Remmele, W. and H.E. Stegner, [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
181. Wurster, M., et al., *Evaluation of ERalpha, PR and ERbeta isoforms in neoadjuvant treated breast cancer*. Oncol Rep, 2010. **24**(3): p. 653-9.
182. *Sexualhormone und Altern*, ed. J. Greeve and J. Bichler. 1987, Hamburg: J. Greeve. 135.
183. Hunt, C.M., et al., *Cytological grading of breast carcinoma--a feasible proposition?* Cytopathology, 1990. **1**(5): p. 287-95.
184. Neubauer, H., *Bedeutung der Progesteronrezeptor-Membrankomponente-1 (PGRMC1) als prognostischer und prädiktiver Marker beim Mamma- und Ovarialkarzinom*. 2011. p. XII, 172.
185. Neubauer, H., et al., *Overexpression of progesterone receptor membrane component 1: possible mechanism for increased breast cancer risk with norethisterone in hormone therapy*. Menopause, 2012.
186. Pru, J.K. and N.C. Clark, *PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 168.
187. Ji, S., A. Wu, and H. Yang, [Expression of progesterone receptor membrane component-1 is associated with the malignant phenotypes of breast cancer]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2012. **32**(5): p. 635-8.
188. Ishiwata, K., et al., *Age-related changes of the binding of [H-3]SA4503 to sigma(1) receptors in the rat brain*. Annals of Nuclear Medicine, 2003. **17**(1): p. 73-77.

189. Causey, M.W., et al., *Transcriptional analysis of novel hormone receptors PGRMC1 and PGRMC2 as potential biomarkers of breast adenocarcinoma staging*. J Surg Res, 2011. **171**(2): p. 615-22.
190. Peluso, J.J., *Non-genomic actions of progesterone in the normal and neoplastic mammalian ovary*. Semin Reprod Med, 2007. **25**(3): p. 198-207.
191. Peluso, J.J., et al., *Progesterone receptor membrane component-1 regulates the development and Cisplatin sensitivity of human ovarian tumors in athymic nude mice*. Endocrinology, 2009. **150**(11): p. 4846-54.
192. Ruan, X., et al., *Progestogens and membrane-initiated effects on the proliferation of human breast cancer cells*. Climacteric, 2012. **15**(5): p. 467-72.
193. Ruan, X., et al., *Nomegestrol acetate sequentially or continuously combined to estradiol did not negatively affect membrane-receptor associated progestogenic effects in human breast cancer cells*. Gynecol Endocrinol, 2012. **28**(11): p. 863-6.
194. Peluso, J.J., et al., *Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein interacts with progesterone receptor membrane component 1 to regulate progesterone's ability to maintain the viability of spontaneously immortalized granulosa cells and rat granulosa cells*. Biol Reprod, 2013. **88**(1): p. 20.
195. Lofgren, L., et al., *Expression of sex steroid receptor subtypes in normal and malignant breast tissue - a pilot study in postmenopausal women*. Acta Oncol, 2006. **45**(1): p. 54-60.
196. Maehle, B.O., et al., *Estrogen receptor beta--an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer?* APMIS, 2009. **117**(9): p. 644-50.
197. Gohno, T., et al., *Individual transcriptional activity of estrogen receptors in primary breast cancer and its clinical significance*. Cancer Med, 2012. **1**(3): p. 328-37.
198. Lyng, M.B., et al., *Gene Expression Signatures That Predict Outcome of Tamoxifen-Treated Estrogen Receptor-Positive, High-Risk, Primary Breast Cancer Patients: A DBCG Study*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54078.
199. Zhang, Y., et al., *May progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) predict the risk of breast cancer?* Gynecol Endocrinol, 2015: p. 1-3.
200. Friel, A.M., et al., *Progesterone receptor membrane component 1 deficiency attenuates growth while promoting chemosensitivity of human endometrial xenograft tumors*. Cancer Lett, 2015. **356**(2 Pt B): p. 434-42.
201. Stanczyk, F.Z., et al., *Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects*. Endocr Rev, 2013. **34**(2): p. 171-208.

## 7. Anhang

**Tab. 11:** IRS der Hormonrezeptoren nach klinischen Parametern vor neoadjuvanter Therapie

	ER $\alpha$	ER $\beta$ t	ER $\beta$ 1	ER $\beta$ 2	PR
Alle	8,00 (0-12)	12,00 (0-12)	8,0 (0-12)	4,00 (1-12)	4,00 (0-12)
Gr.1	1,50 (0-12)	12,00 (2-12)	8,0 (2-12)	4,00 (1-12)	3,00 (0-12)
Gr.2	8,0 (0-12)	8,00 (2-12)	4,0 (2-12)	4,00 (3-12)	6,00 (1-12)
Gr.3	12,00 (0-12)	12,00 (0-12)	8,0 (0-12)	4,00 (1-12)	6,00 (0-12)
Gr.4	12,00 (8-12)	12,00(3-12)	8,0 (4-12)	8,00 (3-12)	4,00 (2-12)
M1	0,50 (0-12)	8,00 (2-12)	8,0 (2-12)	4,00 (1-8)	3,50 (0-12)
M2	7,00 (0-12)	12,00 (2-12)	8,0 (4-12)	8,00 (4-12)	4,00 (0-12)
M3	12,00 (0-12)	12,00 (0-12)	8,0 (0-12)	4,00 (1-12)	4,00 (0-12)
H1	8,00 (0-12)	12,00 (0-12)	8,0 (0-12)	4,00 (1-12)	4,00 (0-12)
H2	12,00 (6-12)	12,00 (4-12)	8,0 (4-12)	8,00 (2-12)	4,00 (1-12)
H3	8,00 (0-12)	12,00 (2-12)	6,0 (2-12)	6,00 (3-12)	6,00 (0-8)
H4	6,00 (0-12)	5,00 (4-6)	3,5 (3-4)	6,00 (4-8)	4,50 (3-6)
G1	10,00 (8-12)	12,00 (12)	8,0 (8)	8,00 (8)	12,00 (12)
G2	9,00 (0-12)	12,00 (2-12)	8,0 (0-12)	8,00 (2-12)	6,00 (1-12)
G3	1,00 (0-12)	8,00 (0-12)	6,0 (0-12)	3,00 (1-12)	3,00 (0-12)

Abkürzungen: IRS = immunreaktiver Score; ER $\alpha$  = Östrogenrezeptor alpha, ER $\beta$ t = Gesamt-Östrogenrezeptor beta, ER $\beta$ 1 = Östrogenrezeptor beta Isoform 1, ER $\beta$ 2 = Östrogenrezeptor beta Isoform 2, PR = Progesteronrezeptor, alle = Gesamtgruppe, Gr.1 = Alter von 30 bis 49 Jahren, Gr.2 = Alter von 50 bis 50 Jahren, Gr.3 = Alter von 60 bis 69 Jahren, Gr.4 = Alter über 70 Jahre, M1 = prämenopausaler Status, M2 = perimenopausaler Status, M3 = postmenopausaler Status, H1 = invasiv duktales Karzinom, H2 = invasiv lobuläres Karzinom, H3 = invasiv duktolobuläres Karzinom, H4 = muzinöses Karzinom, G1 = gut differenzierter Tumor, G2 = mäßig differenzierter Tumor, G3 = schlecht differenzierter Tumor

\* Werte sind jeweils IRS-Werte und als Median mit Minimum und Maximum angegeben.



**Tab. 12:** IRS der Hormonrezeptoren nach klinischen Parametern nach neoadjuvanter Therapie

	ER $\alpha$	ER $\beta$ t	ER $\beta$ 1	ER $\beta$ 2	PR
Alle	4,00 (0-12)	8,00 (1-12)	4,0 (0-12)	4,00 (0-12)	2,00 (0,12)
Gr.1	1,00 (0-12)	8,00 (4-12)	4,0 (0-8)	4,00 (0-8)	0,00 (0-8)
Gr.2	6,00 (0-12)	12,00 (1-12)	4,0 (3-8)	4,00 (3-12)	2,00 (1-12)
Gr.3	4,00 (0-12)	8,00 (3-12)	4,0 (2-8)	4,00 (2-12)	2,00 (0-8)
Gr.4	8,00 (2-12)	10,00 (4-12)	4,0 (2-12)	4,00 (2-12)	1,05 (0-6)
M1	1,00 (0-12)	8,00 (4-12)	4,0 (0-8)	4,00 (0-8)	1,00 (0-8)
M2	2,50 (0-12)	10,00 (4-12)	3,0 (3-8)	6,00 (4-8)	1,05 (0-8)
M3	8,00 (0-12)	8,50 (1-12)	4,0 (2-12)	4,00 (2-12)	2,00 (0-12)
H1	3,50 (0-12)	8,00 (1-12)	4,0 (0-12)	4,00 (0-12)	2,00 (0-8)
H2	6,00 (2-12)	12,00 (4-12)	4,0 (3-8)	8,00 (4-12)	2,00 (0-8)
H3	8,00 (0-12)	10,00 (4-12)	8,00 (2-8)	7,00 (4-12)	2,00 (0-12)
H4	6,00 (0-12)	10,00 (8-12)	4,50 (3-6)	4,00 (4)	1,00 (0-2)
G1	8,00 (4-12)	12,00 (12)	8,00 (4-12)	4,00 (4)	3,00 (2-4)
G2	8,00 (0-12)	9,00 (1-12)	4,00 (2-8)	8,00 (0-12)	2,00 (0-12)
G3	0,00 (0-12)	7,00 (4-12)	4,00 (0-8)	4,00 (2-8)	0,00 (0-8)

Abkürzungen: IRS = immunreaktiver Score; ER $\alpha$  = Östrogenrezeptor alpha, ER $\beta$ t = Gesamt-Östrogenrezeptor beta, ER $\beta$ 1 = Östrogenrezeptor beta Isoform 1, ER $\beta$ 2 = Östrogenrezeptor beta Isoform 2, PR = Progesteronrezeptor, alle = Gesamtgruppe, Gr.1 = Alter von 30 bis 49 Jahren, Gr.2 = Alter von 50 bis 50 Jahren, Gr.3 = Alter von 60 bis 69 Jahren, Gr.4 = Alter über 70 Jahre, M1 = prämenopausaler Status, M2 = perimenopausaler Status, M3 = postmenopausaler Status, H1 = invasiv duktales Karzinom, H2 = invasiv lobuläres Karzinom, H3 = invasiv duktolobuläres Karzinom, H4 = muzinöses Karzinom, G1 = gut differenzierter Tumor, G2 = mäßig differenzierter Tumor, G3 = schlecht differenzierter Tumor

\* Werte sind jeweils IRS-Werte und als Median mit Minimum und Maximum angegeben.

**Tab. 13:** IRS von HER2/neu und Ki-67 nach klinischen Parametern vor neoadjuvanter Therapie

	HER2/neu	Ki-67
Alle	1,00 (0-3)	15,00 (0-60)
Gr.1	1,00 (0-3)	20,00 (2-40)
Gr.2	1,00 (0-3)	20,00 (2-50)
Gr.3	1,00 (0-3)	12,50 (2-60)
Gr.4	1,00 (0-3)	8,50 (0-40)
M1	1,00 (0-3)	20,00 (2-40)
M2	1,50 (0-3)	2,00 (2-30)
M3	1,00 (0-3)	15,00 (0-60)
H1	1,00 (0-3)	15,00 (2-60)
H2	1,00 (0-3)	6,00 (0-35)
H3	1,00 (0-3)	15,00 (2-40)
H4	3,00 (3)	23,50 (7-40)
G1	2,00 (2)	6,00 (2-10)
G2	1,00 (0-3)	15,00 (0-50)
G3	1,00 (0-3)	20,00 (5-60)

Abkürzungen: IRS = immunreaktiver Score; HER2/neu = human epidermal growth-factor receptor 2, Ki-67 = Antigen Ki-67, alle = Gesamtgruppe, Gr.1 = Alter von 30 bis 49 Jahren, Gr.2 = Alter von 50 bis 59 Jahren, Gr.3 = Alter von 60 bis 69 Jahren, Gr.4 = Alter über 70 Jahre, M1 = prämenopausaler Status, M2 = perimenopausaler Status, M3 = postmenopausaler Status, H1 = invasiv duktales Karzinom, H2 = invasiv lobuläres Karzinom, H3 = invasiv duktolobuläres Karzinom, H4 = muzinöses Karzinom, G1 = gut differenzierter Tumor, G2 = mäßig differenzierter Tumor, G3 = schlecht differenzierter Tumor

\* Werte sind jeweils IRS-Werte und als Median mit Minimum und Maximum angegeben.

**Tab. 14:** IRS von HER2/neu und Ki-67 nach klinischen Parametern nach neoadjuvanter Therapie

	HER2/neu	Ki-67
Alle	1,00 (0-3)	5,00 (0-70)
Gr.1	1,00 (0-3)	8,50 (0-50)
Gr.2	1,00 (0-3)	5,00 (0-70)
Gr.3	1,00 (0-3)	5,00 (0-60)
Gr.4	1,00 (0-2)	1,00 (0-30)
M1	1,00 (0-3)	10,00 (0.50)
M2	0,50 (0-3)	5,00 (0-15)
M3	1,00 (0-3)	4,00 (0-70)
H1	1,00 (0-3)	5,00 (0-70)
H2	1,00 (0-2)	3,00 (0-10)
H3	1,00 (0-3)	10,00 (0-30)
H4	1,50 (0-3)	3,50 (0-7)
G1	0,50 (0-1)	0,00 (0)
G2	1,00 (0-3)	3,00 (0-70)
G3	0,00 (0-3)	10,00 (0-60)

Abkürzungen: IRS = immunreaktiver Score; HER2/neu = human epidermal growth-factor receptor 2, Ki-67 = Antigen Ki-67, alle = Gesamtgruppe, Gr.1 = Alter von 30 bis 49 Jahren, Gr.2 = Alter von 50 bis 50 Jahren, Gr.3 = Alter von 60 bis 69 Jahren, Gr.4 = Alter über 70 Jahre, M1 = prämenopausaler Status, M2 = perimenopausaler Status, M3 = postmenopausaler Status, H1 = invasiv duktales Karzinom, H2 = invasiv lobuläres Karzinom, H3 = invasiv duktolobuläres Karzinom, H4 = muzinöses Karzinom, G1 = gut differenzierter Tumor, G2 = mäßig differenzierter Tumor, G3 = schlecht differenzierter Tumor

\* Werte sind jeweils IRS-Werte und als Median mit Minimum und Maximum angegeben

## Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde von Herrn PD Dr. rer. nat. Hans Neubauer (H.N.) konzipiert, er hat darüber hinaus die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Die Färbeversuche zur Darstellung von PGRMC1 und pPGRMC1 wurden von Isabel Friederike Wurster (I.W.) selbstständig durchgeführt. Die Entwicklung des immunreaktiven Scores wurde von I.W. unter fach-pathologischer Supervision von Dr. med. Ulrich Vogel vorgenommen. Die statistische Auswertung wurde von I.W. durchgeführt und die Richtigkeit der Berechnungen von Dr. biol. hum. M.A. Christoph Meisner überprüft. Die Daten-Recherche und kritische Diskussion der Ergebnisse wurde von I. W. unter Supervision von H.N. und Prof. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Harald Seeger durchgeführt.

Die zusätzlich verwendeten Färbeergebnisse von ER $\alpha$ , ER $\beta$ t, ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2, PR, Ki-67 und HER2/neu wurden von Dr. med. Martin Kurt Friedrich Wurster (M.W.) durchgeführt und freundlicherweise nach Rücksprache mit demselben durch H.N. zur Verfügung gestellt.

## Danksagung

Herzlichen Dank an Prof. Dr. med. Diethelm Wallwiener für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Universitätsfrauenklinik Tübingen erstellen zu können.

Mein besonderer und großer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer für das Überlassen des Themas, die große Unterstützung bei diesem Projekt, die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit sowie das große wissenschaftliche Interesse an dieser Arbeit.

Für die Hilfe bei der Auswertung der TMA bedanke ich mich herzlich bei Dr. med. Ulrich Vogel vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen.

Danke an Herrn Dr. Christoph Meisner vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Zudem ein großer Dank an Martin Wurster, der mir eine große Hilfe bei der Einarbeitung war, und an den ich immer wieder meine Fragen richten konnte.

Weiter bedanke ich mich bei Gordian Adam, Ute Hilcher und Beate Kootz für die großartige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Familie, die all meine Höhen und Tiefen in dieser Zeit mit mir durchgestanden haben. Vielen Dank, dass Ihr mich immer unterstützt und so viel Rücksicht genommen habt.