

Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

aus der Klinik für Gynäkologie & Hochschulambulanz

(Direktor: Prof. Dr. med. Achim Schneider MPH)

Endometriosezentrum

(Prof. Dr. med. Dr. phil. Andreas D. Ebert)

## **Die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren HER-3 und HER-4 in peritonealen Endometrioseläsionen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

medizinischen Doktorwürde

der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Eilika Müller

aus Lahn-Wetzlar

## II

Referent: Prof. Dr. med. Dr. phil. Andreas D. Ebert

Korreferent: Prof. Dr. med. Gilbert Schönfelder

Gedruckt mit Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 07.12.2007

## Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Endometriose.....	2
1.1.1 Definition.....	2
1.1.2 Häufigkeit.....	2
1.1.3 Symptomatik.....	2
1.1.4 Risikofaktoren.....	3
1.1.5 Makro- und mikroskopisches Erscheinungsbild.....	4
1.1.6 Einteilung und Klassifikation.....	5
1.1.7 Pathogenese.....	6
1.1.8 Diagnostik und Therapie.....	7
1.1.8.1 Diagnostik.....	7
1.1.8.2 Therapie.....	8
1.1.8.2.1 Operative Therapie.....	8
1.1.8.2.2 Medikamentöse Therapie.....	9
1.1.8.2.3 Neue Therapieansätze.....	12
1.1.9 Endometriose und Infertilität.....	13
1.1.9.1 Medikamentöse Therapie.....	14
1.1.9.2 Operative Therapie.....	14
1.1.9.3 Assistierte Reproduktion.....	14
1.2 Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren.....	15
1.2.1 Biologische Funktionen.....	15
1.2.2 Expression in verschiedenen Geweben.....	17
1.2.3 Struktur der Rezeptoren.....	17
1.2.4 Aktivierung und Signalweitergabe.....	18
1.2.5 Assoziation mit Tumorerkrankungen.....	21
1.3. Stand der Forschung.....	22

1.3.1 Wachstumsfaktoren in Endometrium, Tumoren des Endometriums und Endometriose .....	22
1.3.2 Charakteristika immunhistochemischer Färbungen von HER-3 und HER-4	24
2. Fragestellung .....	26
3. Material und Methoden .....	27
3.1 Altersverteilung, Stadieneinteilung und Symptomatik der untersuchten Patientinnen .....	27
3.2 Probengewinnung .....	28
3.2.1 Präparate für immunhistochemische Färbungen .....	28
3.2.2 Zell-Linien und Primärkulturen für Western-Blot-Analyse .....	28
3.3 Methoden .....	29
3.3.1 Immunhistochemische Färbung .....	29
3.3.1.1 Anfertigung von Gewebeschnitten .....	29
3.3.1.2 Entparaffinierung und Denaturierung .....	29
3.3.1.3 Absättigung unspezifischer Bindungen .....	29
3.3.1.4 Antikörper .....	30
3.3.1.5 Überprüfung der Spezifität der Färbung .....	31
3.3.2 Western-Blot-Technik .....	31
3.3.2.1 Zellkultur .....	31
3.3.2.2 Zellyse .....	32
3.3.2.3 Proteinbestimmung .....	32
3.3.2.4 Auftragung auf das Gel und Proteintrennung .....	33
3.3.2.5 Transfer auf die Nitrozellulosemembran .....	33
3.3.2.6 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen .....	34
3.3.2.7 Antikörper .....	34
3.3.2.8 Entwicklung der Nitrozellulosemembran .....	34
3.3.2.9 Kontrolle mit Aktinantikörpern .....	35
3.4 Auswertung und Statistik .....	35

3.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	35
3.4.2 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	36
3.4.3 Auswertung der Western-Blots .....	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen .....	38
4.1.1 HER-3-Immunreaktion.....	38
4.1.1.1 HER-3-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen.....	39
4.1.1.1.1 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und der <i>Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und Wachstumsfraktion Ki67</i> .....	40
4.1.1.1.2 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und dem <i>rASRM-Stadium der untersuchten Patientinnen</i> .....	41
4.1.1.1.3 Überprüfung einer Korrelation zwischen HER-3-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und der <i>Parität der Patientinnen</i> .....	42
4.1.1.1.4 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und der <i>Symptomatik der Patientinnen</i> .....	42
4.1.1.2 HER-3-Immunreaktion in Stromazellen.....	45
4.1.1.2.1 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in Stromazellen und der <i>Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und Wachstumsfraktion Ki67</i> .....	46
4.1.1.2.2 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in Stromazellen und dem <i>rASRM-Stadium der untersuchten Patientinnen</i> ...	47
4.1.1.2.3 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in Stromazellen und der <i>Parität der Patientinnen</i> .....	48
4.1.1.2.4 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in Stromazellen und der <i>Symptomatik der Patientinnen</i> .....	48
4.1.1.3 HER-3-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen.....	51
4.1.1.3.1 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und der <i>Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und Wachstumsfraktion Ki67</i> .....	52
4.1.1.3.2 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und dem <i>rASRM-Stadium der untersuchten Patientinnen</i> .....	53

4.1.1.3.3 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und der <i>Parität der Patientinnen</i> .....	53
4.1.1.3.4 Überprüfung einer Korrelation zwischen der HER-3-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und der <i>Symptomatik der Patientinnen</i>	54
4.1.1.4 Vergleich der HER-3-Immunreaktion in Drüsen-, Stroma- und muskelzellähnlichen Stromazellen.....	56
4.1.2 HER-4-Färbungen .....	58
4.1.2.1 HER-4-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen.....	58
4.1.2.1.1 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und der <i>Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und Wachstumsfraktion Ki67</i> .....	59
4.1.2.1.2 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und dem <i>rASRM-Stadium der untersuchten Patientinnen</i> .....	61
4.1.2.1.3 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und der <i>Parität der Patientinnen</i> .....	62
4.1.2.1.4 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen und der <i>Symptomatik der Patientinnen</i> .....	62
4.1.2.1.5 Immunreaktion von HER-4 im Kern in epithelialen Drüsenzellen ...	64
4.1.2.2 HER-4-Immunreaktion in Stromazellen.....	65
4.1.2.2.1 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in Stromazellen und der <i>Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und Wachstumsfraktion Ki67</i> .....	66
4.1.2.2.2 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in Stromazellen und dem <i>rASRM-Stadium der untersuchten Patientinnen</i> .....	67
4.1.2.2.3 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in Stromazellen und der <i>Parität der Patientinnen</i> .....	68
4.1.2.2.4 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in Stromazellen und der <i>Symptomatik der Patientinnen</i> .....	68
4.1.2.2.5 Nukleäre Immunreaktion von HER-4 in Stromazellen .....	70
4.1.2.3 HER-4-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen.....	71

4.1.2.3.1 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und der <i>Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und Wachstumsfraktion Ki67</i> .....	72
4.1.2.3.2 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und dem <i>rASRM-Stadium der untersuchten Patientinnen</i> .....	73
4.1.2.3.3 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und der <i>Parität der Patientinnen</i> .....	74
4.1.2.3.4 Überprüfung einer Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HER-4-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und der <i>Symptomatik der Patientinnen</i> .....	74
4.1.2.3.5 Nukleäre Immunreaktion von HER-4 in muskelzellähnlichen Stromazellen .....	76
4.1.2.4 Vergleich der HER-4-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, Stroma- und muskelzellähnlichen Stromazellen. ....	77
4.1.2.4.1 Zytoplasmatische HER-4-Immunreaktion .....	77
4.1.2.4.2 Nukleäre HER-4-Immunreaktion .....	78
4.1.3 Vergleich von HER-3- und HER-4-Immunreaktion in Endometrioseherden	79
4.1.3.1 Vergleich von HER-3- und HER-4-Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen .....	79
4.1.3.2 Vergleich von HER-3- und HER-4-Immunreaktion in Stromazellen .....	79
4.1.3.3 Vergleich von HER-3- und HER-4-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen .....	80
4.1.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Muskelaktin .....	80
4.2 Ergebnisse der Western-Blot-Analyse .....	81
5. Diskussion .....	83
6. Zusammenfassung .....	97
7. Literaturverzeichnis .....	100
8. Abbildungsverzeichnis .....	112
9. Danksagung .....	114

**Abkürzungsverzeichnis**

bzw.	=	beziehungsweise
CO <sub>2</sub>	=	Kohlendioxid
COX	=	Cyclooxygenase
EGF	=	Epidermal Growth Factor
EGFR	=	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	=	Östrogenrezeptor
Erk	=	extrazellulär regulierte Kinase
FSH	=	Follikel stimulierendes Hormon
GIFT	=	Gamete Intrafallopian Transfer
GnRH	=	Gonadotropin Releasing Hormon
HB-EGF	=	Heparin-binding Epidermal Growth Factor
HER	=	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IUI	=	Intrauterine Insemination
IVF	=	In-vitro-Fertilisation
Ki67	=	Wachstumsfraktion Ki67
LH	=	Luteinisierendes Hormon
MAPK	=	Mitogen Activated Protein Kinase
PR	=	Progesteronrezeptor
RANTES	=	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
rASRM	=	verbesserte (revised) Stadieneinteilung nach der American Society for Reproductive Medicine
RTK	=	Tyrosinkinase-rezeptor
STAT	=	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF- $\alpha$	=	Transforming Growth Factor Alpha
TNF- $\alpha$	=	Tumor Necrosis Factor Alpha



## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: laparoskopisches Bild einer peritonealen Endometriose mit schwarzem, rotem und weißem Herd (links) und einer ovariellen Endometriosezyste (rechts) (57) .....	8
Abbildung 2: Struktur des EGF-Rezeptors .....	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Rezeptoraktivierung, Dimerbildung, Internalisierung und Verdauung bzw. Recycling .....	20
Abbildung 4: HER-3-Immunreaktion in Endometrioseläsionen. Alle in 400x Vergrößerung Bild 1: keine Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, schwache Immunreaktion in Stromazellen Bild 2: schwache Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, schwache Immunreaktion in Stromazellen, schwache Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen (Pfeile) Bild 3: mittlere Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, keine Immunreaktion in Stromazellen, schwache Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen (Pfeile) Bild 4: starke Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, keine Immunreaktion in Stromazellen, schwache Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen (Pfeile) .....	39
Abbildung 5: Die Graphik zeigt die Verteilung der HER-3-Immunreaktion im Zytoplasma von Drüsenepithelzellen, das Bild ein Beispiel einer starken HER-3-Immunreaktion in den Drüsenzellen. ....	40
Abbildung 6: Die Graphik zeigt die Verteilung der HER-3-Immunreaktion im Zytoplasma von Stromazellen, das Bild (400x) zeigt ein Beispiel einer mittleren HER-3-Immunreaktion in den Stromazellen. ....	45
Abbildung 7: Die Graphik zeigt die Verteilung der HER-3-Immunreaktion im Zytoplasma von muskelzellähnlichen Stromazellen, das Bild (400x) zeigt im rechten unteren Bildabschnitt ein Beispiel starker HER-3-Immunreaktion in den muskelzellähnlichen Stromazellen. ....	51
Abbildung 8: HER-4-Immunreaktion in Endometrioseläsionen und Beispiele der gegebenen Bewertungen der zytoplasmatischen Anfärbung (alle in 400x Vergrößerung). Bild 1: keine Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, keine Immunreaktion in Stromazellen Bild 2: schwache Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, keine Immunreaktion in Stromazellen Bild 3: mittlere Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, keine Immunreaktion in Stromazellen Bild 4: mittlere Immunreaktion in epithelialen Drüsenzellen, keine Immunreaktion in Stromazellen, schwache Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen (Pfeile) .....	58
Abbildung 9: Die Graphik zeigt die Verteilung der HER-4-Immunreaktion im Zytoplasma von epithelialen Drüsenzellen, das Bild (400x) zeigt ein Beispiel einer mittleren HER-4-Immunreaktion im Zytoplasma der Drüsenzellen. ....	59
Abbildung 10: HER-4-Immunreaktion in Drüsenepithelzellkernen .....	65
Abbildung 11: Die Graphik zeigt die Verteilung der HER-4-Immunreaktion im Zytoplasma von Stromazellen, das Bild (400x) zeigt das Beispiel einer schwachen HER-4-Immunreaktion in den Stromazellen. ....	65
Abbildung 12: HER-4-Immunreaktion in Stromazellkernen.....	71
Abbildung 13: Die Graphik zeigt die Verteilung der HER-4-Immunreaktion im Zytoplasma von muskelzellähnlichen Stromazellen, das Bild das Beispiel einer schwachen HER-4-Immunreaktion in den muskelzellähnlichen Stromazellen.....	71
Abbildung 14: HER-4-Immunreaktion in Kernen von muskelzellähnlichen Stromazellen.....	77
Abbildung 15: Immunhistochemische Anfärbung von Muskelaktin in den muskelzellähnlichen Stromazellen in Endometriosegewebe (100x).....	81

Abbildung 16: Endometriosezellen (Zelllinie 12Z und Primärkultur aus Operationsmaterial (Pat 2)) wurden jeweils über 24 bzw. 48 Stunden in normalem (89% DMEM ohne Phenolrot, 10% fetales Kälberserum und 1% Antibiotika) bzw. in hormonfreiem (89% DMEM ohne Phenolrot, 10% steroidfreies Serum und 1% Antibiotika) Medium kultiviert. Die Dichte der Zellen zum Zeitpunkt der Versuche war sub-konvergent (80% Konvergenz). Zahl der Versuche n = 3, mit 3 Wiederholungen in unabhängigen Versuchsansätzen.....82

Abbildung 17: smooth-muscle-Aktin, HER-3 und HER-4 in der gleichen Probe einer Patientin, die muskelzellähnlichen Zellen befinden sich jeweils im linken unteren Bildabschnitt Bild 1: immunhistochemische Färbung von smooth-muscle-Aktin (400x) Bild 2: immunhistochemische Färbung von HER-4 (400x) Bild 3: immunhistochemische Färbung von HER-3 (400x) .....88

## 9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. Andreas D. Ebert, für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung bei Ausarbeitung und Interpretation der gewonnenen Daten. Er ermöglichte es mir auch, meine Ergebnisse auf dem Deutschen Endometriosekongress 2003 in Westerstede zu präsentieren.

Mein herzlichster Dank gilt allen Mitarbeiterinnen des dem Endometriosezentrum angegliederten Labors. Ich danke Frau Claudia Beutler für ihre große Hilfe bei der praktischen Arbeit, Frau Dr. med. Julia Buchwald für die erste praktische Einführung in die Immunhistochemie, Frau Dr. med. Julia Bartley und Frau Dr. med. Sylvia Mechsner für die vielen helfenden Hinweise bei Durchführung und Auswertung meiner Versuche und Frau Johanna Thode für die ausdauernde organisatorische Unterstützung „vor Ort“ seit meinem Wegzug aus Berlin.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz und Herrn Dr. Andreas Zeitvogel danke ich für die Bereitstellung der immortalisierten Endometriosezelllinie 12Z.

Herrn Prof. Dr. med. H. Stein, Herrn Dr. med. C. Loddenkemper, Herrn Prof. Dr. med. I. Anagnostopoulos und allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Charité Universitätsklinikums Benjamin Franklin möchte ich für die Verarbeitung des Operationsmaterials zu Paraffinblöcken und die sehr hilfreiche und zeitsparende Übernahme der Bestimmung der Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression danken.

Herrn Prof. Dr. med. G. Schönfelder danke ich für die konkreten und kritischen Hinweise, die er mir nach der ersten Durchsicht der Arbeit gegeben hat.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Bruder Tjark Müller und meiner Mutter Ursula Müller für die unermüdliche Hilfe bei der Erstellung der Skizzen, der Bewältigung unendlicher Konflikte mit dem Textverarbeitungsprogramm, der Ausarbeitung einer in Form und Rechtschreibung korrekten Ausgabe der Arbeit und nicht zuletzt für die moralische Rückendeckung bei allen meinen Vorhaben, zu denen auch diese Arbeit gehört.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Erklärung

Ich, Eilika Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren HER-3 und HER-4 in peritonealen Endometrioseläsionen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift