

3. Material und Methoden

In einer retrospektiven Studie wurde mit Hilfe der Immunhistochemie und der Western-Blot-Technik die Expression von HER-3 und HER-4 in Endometriosegewebe untersucht. Dabei wurden Proben peritonealer Endometrioseherde von 62 Patientinnen verwendet, die zwischen Januar 2000 und Dezember 2002 in der Klinik für Gynäkologie & Hochschulambulanz der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, operiert worden waren. Die Proben sollten ebenfalls auf ihre Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression bzw. die Wachstumsfraktion Ki67 untersucht werden, was nicht in allen Fällen auf Grund mangelnder Gewebeproben erfolgreich war. Angaben über die Symptomatik, Parität und die rASRM-Stadieneinteilung der Patientinnen wurden aus in der Endometriosesprechstunde routinemäßig ausgefüllten Fragebögen gewonnen.

Zur Beantwortung der Fragestellungen (vergleiche Kapitel 2) wurden zunächst die immunhistochemischen Untersuchungen und die Western-Blots ausgewertet und die Immunreaktionen von HER-3 und HER-4 in peritonealem Endometriosegewebe deskriptiv erfasst und quantitativ beurteilt. Anschliessend wurde mit statistischen Methoden untersucht, ob zwischen den nachgewiesenen Immunreaktionen von HER-3 bzw. HER-4 und der Steroidrezeptorexpression, der Symptomatik und der Erkrankungsstadium ein Zusammenhang besteht.

3.1 Altersverteilung, Stadieneinteilung und Symptomatik der untersuchten Patientinnen

Die untersuchten Proben stammten von 62 Patientinnen im Alter von 21 bis 50 Jahren. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation lag bei 32,37 Jahren.

Von den 62 Patientinnen befanden sich 20 im rASRM-Stadium I (32,3 %), 16 im rASRM-Stadium II (25,8 %), 11 im rASRM-Stadium III (17,7 %) und 14 im rASRM-Stadium IV (22,6 %). Eine Patientin konnte keinem Stadium zugeordnet werden (1,6 %).

Die Häufigkeit der Endometriosesymptome bei den untersuchten Frauen wurden bereits in Tabelle 1 dargestellt. Dysmenorrhoe war mit 80,6 % das häufigste Symptom unter den Patientinnen, 72,6 % der Frauen litten unter chronischen oder rezidivierenden Unterbauchschmerzen. 48,4 % der Patientinnen gaben Schmerzen

beim Geschlechtsverkehr (Dyspareunie) an, 19,4 % empfanden Schmerzen beim Stuhlgang (Dyschezie) und 14,5 % beim Urinieren (Dysurie). 21 % der Frauen hatten zum OP-Zeitpunkt bereits ein oder mehrere Kinder geboren, 79 % waren Nullipara.

3.2 Probengewinnung

3.2.1 Präparate für immunhistochemische Färbungen

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Schnitte peritonealer Endometriose-läsionen. Dabei waren 25 Proben dem Blasenperitoneum entnommen, 15 stammten aus dem Douglasraum, 7 vom Beckenwandperitoneum, 6 befanden sich am Ligamentum sacrouterinum, 4 in der Fossa ovarica, 2 an der Tubenwand und jeweils eine Probe stammte von Vagina, Uterusvorderwand bzw. -fundus. Die Proben wurden im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Laparoskopien gewonnen und direkt nach der Entnahme in Formalin an das Institut für Pathologie am Charité Universitätsklinikum Benjamin Franklin (Leiter Prof. Dr. H. Stein) übersandt. Dort wurden sie nach der Entwässerung in Paraffin eingebettet.

Ebenfalls im Institut für Pathologie am Charité Universitätsklinikum Benjamin Franklin (Leiter Prof. Dr. H. Stein) wurden immunhistochemisch die differentiellen Expressionen von Östrogen- und Progesteronrezeptor im Epithel- und Stromagewebe untersucht. Die dabei verwendeten primären Antikörper sind in einer Verdünnung von 1:40 für den Östrogen- (Klon 1D5) bzw. 1:100 für den Progesteronrezeptor (Klon 1A6) aufgetragen worden (Antikörper von DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). Anschließend erfolgte die semiquantitative Auswertung nach dem Immunreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner. Die Proliferationsaktivität (Wachstumsfraktion Ki67) wurde mittels des monoklonalen Antikörpers MIB-1 dargestellt und semiquantitativ ausgewertet.

3.2.2 Zell-Linien und Primärkulturen für Western-Blot-Analyse

Mit der Western-Blot-Technik wurden Zellen der von peritonealen Endometriosezellen hergeleiteten, immortalisierten Zelllinie 12Z (Geschenk von A. Starzinski-Powitz und A. Zeitvogel, Uni Frankfurt) und aus Operationsmaterial gewonnene Endometriosezellen von Endometriosepatientinnen der Klinik für Gynäkologie & Hochschulambulanz Charité-Unniversitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, untersucht.

3.3 Methoden

3.3.1 Immunhistochemische Färbung

Das Prinzip der Immunhistologie beruht auf der Anfärbung der als Antigen agierenden Strukturen (in diesem Fall die Wachstumsfaktorrezeptoren) durch Kopplung mit Antikörper-Farbkomplexen. Die Anfärbung wird mikroskopisch beurteilt und als Korrelat zur Rezeptorexpression gewertet.

3.3.1.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Von den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom (HM 400R, Microm GmbH, Walldorf) 1 µm dicke Schnitte angefertigt und auf „Super Frost Plus“ – Objektträger (25x75x1mm) der Firma Menzel-Gläser gezogen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 30°C getrocknet und – falls nicht sofort weiterverarbeitet – bei 4°C aufbewahrt.

3.3.1.2 Entparaffinierung und Denaturierung

Die Schnitte wurden vor der Weiterverarbeitung zur Entfaltung der Antikörperbindungsstellen über Nacht (maximal 16 Stunden) bei 60°C inkubiert. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Objektträger folgender Prozedur unterzogen: Eintauchen der Schnitte für 5 Minuten in Xylol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland), anschließend nochmals 5 Minuten in neuem Xylol, dann 10 Minuten in Aceton (ebenfalls J.T. Baker), 10 Minuten in Aceton/Tris-Lösung (1:1) und abschließend 10 Minuten in Tris (TRIZMA-Hydrochloride + TRIZMA-Base, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Zur Denaturierung wurden die Schnitte 10 Minuten bei 95°Celsius und einem pH-Wert von 6 in 10mM Citratpuffer (Merck KGaA, Darmstadt) erwärmt und kühlten anschließend 20 Minuten darin ab.

3.3.1.3 Absättigung unspezifischer Bindungen

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mit dem Biotin Blocking System (Dako Corporation, Carpinteria, USA) behandelt, wobei Avidin und Biotin jeweils 10 Minuten einwirkten und gründlich mit Tris abgespült wurden. Anschließend wurde fetales Kälberserum (FCS) aufgetragen und wirkte für mindestens 30 Minuten ein. Das FCS wurde nicht mit Tris abgespült, sondern vor der Auftragung des ersten Antikörpers lediglich vom Objektträger abgeklopft.

3.3.1.4 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden direkt vor dem Auftragen in Eppendorfgefäßen mit Tris verdünnt und die Lösung mit einem Vortexgerät gut durchgemischt. Der optimale Verdünnungsgrad war vorher in Färbereihen mit verschiedenen Verdünnungen bestimmt worden. Um die erforderliche Gesamtmenge an Antikörperlösung abschätzen zu können, wurden pro Schnitt 100µl einkalkuliert. Als primäre Antikörper kamen vom Kaninchen gewonnene, gegen das intrazelluläre carboxyterminale Ende der Rezeptoren gerichtete polyklonale Antikörper zum Einsatz (HER-3: sc-285, Her-4: sc-283, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA). Bei den HER-3-Färbungen wirkte der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:40 für eine Stunde bei Raumtemperatur im geschlossenen Färbekasten ein. Für die HER-4-Färbungen wurde eine Verdünnung von 1:26 angesetzt, die weiteren Bedingungen waren mit denen der HER-3-Färbung identisch. Im ebenfalls gleichen Verfahren wurden an einigen der Proben auch immunhistochemische Färbungen mit einem Muskelaktin-Antikörper (smooth-muscle-actin, Santa Cruz) durchgeführt, auf die in der Diskussion eingegangen wird.

Nach der Einwirkzeit wurden die Schnitte gründlich mit Tris gespült und der sekundäre Antikörper (Biotin-AP-Conjugated-Affinity-Pure-Mouse-Anti-Rabbit-IgG, Dianova, Hamburg) aufgetragen. Dabei handelte es sich um einen gegen Kaninchen gerichteten Mausantikörper, der in einer Verdünnung von 1:400 verwendet wurde und 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirkte. Anschließend wurde wieder gründlich mit Tris gespült. Als tertiärer Antikörper kam Streptavidin-AP-Conjugate (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:400 zum Einsatz, das wiederum für 30 Minuten einwirkte. Auch hier wurde nach Ablauf der Einwirkzeit eine gründliche Spülung mit Tris vorgenommen.

Im folgenden Schritt wurden die gebundenen Antikörper mit dem Fuchsin Substrate-Chromogen System (Dako Corporation, Carpinteria, USA) angefärbt, die Einwirkzeit des aktivierten Fuchsins betrug dabei 15 Minuten und die Färbereaktion wurde mit Aqua destillata gestoppt. Im Anschluss an eine 25 Sekunden lange Gegenfärbung mit Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt), wurden die Schnitte mindestens 10 Minuten unter laufendem Wasser gespült und abschließend mit

erwärmter Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine, Merck KGaA, Darmstadt) und Deckgläsern (Menzel-Gläser) eingedeckelt.

3.3.1.5 Überprüfung der Spezifität der Färbung

Die Spezifität der Antikörper wurde mit den entsprechenden „blocking peptides“ zu den primären Antikörpern überprüft: (HER-3: c-17/sc-285 P, HER-4: c-18/sc-283 P, beide Santa Cruz, USA). Nach Verwendung von Antikörpern, die über Nacht mit ihrem „blocking peptide“ in einem Schüttler inkubiert worden waren, zeigten die Schnitte keine Anfärbung, was die Spezifität der Antikörper für HER-3 bzw. HER-4-Rezeptoren beweist. Außerdem wurde bei jedem einzelnen Färbedurchgang Plazentagewebe als Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

3.3.2 Western-Blot-Technik

Das Western-Blot-Verfahren beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinmolekülen auf Grundlage der aus der unterschiedlichen Proteingröße resultierenden unterschiedlichen elektrischen Ladung der Moleküle und der anschließenden Sichtbarmachung der Proteine durch Ankopplung von markierten spezifischen Antikörpern. Damit kann das Vorkommen bestimmter Proteine bekannter Größe (zum Beispiel von Wachstumsfaktorrezeptoren) in Zellkulturen untersucht werden.

Die Western-Blot-Versuche wurden jeweils mit 3 Wiederholungen in unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt.

3.3.2.1 Zellkultur

Bei Endometrioseoperationen in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin wurde Zellmaterial gewonnen. Es wurde direkt anschliessend mechanisch in reiskorngroße Stücke zerteilt und in einer Enzymlösung (Kollagenase A und Dispase, Roche Diagnostics, Mannheim) 4-6 Stunden bei 36°Celsius angedaut. Anschließend wurde alles mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Bio Whittaker, Verviers, Belgien) verdünnt und über einem untergeschichteten Percoll-Kissen zentrifugiert, wobei sich Zellen und erhaltene Gewebereste von Blutzellen und Debris trennten. Die Zellen wurden vorsichtig abgesaugt, wiederholt mit DMEM gewaschen, um sie von der Enzymlösung zu reinigen und anschließend in Kulturflaschen überführt. Für die Zellkultur wurde ein Medium aus DMEM mit hohem Glucosegehalt (4,5g/l), 10% fetalem Kälberserum und 1% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) hergestellt. Die

Zellkulturflaschen lagerten bei 100% Luftfeuchtigkeit, 10% CO₂-Atmosphäre und 37°Celsius. Bei 80-90% Konfluenz der Zellen erfolgte die Aufteilung in neue Flaschen.

Für die Western-Blots wurden die Zellkulturen jeweils über 24 bzw. 48 Stunden vor Versuchsbeginn verschieden vorbehandelt. Ein Teil der Zellen wurde in „normalem“ Medium gehalten, wobei nichts am oben beschriebenen Medium verändert wurde außer der Verwendung von DMEM ohne Phenolrot anstelle des ursprünglichen gefärbten DMEM (da Phenolrot östrogene Eigenschaften hat).

Ein anderer Teil der Zellen wurde in „hormonfreiem“ Medium kultiviert, bei dem spezielles steroidfreies Serum (c-c-pro GmbH, Neustadt/W.) verwendet wurde.

Die Dichte der Zellen zum Zeitpunkt der Western-Blots war subkonvergent (80%ige Konvergenz).

3.3.2.2 Zellyse

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 0,0095M, Bio Whittaker, Verviers, Belgien) gewaschen, dann wurde pro Zellflasche 1 ml Lysepuffer (M-PER = Mammalian Protein Extraction Reagent #7801, Pierce, Rockford, USA) zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lysat wurde anschließend in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverarbeitung abgenommen.

3.3.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Bicinchorinic-Acid-Methode (BCA) mit einem Kit der Firma Pierce (#23223 und #23224, Pierce, St. Louis, USA) vorgenommen. Nach 10facher Verdünnung des aus den Zellen extrahierten proteinhaltigen Lysats wurde jeweils eine definierte Menge in 10µl gelöst und in die Löcher einer Lochplatte pipettiert. Dann wurden in jedes Loch 200µl der BCA-Lösung hinzugegeben und eine halbe Stunde bei 37°Celsius inkubiert. Durch die stattfindende chemische Reaktion entstand ein lila Farbstoff, dessen Extinktion bei 550 nm im Elisa-Reader gemessen wurde. Die Extinktion einer Probe spiegelt dabei die darin vorliegenden Proteinkonzentration wieder, der absolute Wert der Proteinmenge konnte durch den Vergleich mit einer Standardkurve abgelesen werden, die mit einer vom Hersteller mitgelieferten Standardproteinlösung im gleichen Prozedere wie oben beschrieben erstellt wurde.

3.3.2.4 Auftragung auf das Gel und Proteintrennung

In jede Auftragstasche des Gels (NuPage Novex Tris-Acetate Gel, Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden 20 µg Protein enthalten in 24 µl Endvolumen (NuPage Sample Reducing Agent (10x) + NuPage LDS Sample Buffer (4x), beide von Invitrogen) aufgetragen. In der Pufferlösung ist unter anderem Glycerin enthalten, das das nötige Gewicht besitzt, um die Probe in der Tasche zu halten. In eine Tasche wurde ein Marker (Rainbow-Marker, Biosciences, Little Chalfont, UK) aufgetragen, der eine Zusammenstellung verschiedener eingefärbter Proteine definierter Größe enthält. Dieser Marker läuft mit durch den Western-Blot, wodurch man nach der Trennung einen Maßstab zur Größenbestimmung der in den eigenen Proben enthaltenen Proteine hat.

Die Gele werden senkrecht in den Laufpuffer (Novex Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x), Invitrogen) getaucht und festgespannt, wobei die Flächen mit den Auftragstellen zweier Gele einander zugewandt sind und dabei eine innere Kammer bilden, in die man zusätzlich in den Laufpuffer ein Antioxidans (500µl NuPage Antioxidant, Invitrogen auf 250ml Puffer) gibt.

An die Gele wurde eine Spannung von 150 Volt über eine Stunde angelegt, wobei die Stromstärke zwischen 40 und 55 mA lag.

3.3.2.5 Transfer auf die Nitrozellulosemembran

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Nitrozellulose Transfer Membrane, Porengröße 0,45µm, Schleicher + Schuell, Keene, USA) erfolgte ebenfalls durch Elektrodifffusion: Zunächst wurden die Zellulosemembran und mit Transferpuffer (Glycin + Tris Base + SDS + Methanol) getränkte Spezialpapiere (3MM-Paper, Schleicher + Schuell, Keene, USA) exakt auf die Größe des Gels zugeschnitten, um später Kurzschlüsse des Stromflusses durch überhängende und damit das Gel berührende Zellulosestreifen zu vermeiden.

Dann wurde folgende Schichtung vorgenommen:

1. Anode (graphitbeschichtete Platte)
2. Transferpuffer-getränktes Spezialpapier
3. Nitrozellulosemembran
4. Gel

5. Transferpuffer-getränktes Spezialpapier
6. Kathode (graphit-beschichtete Platte)

Beim Aufeinanderlegen der einzelnen Schichten wurde immer sorgfältig darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bildeten. Zwischen Kathode und Anode wurde nun eine Spannung von 100 Volt über 2 Stunden angelegt, wodurch die Protein vom Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden.

3.3.2.6 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht in 10 ml fünfprozentigem Milchpuffer (0,5g non-fat-dried-milk-powder + 0,05ml Tween [Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA] auf 9,45ml PBS) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran erneut in frischen Milchpuffer gelegt, in den dann der erste Antikörper gegeben wurde.

3.3.2.7 Antikörper

Der erste Antikörper (HER-3: sc-285, HER-4: sc-283, beide Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben, d.h. 10µl auf 10ml Milchpuffer. Nach einer Einwirkzeit von 1 bis 1½ Stunden bei Raumtemperatur wurde die Zellulosemembran zunächst dreimal kurz in destilliertem Wasser gespült und anschließend dreimal 10 Minuten in PBS-Tween 0,5% gewaschen. Der zweite Antikörper (Peroxidase-conjugated AffinityPure F(ab')₂-Fragment-Goat-Anti-Rabbit-IgG, Dianova, Hamburg) wurde wieder in Milchpuffer gelöst und in einer Verdünnung von 1:5000 (d.h. 2µl Antikörper auf 10ml Milchpuffer) für 1 - 1½ Stunden bei Raumtemperatur zugegeben. Darauf erfolgte der gleiche Waschvorgang wie nach Inkubation des ersten Antikörpers.

3.3.2.8 Entwicklung der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembran wurde eine Minute in Elektrochromoluminiszenz (ECL)-Lösung (Amersham Biosciences) getaucht und anschließend in Zellophanfolie gewickelt, um die Membran feucht zu halten. Die mit dem zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase setzt das enthaltene Substrat um, wobei Energie in Form von Chromoluminiszenz (Photonen) freigesetzt wird. Die Photonen schwärzten einen aufgelegten Röntgenfilm, auf dem dann nach der Entwicklung die einzelnen Banden sichtbar wurden. Die Expositionsdauer wurde bis zum optimalen Ergebnis verlängert und lag je nach Antikörper bei einer Minute bis 12 Stunden.

3.3.2.9 Kontrolle mit Aktinantikörpern

Aktin ist ein in allen Zellen vorliegendes Protein des Zytoskeletts, das auch nach Zelllyse im Lysat in relativ konstanter Konzentration vorliegt.

Um zu überprüfen, ob man in jede Auftrags tasche die gleiche Menge an Proteinlösung gegeben hat, wurde nach jedem Western-Blot die Membran 5 Minuten in 0,2 molarer Natriumlauge (NaOH) gestrippt, d.h. von den angelagerten Molekülen befreit und gründlich in PBS gewaschen. Dann wurden erneut unspezifische Bindungsstellen geblockt (siehe 3.3.2.6), anschließend die Membran mit Antikörpern gegen Aktin inkubiert und der Vorgang wie oben beschrieben zu Ende geführt.

Die Breite der Aktinbanden auf dem Röntgenbild spiegelt die Menge der aufgetragenen Proteinlösung wieder. Man kann also differenzieren, ob quantitative Unterschiede in den EGF-Rezeptor-Banden durch unterschiedliche Konzentrationen in den einzelnen Proben entstanden sind oder dadurch, dass nicht in jede Tasche die gleiche Menge Lysat aufgetragen wurde.

3.4 Auswertung und Statistik

3.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mikroskopisch in verschiedenen Vergrößerungen beurteilt (100x bis 400x). Dabei wurden die Immunreaktionen in mehreren Durchgängen zu verschiedenen Zeitpunkten mindestens zweimal begutachtet und bewertet.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen wurden nur Schnitte berücksichtigt, die sowohl endometriale Drüsen- als auch Stromazellen enthielten (62 Proben), also den gängigen pathologischen Kriterien entsprachen.

Sowohl in den HER-3- als auch in den HER-4-Färbungen wurde die zytoplasmatische Anfärbung für Drüsen- und Stromazellen getrennt beurteilt und in einem Score mit 1 für keine, 2 für schwache, 3 für mittlere und 4 für starke Anfärbung bewertet (69, 172, 198). Innerhalb des Stromas wurde dabei nochmals zwischen direkt dem Drüsenepithel anliegenden und benachbarten, muskelzellähnlichen Stromazellen unterschieden und jeweils getrennt beurteilt. Da die Intensität der Anfärbung in den einzelnen Färbedurchgängen jeweils unterschiedlich ausfiel, wurde die Bewertung

immer innerhalb eines Durchgangs im Verhältnis zur Anfärbung der Positivkontrolle durchgeführt (69).

Bei der Färbung von HER-4 wurde neben der zytoplasmatischen Färbung eine Kernfärbung beobachtet, die entsprechend dem Anteil angefärbter Kerne in einer Prozentskala bewertet wurde: 0%, 1-20%, 21-40%, 41-60%, 61-80% und >81%. Diese Skala wurde anschließend in ein Punktesystem überführt, bei dem 0% einem Punkt entspricht, 1-20% = 2 Punkten, 21-40% = 3 Punkten, 41-60% = 4 Punkten, 61-80% = 5 Punkten und >81% = 6 Punkten.

3.4.2 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung erfolgte mit der Software SPSS (Statistical Programm for the Social Sciences) Version 11.5 für Windows. Nach Beratung durch Herrn PD Dr. Dr. Werner Hopfenmüller des Instituts für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin wurde zunächst eine deskriptive Übersicht der beobachteten Immunreaktionen von HER-3 und HER-4 in den verschiedenen Zelltypen des Endometriosegewebes erstellt. Anschließend wurde mit Hilfe statistischer Testverfahren (siehe unten) ein Vergleich der HER-3- bzw. HER-4-Immunreaktion mit der Expression der Steroidrezeptoren, der Symptomatik der Patientinnen und dem Stadium ihrer Erkrankung vorgenommen, um eventuelle Zusammenhänge aufzudecken.

Da es sich bei den Daten bezüglich der Symptomatik, Parität und Erkrankungsstadium der Patientinnen um diskrete (nicht-stetige) Werte handelt, kann man sie in Kreuztabellen den Immunreaktionsstärken von HER-3 und HER-4 gegenüberstellen und mit Hilfe des χ^2 -Tests einen eventuellen Zusammenhang überprüfen von dem ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner 0,05 als statistisch signifikant gesprochen werden kann. Durch Zusammenfassung der vier Gruppen von HER-3- bzw. HER-4-Immunreaktionsstärken auf zwei (keine und schwache bzw. mittlere und starke Immunreaktion bilden jeweils eine Gruppe) kann eine vorher nicht eindeutige Tendenz deutlicher werden (oder sich auch verlieren). Auch bei dieser verkleinerten Kreuztabelle kann der χ^2 -Test durchgeführt werden.

Die Expressionen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie die Wachstumsfraktion Ki67 sind in Prozentwerten angegeben und damit eine stetige Variable. Deshalb wird bei einer Gegenüberstellung mit den Immunreaktionsstärken von HER-3

bzw. HER-4 der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Wenn bei diesem Test die Irrtumswahrscheinlichkeit p ausreichend klein ($< 0,1$) ausfiel, wurden die Werte der HER-3- bzw. HER-4-Immunreaktion in zwei Gruppen zusammengefasst (keine und geringe bzw. mittlere und starke Immunreaktion bildeten jeweils eine Gruppe) und der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner 0,05 kann von einem statistisch signifikanten Zusammenhang gesprochen werden.

3.4.3 Auswertung der Western-Blots

Beim Western-Blot handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren zur Proteinbestimmung. Aus der Bandenstärke lässt sich nicht uneingeschränkt auf den Proteingehalt der Probe schliessen. Aus diesem Grund wurden bei der Auswertung der Western-Blots lediglich die Tendenzen der die HER-3- und HER-4-Expression widerspiegelnden Bandenstärken beschrieben.