

## 5. Diskussion

Durch immunhistochemische Untersuchung von 62 peritonealen Endometrioseherden konnte erstmals nachgewiesen werden, dass in allen drei untersuchten Gewebetypen (Drüsen-, Stroma- und muskelzellähnliche Stromazellen) die Wachstumsfaktorrezeptoren HER-3 und HER-4 exprimiert werden. Auch in Western-Blot-Versuchen konnte die Präsenz von HER-3 und HER-4 in Endometriosezellen gezeigt werden.

Die mikroskopische Untersuchung der immunhistochemischen Anfärbungen von HER-3 und HER-4 zeigte, dass die Betonung beider Rezeptoren in den epithelialen Drüsenzellen lag: 60 % der untersuchten Proben zeigten eine mittlere bis starke HER-3-Immunreaktion in den Drüsenzellen und 75,8 % der Schnitte eine schwache bis mittel ausgeprägte epitheliale HER-4-Immunreaktion (vergleiche Abbildung 5 und Abbildung 9).

Insgesamt ließ sich zeigen, dass HER-3 in allen drei untersuchten Gewebetypen der Endometriose (epitheliale Drüsenzellen, Stromazellen und muskelzellähnliche Stromazellen) stärker exprimiert wird als HER-4. So exprimierten 22,6 % der Drüsenzellen keine HER-4-Rezeptoren, wogegen nur 3,2 % der Drüsenzellen keine HER-3-Rezeptoren enthielten. Von den Stromazellen zeigten 94 % keine HER-4-, jedoch nur 73 % keine HER-3-Immunreaktion (vergleiche Tabelle 68, Tabelle 69 und Tabelle 70).

Vergleicht man diese zum Teil sehr ausgeprägten Immunreaktionen von HER-3 und HER-4 mit den Daten aus Untersuchungen über die Expression von HER-1 und HER-2 in Endometriose, so stellt man fest, dass überwiegend eine schwache HER-1- und zum großen Teil überhaupt keine HER-2-Expression in Endometriosegewebe beobachtet werden konnte (24, 81, 146, 166, 186). Man kann also bereits auf Grundlage dieser quantitativen Überlegenheit von HER-3 und HER-4 davon ausgehen, dass die beiden Rezeptoren eine größere Rolle als HER-1 und HER-2 in der Pathogenese von Endometriose spielen.

Vergleicht man die Immunreaktionen von HER-3 und HER-4 in Endometriosegewebe mit Daten aus Studien über ihre Expression in gesundem Endometrium und endometrialen Adenokarzinomen (198), so kann man feststellen, dass gesundes Endometrium HER-3 nur schwach exprimiert (Arbeit von Srinivasan et al. (198): Werte zwischen 0 und 4 in einem Score von 0 bis 8), wogegen sowohl Adenokarzinome

(Arbeit von Srinivasan et al. (198): Werte zwischen 0 und 8) als auch das Drüsenepithel aus Endometriosegewebe eine mittlere bis starke HER-3-Expression zeigen (vergleiche Abbildung 5) – was man auch als Überexpression bezeichnen und als Hinweis auf eine mögliche pathogenetische Rolle von HER-3 in beiden entarteten Geweben werten kann.

Damit wird das maligne Potential der Endometriose unterstrichen, die – obwohl Fälle einer Transformation in ein Malignom beschrieben worden sind (89, 181, 214) – überwiegend als gutartig angesehen wird. Auch HER-4 wird in Adenokarzinomen überexprimiert, allerdings nicht so eindeutig wie HER-3, da die HER-4-Expression im Endometrium auch physiologischerweise in der sekretorischen Zyklusphase eine Steigerung erfährt (198), was als Hinweis auf eine Vernetzung mit dem Steroidhormonsystem interpretiert werden könnte. Aus dem gleichen Grund war auch die Interpretation der sehr heterogen verteilten HER-4-Immunreaktion in den Drüsenzellen (in 22,6 % der Zellen keine, in 38,7 % eine schwache und in 37,1 % eine mittlere Immunreaktionsstärke) schwierig (vergleiche Abbildung 9).

### ***HER-3/ HER-4 und Schmerzsymptomatik***

Aus den Daten ergeben sich starke Hinweise, dass sich eine hohe HER-3- oder HER-4-Expression auf die Symptomatik der Patientinnen auswirkt.

Dysurie lag mit zunehmender HER-3-Immunreaktion in den Drüsen- und Stromazellen klinisch häufiger vor (vergleiche Tabelle 11 und Tabelle 21). Auch mit zunehmender HER-4-Immunreaktion in allen drei untersuchten Zelltypen fand sich häufiger eine Dysurie (vergleiche Tabelle 44, Tabelle 54 und Tabelle 64).

Dyspareunie war bei einer mittleren bis starken HER-3-Immunreaktion in den Drüsen- und muskelzellähnlichen Stromazellen und einer zunehmenden HER-4-Immunreaktion in den muskelzellähnlichen Stromazellen häufiger vorhanden (vergleiche Tabelle 10, Tabelle 30 und Tabelle 63).

Dyschezie war bei einer mittleren bis starken HER-3-Immunreaktion in den Drüsen- und muskelzellähnlichen Stromazellen häufiger vorhanden (vergleiche Tabelle 12 und Tabelle 32).

Am deutlichsten war jedoch der Zusammenhang zwischen HER-3- und HER-4-Immunreaktion in muskelzellähnlichen Stromazellen und dem Vorliegen von chronischen oder rezidivierenden Unterbauchschmerzen zu erkennen: Interessanter-

weise war eine starke HER-3-Immunreaktion mit einer statistisch signifikant höheren Rate an chronischen oder rezidivierenden Unterbauchschmerzen assoziiert ( $p = 0,049$ ) (vergleiche Tabelle 28). Eine vorhandene HER-4-Immunreaktion (HER-4 wird überhaupt nur von wenigen Zellen exprimiert) war ebenfalls mit einer höheren Rate an Unterbauchbeschwerden verbunden (vergleiche Tabelle 61). Dieser Zusammenhang war allerdings nicht statistisch signifikant ( $p = 0,2$ ).

Ein genau gegenläufiger Zusammenhang zeigte sich bei Betrachtung der Häufigkeit einer Dysmenorrhoe: Eine fehlende oder niedrige HER-3- und HER-4-Immunreaktion in den muskelzellähnlichen Stromazellen war mit einem erhöhten Vorkommen von Dysmenorrhoe unter den Frauen assoziiert (vergleiche Tabelle 29 und Tabelle 62).

Diese Tatsache lässt sich ansatzweise dadurch erklären, dass chronische oder rezidivierende Unterbauchschmerzen, Dysurie, Dyspareunie und Dyschezie Symptome sind, die nicht nur durch aktive Endometrioseherde verursacht werden. Sie entstehen vor allem durch Verwachsungen und Adhäsionen in der Peritonealhöhle, bedingt durch die Vernarbung älterer, inaktiver und ausgebrannter Läsionen. Im Gegensatz dazu hat die Dysmenorrhoe ihren Ursprung und ihre Lokalisation in der Gebärmutter und den zyklischen hormonellen Veränderungen in der Peritonealhöhle.

Diese These wird durch eine Studie von Vercellini et al. (219) unterstützt, in der zumindest bezüglich der Dyspareunie nachgewiesen wurde, dass sie signifikant häufiger bei Patientinnen mit schwarzen, d.h. alten vernarbten Endometrioseherden vorlag, als bei Frauen mit überwiegend klaren oder roten, d.h. aktiven Herden. Vercellini et al. erstellten die These, dass die sogenannten „typischen“, d.h. schwarzen vernarbten Herde hauptsächlich organische Schmerzen und die „atypischen“, d.h. klar-roten aktiven Herde vor allem funktionelle Schmerzen wie die Dysmenorrhoe verursachen. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Intensität der Dysmenorrhoe meist in keinem Zusammenhang mit dem makroskopischen Ausmaß der Endometriose steht, sondern eher mit dem Aktivitätszustand der Endometrioseherde und dem Vorliegen eines permanenten Entzündungszustandes in der Peritonealhöhle korreliert (218). Zyklische Schmerzen entstehen möglicherweise durch das monatliche Einbluten in die stark vaskularisierten klar-rötlichen (d.h. aktiven) Läsionen (28). Die anhaltende lokale peritoneale Entzündung beruht hauptsächlich auf einer gesteigerten Konzentration an Zytokinen und Entzündungsmediatoren, deren Ausschüttung durch einen positiven feed-back-Kreislauf permanent stimuliert wird.

Endometriosegewebe zeigt eine hohe Östradiolsynthese mit einer verminderten Östradiolinaktivierung. Hohe Östradiolspiegel steigern die Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2), was wiederum zu einer gesteigerten Sekretion von Prostaglandin E<sub>2</sub> führt. Prostaglandin E<sub>2</sub> aktiviert die Aromatase und das steroidogene akute regulierende Protein (StAR), die beide wiederum von großer Bedeutung für die Östradiolsynthese sind, womit sich der Kreislauf schließt (13). Dies erklärt die nur unzureichende Effektivität einer allein östrogensupprimierenden Therapie und die Wirksamkeit von Therapien, die auf eine Blockade der COX-2 (20) oder der Aromatase abzielen (54, 56). Daneben finden sich in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen erhöhte Level an Interleukinen, Leukotrienen, Tumornecrosis-factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Insulin-like-growth-factor-1, RANTES und Leptin (2, 10, 11, 23, 111, 195) – alles Moleküle, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen beteiligt sind.

Die Frage, auf welche Weise HER-3 und HER-4 in diesen Vorgängen eine Rolle spielen könnten, ist noch nicht sehr ausführlich untersucht worden. Nagata et al. beobachteten in Zelllinien von Magenfibroblasten, dass die Inkubation mit Prostaglandin E<sub>2</sub> oder Interleukin-1 $\beta$  zu einer Stimulierung der HER-3-Phosphorylierung, d.h. HER-3-Aktivierung, führte (145). Saha et al. stellten fest, dass TGF- $\beta$ 1 und EGF (HER-1) die Expression von COX-2 und Prostaglandin E<sub>2</sub> in Lungenepithelzellen steigern. Eine erhöhte Expression von COX-2 und Prostaglandin E<sub>2</sub> führt in vielen Karzinomen zu einer verstärkten Resistenz gegen Apoptose, verstärkter Haftung an der extrazellulären Matrix, stärkerer Invasivität und Angiogenese (179).

Organische Schmerzen wie Dysurie, Dyspareunie, Dyschezie und nicht-zyklische chronische Unterbauchschmerzen zeigen eher einen Zusammenhang mit dem Ausmaß und der Verteilung von makroskopisch sichtbaren Endometrioseläsionen. Oft kann sogar die Lokalisation der Schmerzen Hinweise auf die betroffenen Strukturen geben (63). Man kann die organischen Schmerzen nicht kategorisch von den oben beschriebenen funktionellen Schmerzen trennen, denn die strukturellen Veränderungen wie Adhäsionen, Vernarbungen und Gewebsneubildung entstehen vermutlich auf Grund des chronischen Entzündungszustandes im Peritoneum. Prostaglandine haben eine fördernde Wirkung auf die Angiogenese (87), TNF- $\alpha$  und Interleukin-8 stimulieren in aktiven roten Läsionen das Wachstum von Endometriose-

stromazellen und unterstützen so die Gewebeneubildung und die Ausbreitung der Erkrankung (76).

Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann man annehmen, dass HER-3 und HER-4 vor allem an der Entstehung der organischen, oft adhäsionsbedingten Symptome wie Dyspareunie, Dyschezie, Dysurie und chronischen Unterbauchschmerzen beteiligt sind. Möglicherweise spielen die „muskelzellartig“ veränderten Stromazellen dabei eine entscheidende Rolle.

### ***Die Rolle der „muskelzellartigen“ Stromazellen***

Auf Grund der morphologischen Ähnlichkeit der veränderten Stromazellen mit glatten Muskelzellen kann man die Hypothese aufstellen, dass sie kontraktorische Fähigkeiten besitzen und dadurch an der Entstehung der Schmerzsymptomatik ursächlich beteiligt sein könnten.

Es bleibt die Frage, inwieweit diese veränderten Stromazellen tatsächlich Muskelzeleigenschaften besitzen. Zu einer ersten orientierenden Abklärung wurden zusätzliche Schnitte von den Proben, die besonders viele dieser muskelzellähnlichen Stromazellen enthielten, angefertigt und immunhistochemisch gegen Muskelaktin angefärbt. Dabei zeigte sich, dass die veränderten Stromazellen tatsächlich Muskelaktin enthalten bzw. in aktinhaltige glatte Muskelzellen übergehen, wie Abbildung 17 zeigt:

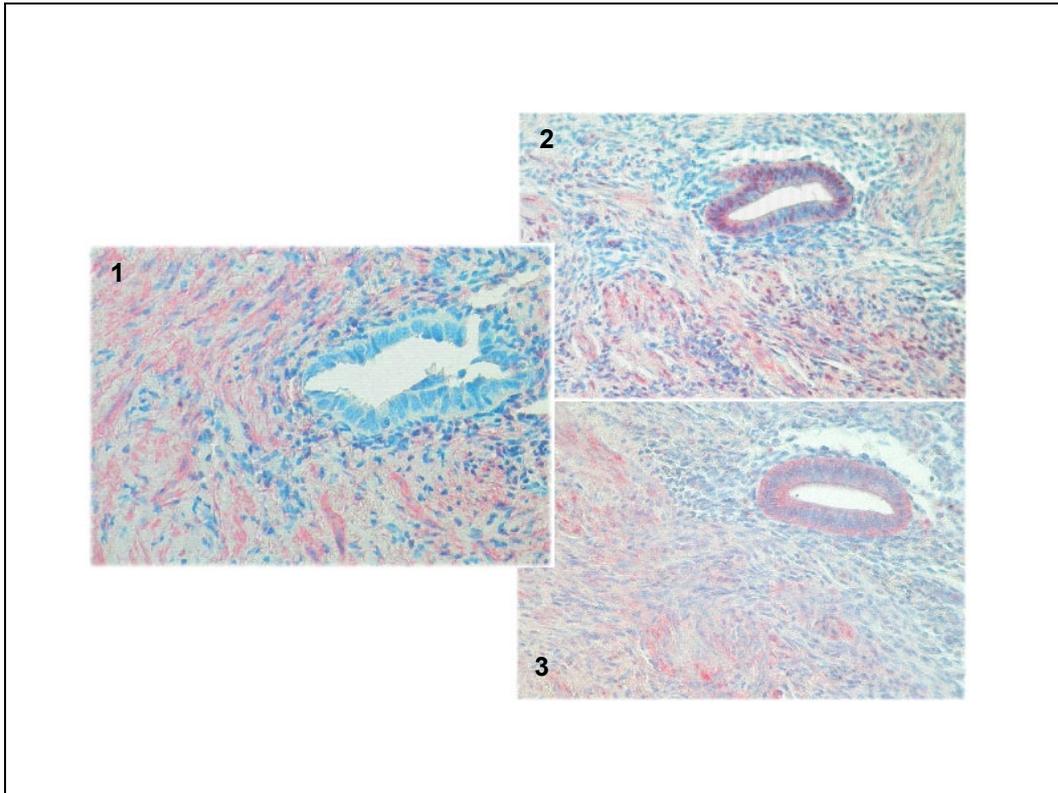


Abbildung 17: smooth-muscle-Aktin, HER-3 und HER-4 in der gleichen Probe einer Patientin, die muskelzellähnlichen Zellen befinden sich jeweils im linken unteren Bildabschnitt

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)

Anaf et al. und Mechsner et al. (8, 131) konnten ebenfalls die Präsenz von glatten Muskelzellen in der Umgebung von peritonealen Endometrioseherden nachweisen, während man im gesunden Peritoneum und im eutopen Endometrium kranker wie gesunder Frauen keine (8), bzw. weniger (131) glatte Muskelzellen findet. Es gibt verschiedene Theorien über die Entstehung dieser glatten Muskelzellen. Sie könnten durch Differenzierung aus Stromazellen des Endometriosegewebes entstanden sein. Eine weitere Möglichkeit ist die metaplastische Entstehung aus den Müller'schen Gängen oder aus durch retrograde Menstruation in die Peritonealhöhle verlagertem endometrialen Gewebe. Die Entstehung der glatten Muskelzellen wird vermutlich durch eine pathologische peritoneale Flüssigkeit induziert (8). Im Gegensatz zu den peritonealen, sind uterosakrale und rektovaginale Endometrioselokalisierungen häufig invasive und knotige Läsionen, bei denen äußerst viele glatte Muskelzellen nachgewiesen werden (53). Da sich diese Läsionen in der direkten Nachbarschaft zu vaginalem und rektalem Muskelgewebe befinden, könnten die glatten Muskelzellen hier auch durch eine Hyperplasie von bereits vorhandenen Muskelzellen entstanden

sein oder aber fälschlicherweise durch eine zu tiefe Biopsieentnahme aus rektaler oder vaginaler Muskularis vorgetäuscht worden sein (8).

Mechsner et al. untersuchten immunhistochemisch mit smooth-muscle-actin-Antikörpern die Häufigkeit und Verteilung von glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. In 76 % der Herde konnten glatte Muskelzellen nachgewiesen werden. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen roten (=aktiven) und schwarzen (=inaktiven) Läsionen. Ausserdem wurde die Expression des Oxytocin-Rezeptors (OTR) untersucht. Epithelzellen exprimierten sowohl in Endometriosegewebe als auch in gesundem Endometrium moderat bis stark den Oxytocinrezeptor. Stromazellen im Endometriosegewebe zeigten keine Immunreaktion bis auf einige wenige spindelförmige Zellen, die mittels eines monoklonalen smooth-muscle-Aktin-Antikörpers als glatte Muskelzellen identifiziert werden konnten. Über das Oxytocin-OTR-System wird möglicherweise die Aktivierung der kontraktilen Eigenschaften dieser Zellen vermittelt, die Blockade dieses Systems könnte somit ein neuer Ansatz in der Therapie der Schmerzsymptomatik sein (131).

In der Annahme, dass die muskelzellartig veränderten Stromazellen als morphologisches Korrelat einer fortgeschrittenen Endometriose und als mitverantwortlich für die Schmerzsymptomatik anzusehen sind, kann man zumindest für HER-3 die Hypothese aufstellen, dass er an Entstehung oder Verbreitung dieser Zellen beteiligt ist. Der HER-3-Rezeptor wird von 45,8% der muskelzellähnlichen Stromazellen zumindest schwach, von 16,7 % mittel und von 4,2 % der Zellen stark exprimiert (vergleiche Abbildung 7).

HER-4 dagegen wird von zwei Dritteln der muskelzellähnlichen Stromazellen überhaupt nicht exprimiert (66,7 %) (vergleiche Abbildung 13).

### ***HER-3/HER-4 und Infertilität***

Bei der statistischen Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen den Immunreaktionen von HER-3 bzw. HER-4 und der Parität der Patientinnen, konnte keine Korrelation nachgewiesen werden. 79 % der Frauen der untersuchten Gruppe hatten bei einem Durchschnittsalter von 32 Jahren noch keine Kinder bekommen. In der Annahme, dass dies ein Hinweis auf eine eventuell bei einigen Patientinnen vorliegende Infertilität sein könnte, muss man auf Grundlage der erhobenen Daten nicht davon ausgehen, dass HER-3 und HER-4 daran ursächlich beteiligt sind

(vergleiche Tabelle 7, Tabelle 17, Tabelle 27, Tabelle 40, Tabelle 50 und Tabelle 60). Die Infertilität bei Endometriosepatientinnen scheint auf vielen verschiedenen Faktoren zu beruhen – in den hohen Krankheitsstadien liegen oft mechanische Hindernisse vor, bei mildereren Verläufen sind möglicherweise hormonelle, inflammatorische oder autoimmunologische Faktoren in der Peritonealflüssigkeit für die Unfruchtbarkeit verantwortlich (74, 111, 116, 170).

### ***HER-3/HER-4 und rASRM-Stadium***

Bei der Gegenüberstellung der HER-3- und HER-4-Immunreaktionen mit den Erkrankungsstadien der Patientinnen, eingeteilt nach der verbesserten Version der American Society for Reproductive Medicine (rASRM), konnte man feststellen, dass die Immunreaktionen in keinem der drei untersuchten Zelltypen mit dem vorliegenden Krankheitsstadium korrelierten. Sie können also nicht als Marker bezüglich der Stadieneinteilung verwendet werden. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass aus dem Stadium der Erkrankung nicht auf die vorliegende Expression von HER-3 und HER-4 geschlossen werden kann (vergleiche Tabelle 6, Tabelle 16, Tabelle 26, Tabelle 39, Tabelle 49 und Tabelle 59). Da die Klassifikation nach rASRM ausschließlich auf dem makroskopischen Erscheinungsbild der Endometriose beruht, korrelieren weder die Schmerzsymptomatik noch die Häufigkeit einer Infertilität mit dem Krankheitsstadium. Eine Berücksichtigung biologischer und immunologischer Marker – Entzündungsmediatoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren – könnte zu einem besseren Klassifizierungssystem führen, das eine an den individuellen Fall angepasste Therapiestrategie ermöglichen würde (111).

### ***HER-3/HER-4 und Steroidhormonsystem***

In Bezug auf die Fragestellung, ob Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren und den vorliegenden Expressionen von Steroidrezeptoren existieren, wurde die Ausprägung der HER-3- bzw. HER-4-Immunreaktion in Verbindung mit den im jeweiligen Zelltyp vorliegenden Expressionen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren betrachtet. Dieser direkte Vergleich der Expressionen von Steroid- und Wachstumsfaktorrezeptoren lässt methodisch keine Rückschlüsse auf Interaktionen zwischen den beiden Rezeptorsystemen zu. Man kann jedoch überprüfen, ob sich die Expressionen von

HER-3, HER-4, Östrogen- und Progesteronrezeptor quantitativ eher in paralleler oder gegenläufiger Richtung entwickeln.

Sowohl in Epithelzellen als auch in muskelzellähnlichen Stromazellen ließ sich die Tendenz einer zunehmenden Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression bei steigender Expression von HER-3 und HER-4 beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Stromazellen eine eher gegenläufige Tendenz. Diese Tendenzen waren meist nur schwach ausgeprägt und hatten deshalb keine statistische Signifikanz.

Die einzige statistisch signifikante Beobachtung war, dass bei einer mittleren bis starken HER-4-Immunreaktion in den epithelialen Drüsenzellen eine statistisch signifikant höhere epitheliale Östrogenrezeptorexpression vorlag als bei fehlender oder schwacher HER-4-Immunreaktion ( $p = 0,008$ ) (Tabelle 34 und Tabelle 35).

Insgesamt lassen die immunhistochemischen Färbungen keine Rückschlüsse darauf zu, dass die Expression von HER-3 und HER-4 im Endometriosegewebe abhängig von der Expression der Steroidhormonrezeptoren ist.

Die Ergebnisse der Western-Blots geben allerdings Hinweise auf ein mögliches Zusammenspiel zwischen Östrogenrezeptorsystem und Wachstumsfaktorrezeptoren: Aus Patientenmaterial gewonnene Endometriosezellen, die über 24 bzw. 48 Stunden in hormonfreiem Medium, d.h. ohne Östrogen, inkubiert worden waren, wiesen, im Vergleich mit in östrogenhaltigem Nährmedium inkubierten Zellen, im Western-Blot eine stärkere Bande im Bereich der Molekulargewichte von HER-3 und HER-4 auf (vergleiche Abbildung 16). Auf Grundlage allein dieser Beobachtungen kann man allerdings noch nicht viele Schlüsse ziehen, hier sind weitere und gezieltere Versuche notwendig.

Diese Ergebnisse der Western-Blots werden jedoch durch eine in die ähnliche Richtung weisende Beobachtung von Melega et al. unterstützt. Sie hatten festgestellt, dass nach 6-monatiger Östrogensuppression die Endometriosezellen keine Östrogenrezeptoren mehr exprimierten, dagegen hatte die HER-1-Expression zwar abgenommen, war aber noch vorhanden und vermutlich für den Erhalt der Endometriose mitverantwortlich (132). In Mammakarzinomzellen wurde das Zusammenspiel zwischen den beiden Rezeptorsystemen mit einer gegenseitigen Regulation bereits sehr gut untersucht und belegt (150, 151, 233).

Durch die Koexpression zweier miteinander vernetzter Rezeptorsysteme (Steroid- und Wachstumsfaktorrezeptoren) könnten sich die Endometriosezellen für ein breiteres Spektrum an Stimuli sensibilisieren. Betrachtet man die Vorgänge im Mammakarzinom, so konnte gezeigt werden, dass zwischen Steroidrezeptoren und Wachstumsfaktorrezeptoren eine enge funktionelle Vernetzung besteht und dass das Östrogenrezeptorsystem einen großen Teil seiner vielfältigen Effekte über die Signaltransduktionswege der EGF-Rezeptoren vermittelt (113).

Zudem könnte sich die östrogenabhängigen Zellen so vor einem Steroidentzug schützen, indem sie im Falle eines Östrogenmangels oder einer Blockade der Östrogenrezeptoren die Wachstumsfaktorrezeptoren kompensatorisch hochregulieren (233). Auf diese Weise kann die Wachstumsstimulation über den Östrogenrezeptor auch ohne die direkte Einwirkung von Östrogen aufrecht erhalten werden (110). Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Expressionen von EGF-Rezeptor und Östrogenrezeptor in Brustkrebszellen in einem gegenläufigen Zusammenhang zueinander stehen (232). Am Beispiel des Mammakarzinoms konnte beobachtet werden, dass sich häufig nach einer gewissen Behandlungsdauer mit Antiöstrogenen (z.B. Tamoxifen<sup>®</sup>) eine Resistenz der Tumorzellen entwickelt, die mit einer Abnahme der Östrogen- und einer Zunahme der EGF-Rezeptoren verbunden ist (130, 149, 233). Die Brustkrebszellen MCF-7 zeigten unter Östradiol eine Verringerung der Expression von HER-3 und HER-4 und eine genau gegenläufige Entwicklung unter Behandlung mit Antiöstrogenen (z.B. Tamoxifen<sup>®</sup>) (176). In Kulturen von Brustkrebszellen, die lange mit dem Antiöstrogen Faslodex<sup>®</sup> (ICI 182,780) behandelt worden sind und dagegen resistent wurden, konnte eine Wachstumshemmung durch den EGFR-spezifischen Tyrosinkinasehemmer Iressa<sup>®</sup> (ZD 1839) erreicht werden (130). Diese Mechanismen könnten auch ein Erklärungsansatz sein für die unter antiöstrogener Therapie trotzdem sehr hohe Rezidivrate der Endometriose mit zum Teil gegen Antiöstrogene resistenten Zellen und die oft beobachtete Entwicklung eines aggressiveren und proliferationsstärkeren Phänotyps (57).

Aus solchen Erkenntnissen bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zwischen Östrogen- und EGF-Rezeptorsystem ergeben sich für die Behandlung östrogenabhängiger Erkrankungen, vor allem für das Mammakarzinom, aber auch für die Endometriose, neue Therapiestrategien, die zum Teil bereits Gegenstand von Studien waren: Eine simultane Hemmung der Östrogen- und EGF-Rezeptoren im in-vitro

Versuch bewirkte so den Tod von Brustkrebszellen (232). Ausserdem könnte durch eine von Beginn an gleichzeitig eingesetzte Blockade von Östrogen- und Wachstumsfaktorrezeptoren die Entwicklung eines hormonresistenten Phänotyps verhindert oder zumindest verlangsamt werden (150).

Eine weitere Beobachtung bei der Auswertung der Daten war die Zunahme der Wachstumsfraktion Ki67 mit steigender HER-4-Immunreaktion ( $p = 0,066$ ) in den epithelialen Drüsenzellen (vergleiche Tabelle 37 und Tabelle 38). Als Interpretation könnte man hier einen über HER-4-Rezeptoren laufenden verstärkenden Einfluss auf die proliferierenden Zellen und deren Wachstumsgeschwindigkeit vermuten.

### ***Zwei Banden im Bereich von HER-4 im Western-Blot***

Bei den Ergebnissen der Western-Blot-Versuche fiel auf, dass vor allem die Zellen der Patientin 2, aber auch in schwächerer Ausprägung die 12Z-Zellen zwei Banden im Bereich des HER-4 (zwischen 160 und 180 kDa) aufwiesen. Auch in anderen Arbeiten sind in den abgebildeten Western-Blots zwei Banden im Bereich zwischen 160 und 180 kDa zu sehen (114, 124, 217). Für diese Beobachtung gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

Eine Möglichkeit ist, dass die HER-4-Rezeptoren in zwei unterschiedlich glycosylierten Formen vorliegen und dadurch verschiedene Molekulargewichte aufweisen (27, 124). Der nur kleine Abstand zwischen den beiden Banden (ungefähr 20 kDa) spricht für diese Möglichkeit

Die beiden Banden könnten auch durch das parallele Vorliegen zweier Isoformen des HER-4-Rezeptors entstanden sein. Für HER-4 wurden bis heute zwei Gruppen von Isoformen mit jeweils zwei Vertretern nachgewiesen, die durch Splicing aus dem ursprünglichen HER-4-Rezeptor entstehen. Man unterscheidet zum einen die beiden Isoformen Jm-a und Jm-b, die sich durch eine veränderte Aminosäuresequenz in der extrazellulären Jm-Region voneinander unterscheiden (60, 69). Die beiden Isoformen CYT-1 und CYT-2 entstehen durch die Deletion von 48 Basenpaaren, die zu einer Abspaltung des die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) tragenden Bereichs im intrazellulären Teil des Rezeptors führt. Die Isoform mit der PI3-K wird CYT-1, die ohne PI3-K CYT-2 genannt. CYT-1 und CYT-2 unterscheiden sich sehr in ihren biologischen Funktionen voneinander (59, 69, 91, 183).

### ***Die nukleäre Immunreaktion von HER-4***

Eine weitere interessante Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit ist die Immunreaktion von HER-4 im Zellkern, deren Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist. Wie bereits im Kapitel 4 erwähnt, fanden auch andere Untersucher eine Kernanfärbung in immunhistochemisch auf HER-4 untersuchten Proben gesunder und maligne entarteter Gewebe völlig unterschiedlicher Herkunft (82, 199).

Es ist bereits lange bekannt, dass alle Mitglieder der EGF-Rezeptor-Familie auch Effekte wie zum Beispiel eine Steigerung der Zellteilung oder Transkriptionsänderungen (78, 148) auslösen können, also Effekte, bei denen die membranären Rezeptoren notwendigerweise Einfluss auf den Zellkern nehmen müssen. In Krebs- und regenerierenden Leberzellen hat man bereits nachgewiesen, dass HER-1 an einer Steigerung der Zellteilung beteiligt ist und die Rezeptoren sich dabei in den Zellkern verlagern und dort nachweisbar werden (127, 128). Wie die Signalübertragung der anderen Mitglieder der EGFR-Familie auf den Zellkern genau abläuft, ist allerdings noch nicht vollständig entschlüsselt. Eine Translokation der membranären EGF-Rezeptoren oder von Rezeptorfragmenten in den Zellkern ist allerdings eine naheliegende Erklärung (226).

Man hat bereits mit verschiedenen Methoden Fragmente von HER-4 im Kern nachgewiesen (78, 148, 226). Diese Fragmente können Einfluss auf die Transkription nehmen und entstehen nach Ligandenbindung durch Abspaltung des zytosolischen Rezeptorabschnitts mit Hilfe einer  $\gamma$ -Sekretase (148). Am häufigsten beschrieben ist die Spaltung des HER-4-Rezeptors in ein 120 kDa großes extrazelluläres, lösliches Fragment und ein 80 kDa großes C-terminales intrazelluläres Fragment (80p subunit genannt), das sich in den Kern verlagert (82, 114, 148, 177). Die Transkriptionsaktivität des Fragments, das oft die Tyrosinkinase beinhaltet, konnte im GAL4-Transkriptions-Assay nachgewiesen werden (78, 148). Der Transport der Rezeptoren bzw. der Rezeptorfragmente zum Zellkern erfolgt vermutlich über bestimmte Proteine oder sogenannte „nuclear-localization-sequences“ (NLS).

Mit Hilfe des nachgewiesenen GAL4-Reporters in HER-4 könnte der Rezeptor mit dem Chromatin oder der DNA interagieren und so die Transkription beeinflussen. Allerdings gibt es noch mehr Möglichkeiten, wie eine Interaktion zwischen Rezeptor und Kernbestandteilen stattfinden könnte: Der komplette Rezeptor oder einzelne Domänen

könnten als Transkriptionsfaktoren (78, 121, 148) wirksam werden, die Tyrosinkinase könnte Kernproteine phosphorylieren (127), die Kinase könnte aber ebenso die Chromatindrehung verändern (22, 143) oder der Rezeptor könnte die mRNA-Verarbeitung im Nukleolus modulieren (154, 163).

Die biologischen Effekte, die durch HER-4 im Zellkern bewirkt werden, sind bedeutend. Es konnte gezeigt werden, dass auf den Zellkern einwirkende HER-4-Rezeptoren in Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszellen eine Wachstumssteigerung und eine Zunahme der über den Östrogenrezeptor vermittelten Gentranskription verursachen (90), sowie die Entstehung eines invasiveren Phänotyps des Mammakarzinoms unterstützen (200). Auch in Endometriosezellen sind die möglichen biologischen Auswirkungen zu beobachten: Im Vergleich mit gesunden Zellen des Endometriums weisen Endometriosezellen tumorähnliche Eigenschaften auf, zum Beispiel eine gesteigerte Zellteilung und eine gesteigerte Widerstands- und Regenerationsfähigkeit. An ihrer Entstehung ist auf Grund der beobachteten nukleären HER-4-Immunreaktion eine Beteiligung von HER-4 möglich.

Zusammenfassend kann man annehmen, dass die Wachstumsfaktorrezeptoren HER-3 und HER-4 auf Grund ihrer quantitativ sehr eindeutigen Expression im Drüsenepithel und in den muskelzellartig veränderten Stromazellen peritonealer Endometrioseläsionen eine wichtige Rolle in der Ätiologie und Pathogenese von Endometriose spielen. Damit könnten sie auch Ziel neuer Therapieansätze sein.

Es gibt in der Krebstherapieforschung bereits erste Erfahrungen mit dem Einsatz von Inhibitoren der EGF-Rezeptor-Familie. Eine Behandlung von Mammakarzinomen im Mäusemodell (122) bzw. von Brustkrebszellkulturen (130) mit dem EGFR-spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor ZD 1839 (Gefitinib = Iressa<sup>®</sup> oder Erlotinib = Tarceva<sup>®</sup>) bewirkte eine Wachstumshemmung der Tumorzellen. Auch in der Behandlung anderer Malignome, wie zum Beispiel dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (147), dem Glioblastom (202) und dem ovariellen Karzinom (184), wurde die Effektivität des Tyrosinkinaseinhibitors ZD 1839 bereits überprüft. Dabei wurde deutlich, dass sich die Wirkung des selektiven HER-1-Inhibitors ZD 1839 auch auf die Dimerpartner von HER-1 übertragen kann. So konnte für HER-2-überexprimierende Brustkrebszellen gezeigt werden, dass ZD 1839 über die Blockade von HER-1 die Bildung von nicht phosphorylierten, also inaktiven Heterodimeren aus HER-1 und HER-2, aber auch aus HER-1 und HER-3 bewirkte und damit die Signalweitergabe aller vorhandenen

Rezeptoren der EGFR-Familie blockierte. Darüber hinaus konnte sogar eine Verringerung der Heterodimerbildung zwischen HER-2 und HER-3 nachgewiesen werden, auf die ZD 1839 keine unmittelbare Einwirkung hat (9).

Neben dem indirekt auf HER-2 und HER-3 einwirkenden ZD 1839 gibt es bereits einen direkt auf alle Mitglieder der EGFR-Familie wirksamen Inhibitor (4, 46). CI – 1033 ist ein irreversibler Tyrosinkinaseinhibitor, der bereits in einer ersten Studie seine Wirksamkeit auf Brustkrebszellen gezeigt hat. CI – 1033 könnte zukünftig ein vielversprechender Therapieansatz in der Behandlung von Tumoren sein, deren Zellen mehrere EGF-Rezeptoren koexprimieren (4).

Auch in der Behandlung von Endometriose könnte eine Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren zur Blockade der exprimierten Wachstumsfaktorrezeptoren, vor allem von HER-3, ein neuer zukünftiger Therapieansatz sein.