

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Direktor: Prof. A. Schneider

Untersuchungen zur Expression und endokrinen Regulation
der epidermal growth factor receptor Familie in
endometriotischen Läsionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum medicarum
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Johanna Herbel geb. Thode
aus Flensburg

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

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin
Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 22.06.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	<i>Endometriose</i>	5
1.1.1	Definition der Endometriose	5
1.1.2	Ätiologie Endometriose.....	5
1.1.3	Formen und Klassifikation der Endometriose	6
1.1.4	Symptomatik und Therapieansätze der Endometriose.....	8
1.2	<i>Rezeptor-Tyrosinkinasen der EGF Rezeptor-Familie</i>	10
1.2.1	Aufbau der EGF Rezeptoren	10
1.2.2	Vorkommen und physiologische Funktion der EGF Rezeptoren.....	12
1.2.3	Signaltransduktion der EGF Rezeptoren	12
1.2.4	Bedeutung der EGF Rezeptoren in der Onkologie	14
1.2.4.1	Bedeutung der EGF Rezeptoren im Mammakarzinom.....	14
1.2.5	Bedeutung der EGF Rezeptoren für die Tumorthherapie.....	15
1.3	<i>Zielsetzung</i>	17
2	Material und Methoden	18
2.1	<i>Beschreibung des Patientenkollektivs</i>	18
2.2	<i>Materialgewinnung und Probenentnahme</i>	18
2.3	<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	19
2.3.1	Herstellung von Gewebeschnitten	19
2.3.2	Entparaffinierung	19
2.3.3	Antigen-Demaskierungsverfahren am Gewebeschnitt	19
2.3.4	Immunhistochemische Färbungen.....	20
2.4	<i>Zellkultur</i>	21
2.4.1	Zelllinien.....	21
2.4.2	Etablierung eines <i>in vitro</i> -Modells von endometriotischen Primärzellen.....	21
2.4.2.1	Gewinnung und Kultivierung von primären Endometriomzellkulturen	21
2.4.2.2	Passagierung.....	22
2.4.2.3	Quantifizierung.....	22
2.4.3	Versuchsaufbau für die Expressionsanalyse der EGF Rezeptoren und des ER α mittels Westernblot	23
2.5	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie</i>	24
2.5.1	Fixierung und Permeabilisierung der Zellen	24
2.5.2	Immunfluoreszenzdoppelfärbung	24
2.6	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	26
2.6.1	Transfektion der 12Z-Zelllinie	26
2.6.1.1	Transfektion	26
2.6.1.2	Messung der Transfektionseffizienz	27
2.7	<i>Proteinbiochemische Untersuchungen</i>	27
2.7.1	Proteinpräparation	27
2.7.1.1	Herstellung von Gewebehomogenaten	27
2.7.1.2	Solubilisierung von Membranproteinen	27
2.7.1.3	Zellyse für Westernblot	28
2.7.1.4	Proteinbestimmung.....	28
2.7.1.5	Reduktion	28
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.7.3	Westernblot.....	29
2.8	<i>Statistik</i>	30
2.9	<i>Lösungen, Puffer und Medien</i>	31
2.9.1	Lösungen	31
2.9.2	Puffer	31
2.9.3	Medien	33
2.10	<i>Geräte</i>	34

2.11	<i>Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien</i>	35
3	Ergebnisse	38
3.1	<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	38
3.1.1	Expressionsanalyse der EGF Rezeptoren.....	38
3.1.1.1	Peritoneale Endometrioseläsionen	38
3.1.1.2	Ovarielle Endometrioseläsionen	41
3.1.1.3	Rectovaginale Endometrioseläsionen	44
3.1.2	Vergleich der EGF Rezeptoren in den verschiedenen Lokalisationen und Statistische Analyse.....	46
3.1.2.1	Expression von EGFR	47
3.1.2.2	Expression von HER-2	48
3.1.2.3	Expression von HER-3	49
3.1.2.4	Expression von HER-4	50
3.1.3	Besonderheit im Expressionsmuster von EGFR	52
3.1.4	Expressionsanalyse von ER α und Ki67 in Endometrioseläsionen	53
3.2	<i>Immunfluoreszenzanalyse der primären Zellkultur und der Zelllinie 12Z</i>	55
3.2.1	Charakterisierung der Primärzellkultur und der Zelllinie 12Z.....	55
3.2.2	Detektion der EGF Rezeptoren in endometriotischen Primärzellen und der Zelllinie 12Z	56
3.3	<i>Ergebnisse der Regulationsversuche</i>	59
3.3.1	Morphologische Untersuchung	59
3.3.2	Westernblot Analyse.....	62
3.3.2.1	Untersuchung zur Teilfunktionalität der EGF Rezeptoren im <i>in vitro</i> -Modell	62
3.3.2.2	Regulation der EGF Rezeptoren unter Östrogenentzug.....	64
3.3.2.2.1	Endometriotische Primärzellkultur	64
3.3.2.2.2	Zelllinie 12Z	66
4	Diskussion	74
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis	91

1 Einleitung

1.1 Endometriose

1.1.1 Definition der Endometriose

Endometriose ist definiert als das Vorkommen von Endometrium-ähnlichem Gewebe außerhalb des Cavum uteri. Sie ist östrogenabhängig und zählt zu den häufigsten gynäkologischen Erkrankungen, von der ca. 10-20% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter betroffen sind (Hutschenreiter et al., 1996). Obwohl Endometriose eine benigne Erkrankung ist, teilt sie einige Charakteristika mit malignen Tumoren, wie Neoangiogenese, Invasivität und destruierendes Wachstum (Gaetje et al., 1995; Swiersz, 2002). Grundsätzlich erkranken Frauen mit einer Endometriose insgesamt nicht häufiger an Krebs (Somigliana et al., 2006), dennoch scheint Endometriose mit der Entwicklung bestimmter Krebsarten, wie z.B. Ovarialkarzinome, assoziiert zu sein (Bergqvist et al., 2004; Van Gorp et al., 2004). Auch konnten maligne Transformationen endometriotischer Läsionen in seltenen Fällen beobachtet werden (Di Silvestro et al., 1999; Sampson, 1925). Zudem zeichnet sich die Endometriose durch eine hohe Rezidivrate (50-80% innerhalb von fünf Jahren) endokriner Therapie aus (Schweppe, 2002).

1.1.2 Ätiologie Endometriose

Der Pathomechanismus der Endometriose ist bis heute ungeklärt. Es sind mehrere Theorien über die Entstehung einer Endometriose entwickelt und diskutiert worden. Zurzeit geht man von einer multifaktoriellen Pathogenese aus. Keine der im Folgenden aufgeführten Theorien kann alle Formen und Lokalisationen der Endometriose erklären. Die beiden bekanntesten Theorien stammen aus den 1920er Jahren. Eine der beiden ist die Metaplasie-Theorie von R. Meyer. In seiner Theorie diskutiert Meyer, dass pluripotente Zellen aus Überresten des Coelomepithels durch verschiedene Stimuli eine metaplastische Umwandlung zu endometriellen Zellen vollziehen (Meyer, 1919). Das Coelom ist die sekundäre embryonale Leibeshöhle, aus der später die Pleura-, die Perikardial- und die Peritonealhöhle hervorgehen. Die zweite Theorie ist die Transplantationstheorie von J. A. Sampson (Sampson, 1927). Sie besagt, dass durch die retrograde Menstruation vitale Zellen in die Bauchhöhle gelangen und sich dort implantieren können. Die retrograde Menstruation ist jedoch ein physiologisches Phänomen, das zu 90% während der Menstruation zu

beobachtet ist. Damit infolge der retrograden Menstruation eine Endometriose entsteht, bedarf es also noch weiterer Faktoren, die bisher ungeklärt sind. Diese Problematik versucht Ph. Koninckx in seiner „endometriotic disease theory“ zu klären. Die Theorie besagt, dass genetisch aberrente Endometriumzellen zu veränderten biologischen Eigenschaften (Invasivität, Proliferation, Migration, Angiogenese) führen und damit zur Manifestation der Erkrankung. Zudem wurde die veränderte Peritonealflüssigkeit, die bei Frauen mit Endometriose ein proinflammatorisches Milieu aufweist, in die Pathogenese und Manifestation der Endometriosezellen mit einbezogen (Koninckx, Barlow et al., 1999). Der große Einfluss der Mikroumwelt im Peritoneum und immunologischen Faktoren auf die Entstehung der Endometriose wird auch von anderen Autoren diskutiert und ist allgemein anerkannt (Gazvani et al., 2002; Ulukus et al., 2005). Das Archimeta-Konzept von G. Leyendecker stützt sich auf die Erkenntnis, dass man bei Frauen mit Endometriose eine Hyper- bzw. eine Dysperistaltik des Uterus feststellen kann. Man nimmt an, dass durch die Arrhythmie in der Peristaltik Fragmente der Basalschicht des Endometriums (Autotraumatisierung) mittels retrograder Menstruation in den Bauchraum gelangen können. Die Zellen der Basalis besitzen Stammzellcharakter und können dadurch Endometrioseläsionen mit Komponenten des primordialen Uterus (endometriales Epithel, Stroma und glatte Muskelzellen) ausbilden (Leyendecker et al., 1998).

1.1.3 Formen und Klassifikation der Endometriose

Die Endometriose wird, entsprechend der Lokalisation, in verschiedene Formen eingeteilt (Abb.1):

- Endometriosis genitalis externa
- Endometriosis genitalis interna (Adenomyosis uteri)
- Endometriosis extragenitalis
- rectovaginale Endometriose

Die Endometriosis genitalis externa ist auf dem Peritoneum des kleinen Beckens, z.B. am Blasendach, am Uterus selbst, an den Ovarien oder auf bindegewebeartigen Strukturen, zu finden. Die Endometriosis genitalis interna hingegen bezeichnet das Vorkommen von Endometrioseherden in der Uterusmuskulatur, dem Myometrium. Zu der Endometriosis extragenitalis werden Endometrioseherde gezählt, die an anderen als den Genitalorganen im kleinen

Becken oder außerhalb desselben vorkommen, z.B. am Darm, an der Blase oder am Zwerchfell. Die rectovaginale Endometriose im Douglasraum wird als eigenständige Form betrachtet, wobei dieser Endometriosetyp auch invasiv in den Darm wachsen kann und es so Überschneidungen mit dem Erscheinungsbild der Darmendometriose gibt.

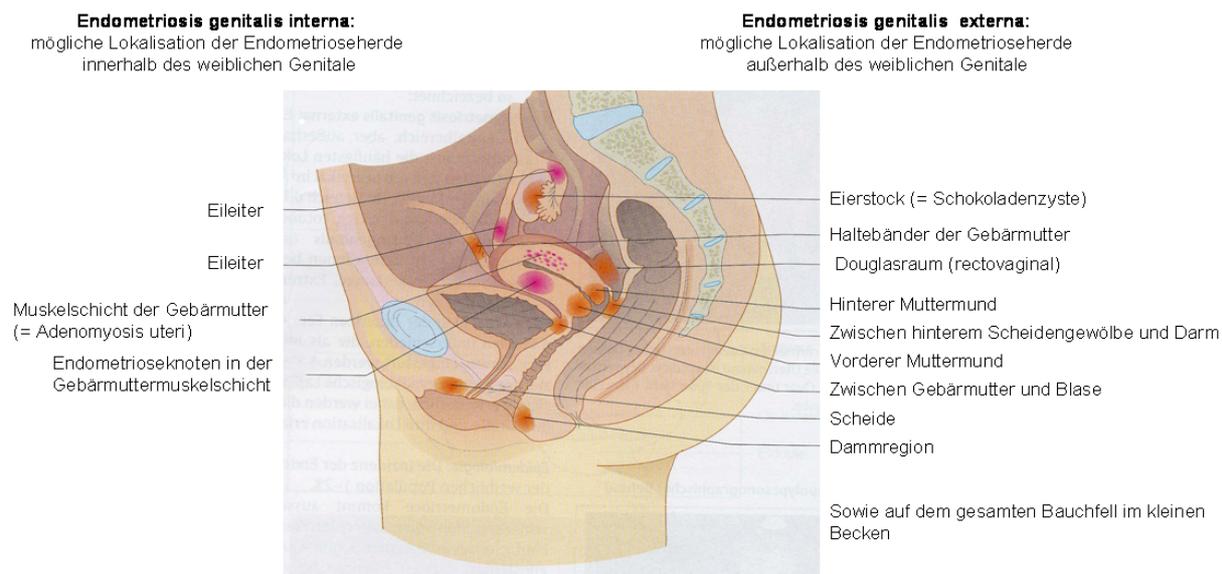


Abb.1

Abb.1 Darstellung der möglichen Lokalisationen von Endometrioseläsionen

Es gibt bislang kein einheitliches Klassifikationssystem, das sich auf alle Lokalisationen der endometriotischen Läsionen bezieht. Die am meisten verwendete Klassifikation ist die „*Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996*“ (rASRM), bei der die Endometriosis genitalis externa in vier Stadien eingeteilt wird (1997). Für diese Einteilung werden die Anzahl, die Ausdehnung in cm² und Lokalisationen der endometrioiden Läsionen im kleinen Becken (Ovar, Tube, Peritoneum) dokumentiert. Zudem wird die Infiltrationstiefe der Läsionen bestimmt, aber auch die Art, wie z.B. filmig oder fest, der Adhäsionen im kleinen Becken werden berücksichtigt. Der Befund wird mittels eines Punktesystems charakterisiert. Aus der Punktzahl wird der Schweregrad, bzw. das Stadium der Endometriose ermittelt (I = gering, II = mäßig, III = schwer, IV = ausgedehnt).

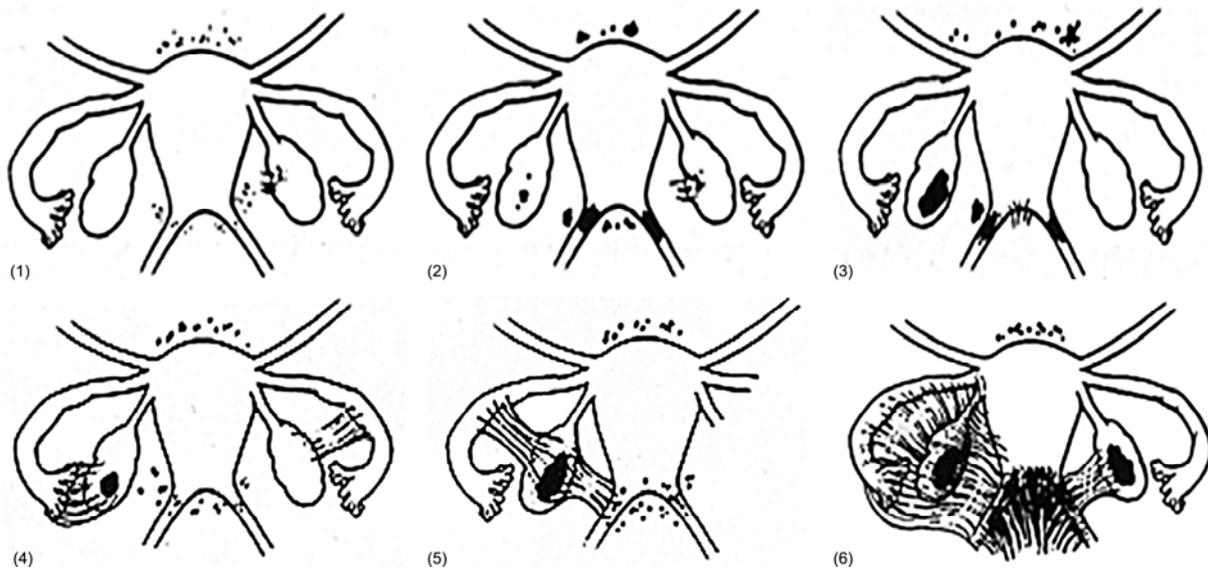


Abb.2 Stadieneinteilung nach rASRM Klassifikation. Das Stadium I (1,2) ist gekennzeichnet durch wenige Herde und annähernd keine Verwachsungen. Im Stadium II (3,4) ist ein stärkerer Befall des Peritoneums und des Ovars sichtbar. Das Stadium III (4,5) kann sich ergeben durch eine noch höhere Anzahl der Herde, größere Schokoladenzysten und stärkere Verwachsungen. Im Stadium IV können stärkste Verwachsungen und große Schokoladenzysten auftreten ebenso wie ein starker peritonealer Befall; die Organfunktion kann stark beeinträchtigt sein.

Diese Klassifikation berücksichtigt aber weder die Aktivitätsmerkmale der peritonealen Herde, noch Läsionen an anderen Bereichen wie Vagina, Douglasraum, Darm, Blase oder die Symptomatik der Patientinnen. Die ESHRE Richtlinie legt für die Diagnose und Behandlung der Endometriose die ASRM Einteilung für die Stadieneinteilung zugrunde (Barlow et al., 2005).

1.1.4 Symptomatik und Therapieansätze der Endometriose

Die Endometriose zeigt eine Vielzahl von Symptomen, die meist in Kombination auftreten. Zu den Leitsymptomen gehören Schmerzen und Infertilität, wobei ca. 50% der Endometriosepatientinnen keine Schmerzsymptomatik zeigen (D'Hooghe et al., 2003; Vercellini, 1997). Zur Schmerzsymptomatik gehören

- Unterbauchschmerz (zyklisch oder azyklisch)
- Dysmenorrhoe (Schmerzen bei der Menstruation)
- Dyspareunie (Schmerzen beim Geschlechtsverkehr)
- Dyschezie (Schmerzen beim Stuhlgang)
- Dysurie (Schmerzen beim Wasserlassen)

(Damario et al., 1995).

Das Auftreten der einzelnen Schmerzsymptome kann zum Teil mit der Lokalisation der Endometrioseherde assoziiert sein, wie z.B. Dyschezie bei Darmbefall oder Dyspareunie bei rectovaginalen Endometriose (Crosignani et al., 2006; Keckstein et al., 2005). Der Schweregrad der Schmerzen korreliert aber nicht mit dem Stadium der Endometriose.

Die Endometriose-assoziierte Infertilität und Sterilität stellen außerordentlich gravierende persönliche, klinische und gesellschaftliche Probleme dar. Man geht davon aus, dass bis zu 30-70% aller Kinderwunschpatientinnen eine Endometriose unterschiedlicher Stadien aufweisen, die nicht selten erst im Rahmen der Infertilitätsdiagnostik diagnostiziert wird (Ebert, 2003).

Da die Symptome der Endometriose sehr facettenreich sind, muss diese Erkrankung auch sehr individuell therapiert werden. Die Wahl der Therapieoption ergibt sich aus dem Schweregrad der Endometriose, dem Beschwerdebild und den Wünschen der Frau im Hinblick auf einen aktuellen oder späteren Kinderwunsch. Therapieoptionen sind die operative und die medikamentöse Therapie der Endometriose, wobei die operative Laparoskopie zur Diagnosestellung bislang als Goldstandard gilt. Die medikamentöse Therapie teilt sich in zwei Bereiche. Zum einen gibt es die endokrine Behandlung zur ‚Austrocknung‘ der Östrogenabhängigen Endometrioseläsionen und zum anderen die Schmerzreduktion (Donnez et al., 1996; Fedele et al., 2004; Halis et al., 2006). Hinzu kommen komplementäre Behandlungsmaßnahmen wie z.B. Traditionelle Chinesische Medizin, Homöopathie, Entspannungstechniken, u.a.. Folgende hormonelle Therapiestrategien stehen derzeit zu Verfügung (s. Tab.):

- Gestagene (auch als Intrauterin Pessar (IUP))
- Orale Kontrazeptiva (auch im Langzeitzyklus)
- GnRH-Analoga (Agonisten/Antagonisten)
- Danazol (obsolet)

Tab. 1 Übersicht über die endokrinen Therapieoptionen der Endometriose

	Wirkungsweise	biologischer Effekt	unerwünschte Wirkungen
Gestagene, auch als IUP	Partielle Hemmung der Ovarialfunktion	Erzeugung eines, lokalen, azyklischen Milieus, Atrophisierung des Endometriums	Zwischenblutungen Durchbruchblutungen, Gewichtsprobleme, Wasserretention, Kopfschmerzen
Orale Kontrazeptiva Gestagenbetontes Einphasenpräparat	Hemmung der Ovulation und der endogenen Sexualsteroidproduktion	Antiproliferative Eigenschaften, Erzeugung eines azyklischen Milieus, Ruhigstellung der Ovarien	Hautprobleme Kopfschmerzen Gewichtszunahme

GnRH-Analoga ggf. mit add-back- Therapie	Antigonadotroper Effekt durch Downregulation der FSH- und LH-Rezeptoren der Hypophyse, Supprimierung der Ovarialfunktion	Erzeugung einer künstlichen Menopause	Klimakterische Beschwerden, Abnahme der Knochendichte (Vermeidung durch add- back-Therapie)
Danazol	Antigonadotroper Effekt auf hypophysärer Ebene	Erzeugung eines azyklischen, hypoöstrogenen Milieus	Androgene Erscheinungen, Veränderung Leberenzyme, obsolet aufgrund des Nebenwirkungsprofils

Da die operativen und die endokrinen Behandlungsmöglichkeiten, insbesondere in der Rezidivprophylaxe, unbefriedigend sind, bedarf es dringend neuer Therapieoptionen. Einige neue Ansätze werden zurzeit für eine Therapie der Endometriose evaluiert. In der endokrinen Behandlung stehen derzeit selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren (SERM), wie auch selektive Progesteron Rezeptor Modulatoren (SPRM), Gonadotropin-releasing Hormon Antagonisten und Östrogen Rezeptor beta-Agonisten in der Diskussion (Crosignani et al., 2006; Fedele et al., 2004). Neue Ergebnisse der Grundlagenforschung zeigen nicht endokrine Therapieoptionen auf wie den Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren, Matrix Metalloprotease-Inhibitoren, Immunmodulatoren und anti-inflammatorische Therapien, die nicht nur eine symptomatische Behandlung der Endometriose, sondern für die Zukunft eine kausale, heilende Therapie bieten könnten (Chlouber et al., 2006).

1.2 Rezeptor-Tyrosinkinasen der EGF Rezeptor-Familie

Die EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor, epidermal growth factor) Rezeptoren stellen eine Familie von membranständigen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der Klasse I (RTK) dar, die durch Bindung spezifischer Liganden die Zellproliferation und –differenzierung von Zielzellen beeinflussen können.

1.2.1 Aufbau der EGF Rezeptoren

Die EGF Rezeptor-Familie besteht aus vier transmembranären Rezeptoren: EGFR (HER-1/ erbB-1), HER-2 (human epidermal growth factor receptor/erbB-2/neu), HER-3 (erbB-3) und HER-4 (erbB-4) (Yarden,Slivkowski, 2001). Die Rezeptoren sind strukturell eng verwandt, wobei EGFR ein 170 kDa Protein ist, HER-2 185kDa, HER-3 160 kDa und HER-4 165 kDa besitzen. Ihr Aufbau umfasst eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (N-Terminus), eine hydrophobe transmembranäre Domäne und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (C-Terminus).

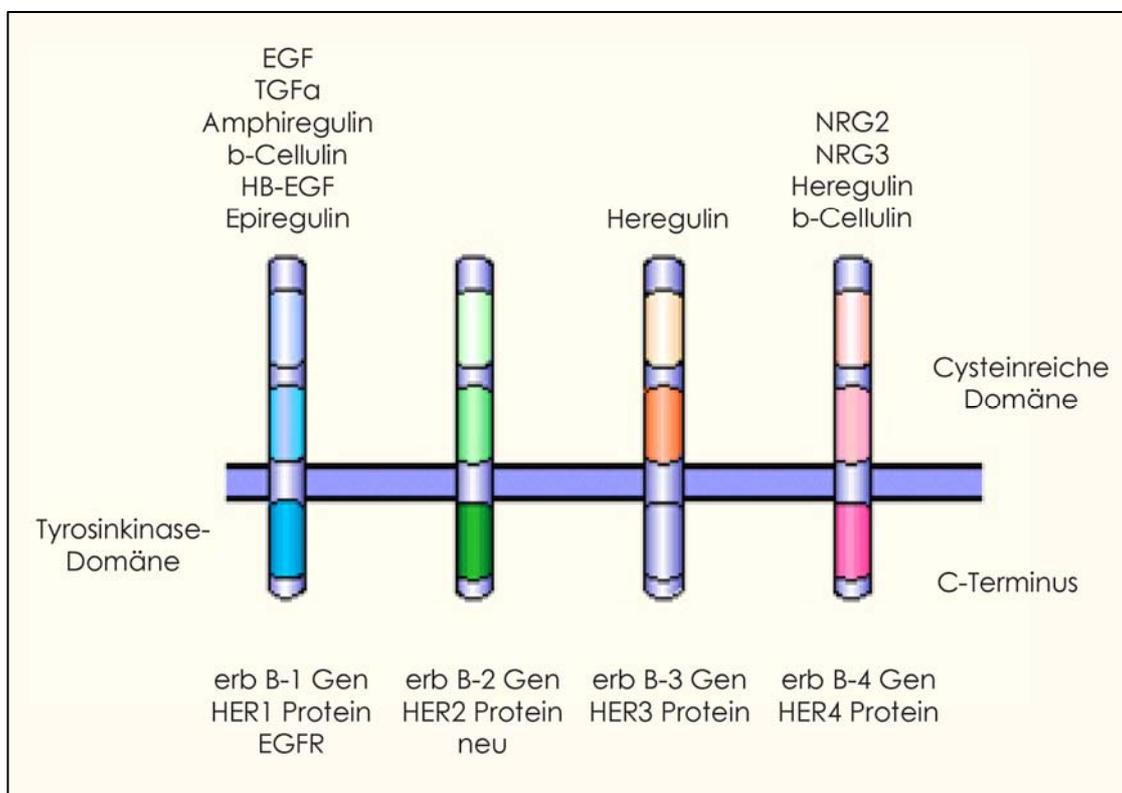


Abb.3 Aufbau der EGF Rezeptoren und Darstellung ihrer Liganden. Die EGF Rezeptoren Familie besteht aus vier transmembranären Rezeptoren, EGFR (HER-1) und HER-2 bis -4, oder auch erbB-1 bis-4. Sie besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle, eine transmembranäre Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Die Rezeptoren besitzen spezifische Liganden, wobei für HER-2 noch kein Ligand identifiziert werden konnte.

Der HER-3-Rezeptor weist allerdings eine gestörte Tyrosinkinase auf und ist daher als Homodimer inaktiv (Citri et al., 2003). Die EGF Rezeptoren bilden Homo- oder Heterodimere, wodurch die weitere Aktivierung induziert wird. Die Aktivierung und Dimerisierung der EGF Rezeptoren können durch eine Reihe von spezifischen Liganden induziert werden. Zu ihnen zählen der EGF (epidermal growth factor) und weiterhin TGfα (transforming growth factor α), Amphiregulin (AR), die Neureguline (NRG 1-4, NRG 1 = new differentiation factor/heregulin), Betacellulin, Epiregulin und HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor). Diese Liganden weisen unterschiedliche Affinitäten für die Bindung an die Rezeptoren auf. So binden EGF, Amphiregulin und TGfα mit hoher Affinität an den EGFR. Betacellulin, HB-EGF und Epiregulin binden ausschließlich an EGFR und HER-4. NRG1 und NRG2 sind Liganden sowohl für HER-3 als auch für HER-4, wobei die Neureguline NRG3 und

NRG4 spezifisch an HER-4 binden. Für HER-2 konnte bislang noch kein physiologischer Ligand identifiziert werden (Abb.3) (Marmor et al., 2004).

1.2.2 Vorkommen und physiologische Funktion der EGF Rezeptoren

Die EGF Rezeptoren werden in Zellen mesenchymalen, epithelialen und neuronalen Ursprungs exprimiert und sind daher ubiquitär im humanen Organismus verteilt. Sie steuern Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse und regulieren das Zellwachstum, die Proliferation und die Apoptose (Holbro et al., 2004). In adulten Organismen sind die EGF Rezeptoren zumeist in epithelialen Zellschichten zu finden, wobei hier hauptsächlich EGFR in der Regulierung des Zellwachstums oder der Regeneration von epitheliale Gewebe, z.B. der Haut, der Lunge oder des Gastrointestinaltraktes eine Rolle zu spielen scheint (Yarden, Sliwkowski, 2001). Des Weiteren wird EGFR, HER-2 und HER-4 eine entwicklungsabhängige Schlüsselfunktion am Wachstum, an der Differenzierung und der Laktation der Brustdrüse sowohl während der Pubertät als auch während der Schwangerschaft zugeschrieben (Carpenter, 2003; Olayioye et al., 2000; Stern, 2003).

1.2.3 Signaltransduktion der EGF Rezeptoren

Durch Ligandbindung an einen der EGF-Rezeptoren, kommt es im ersten Schritt der Aktivierung zur Dimerisierung von Rezeptormonomeren. Dabei können entweder zwei EGFR (Homodimer) oder ein EGF-Rezeptor mit einem anderen Rezeptor aus der EGF Rezeptor-Familie zum Heterodimer dimerisieren (Yarden und Sliwkowski, 2001). HER-2 gilt als der bevorzugte Dimerisierungspartner der anderen EGF Rezeptoren, zudem zeichnen sich HER-2-Heterodimere durch eine erhöhte Ligandenaffinität und längere Rezeptoraktivierung aus (Hynes et al., 2005). Interessanterweise ist der defizitäre HER-3 der bevorzugte Dimerisierungspartner von HER-2 und dieses Heterodimer stellt sich zudem als besonders potenter Signalgeber dar (Citri et al., 2003). Als Folge der Dimerisierung wird die intrinsische Tyrosinkinase aktiviert, die in der intrazellulären Domäne des Rezeptormoleküls lokalisiert ist. Die Aktivierung erfolgt durch Autophosphorylierung beider Tyrosinreste des Rezeptordimers. An die phosphorylierte Stelle binden zytoplasmatische Botenproteine und leiten so eine Reihe von komplexen Signalkaskaden ein (Olayioye et al., 2000).

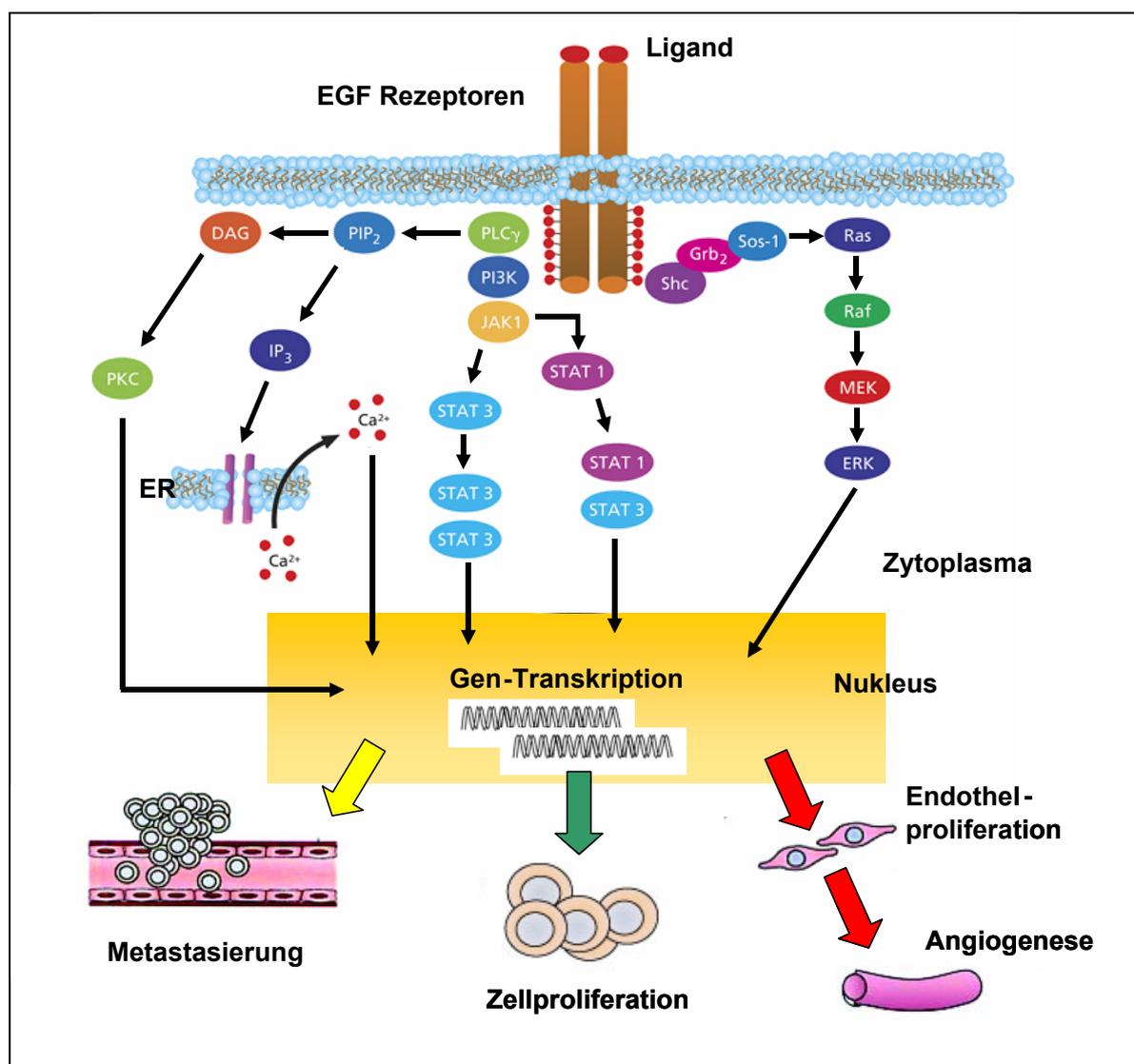


Abb.4: Schematische Darstellung der EGF Rezeptor-Signalwege. Bindung eines Liganden an die EGF Rezeptoren bewirken eine Rezeptordimerisierung und anschließende Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase der Rezeptoren. Die dadurch aktivierte Signalkaskaden resultieren in Veränderungen der Transkription. Steigerung der Zellproliferation, Angiogenese sowie Tumormetastasierung sind die Folge (modifiziert nach Harari, 2004).

Dies können z.B. durch Ras-Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinasen (MAPK), STATs (**S**ignal **T**ransducers and **A**ctivators of **T**ranscription), aber auch durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und AKT (Proteinkinase B) vermittelte Signalwege sein. Endpunkte dieser Kaskaden sind Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die z.B. die Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, aber auch Metastasierung und Angiogenese steuern. Nach erfolgter Aktivierung werden die Rezeptor-Liganden-Komplexe internalisiert und anschließend entweder recycelt oder abgebaut (Yarden und Sliwkowski, 2001).

1.2.4 Bedeutung der EGF Rezeptoren in der Onkologie

Die EGF Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung und der Progression von verschiedenen malignen Tumoren. Häufig ist mit einer Überexpression von EGFR und/oder HER-2 eine schlechte Prognose bei Tumoren zu beobachten, das prominenteste Beispiel ist wohl die HER-2-Expression beim Mammakarzinom.

Zur Tumorentstehung tragen unter anderem bei

- Überexpression der EGF Rezeptoren
- Überproduktion von endogenen Liganden.

Mutationen und Deletionen in den für die EGF Rezeptoren kodierenden Genen, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptoren führen und so maligne Transformationen unterstützen (Holbro et al., 2004; Olayioye et al., 2000).

Die Stimulation der EGF Rezeptoren durch die oben angegebenen Faktoren führt je nach Tumorart zu einem verstärkten Wachstum, Metastasenbildung, Angiogenese und auch zu Resistenzen gegenüber Chemo- und Hormontherapien, was eine Behandlung noch zusätzlich erschwert (Salomon et al., 1995; Wells, 1999). Zudem konnte bei einer Koexpression von EGFR und HER-2 im Vergleich zur alleinigen Expression die Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps in verschiedenen Tumoren, wie z.B. des Ovars, der Brust oder der Blase beobachtet werden, welcher sich negativ auf die Prognose der Tumoren auswirkt (Normanno, Bianco et al., 2003).

1.2.4.1 Bedeutung der EGF Rezeptoren im Mammakarzinom

Die Expressionen der EGF Rezeptoren, hauptsächlich die von EGFR und HER-2, im Mammakarzinom haben eine große klinische Bedeutung, da die EGFR- und HER-2-Überexpression mit einer verkürzten Lebensdauer einhergeht. Die HER-2 Überexpression ist mit einer biologischen Charakterisierung von besonders aggressiven Tumoren assoziiert und geht daher mit einer schlechten Prognose einher (Hudelist et al., 2003). Zudem korreliert die Antiöstrogenresistenz beim Östrogenrezeptor (ER)-positiven Mammakarzinom mit einer Überaktivierung der EGF Rezeptoren. Die Ursache für die Ausbildung einer primären, bzw. die Entwicklung einer sekundären Antiöstrogenresistenz, insbesondere dem selektiven ER-Modulator Tamoxifen gegenüber, ist noch nicht geklärt. Antiöstrogene unterdrücken die ER-Signaltransduktion (Freiss et al. 1990), wobei sie die Expression von EGFR und

HER-2 stimulieren (Yarden et al., 1996). Ein enger *cross talk* zwischen dem System der EGF Rezeptoren und dem ER-System ist mehrfach beschrieben worden (Britton et al., 2006; Schiff et al., 2004). So führt die Heterodimerisierung von EGFR und HER-2 in Tamoxifen-resistenten Tumorzellen zur Aktivierung der MAPK, was mit einer Phosphorylierung des ER einhergeht, der dadurch Liganden-unabhängig aktiviert wird (Britton et al., 2006). Aber auch die Aktivierung des ER durch Östrogen oder Tamoxifen kann über eine vermehrte Stimulation von Liganden des EGFR eine überschießende Aktivierung der EGF Rezeptoren hervorrufen (Osborne et al., 2005). So konnte eine inverse Expression von ER und EGFR/HER-2 und eine reduzierte Expression von EGFR-Liganden gezeigt werden (McClelland et al., 2001). Die EGFR/HER-2-Signaltransduktion ermöglicht den Zellen, ihr Wachstum ER-abhängig oder -unabhängig zu sichern (Fischer et al., 2003). Die Benutzung dieses *survival pathways* wird als möglicher Mechanismus diskutiert, über den die Zellen einen hormonresistenten Phänotyp entwickeln können oder ein solcher selektiert wird (McClelland et al., 2001; Yarden, Wilson et al., 2001). Die Kotherapie mit Tamoxifen und Herceptin (monoklonaler Antikörper gegen die Ligandenbindungsstelle des HER-2) eines östrogenabhängigen Mammakarzinoms mit HER-2-Überexpression ist mittlerweile Standard. Auch die Therapie mit weiteren Inhibitoren der EGF Rezeptoren scheint eine sehr viel versprechende Therapieoption zu sein, um hormonabhängige Tumore, welche eine endokrine Resistenz entwickelt haben, effektiv behandeln zu können (Nicholson et al., 2003).

1.2.5 Bedeutung der EGF Rezeptoren für die Tumorthherapie

In der Diagnostik ist z. Zt. hauptsächlich die Überexpression von EGFR und HER-2 von Bedeutung und daher auch bestimmend für die Therapieentscheidung bei bestimmten Tumorentitäten, z.B. EGFR-Expression bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes oder HER-2 beim Mammakarzinom. Daher stellt die Inhibition der EGF Rezeptoren einen interessanten Ansatzpunkt in der selektiven Tumorthherapie dar. Die Funktionalität und Aktivität der EGF Rezeptoren ist auf verschiedene Weisen beeinflussbar. Zwei Klassen von Arzneistoffen haben Eingang in die Tumorthherapie erhalten:

- Inhibitoren der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne der EGFR (Tyrosinkinaseinhibitoren, TKI), wie z.B. Erlotinib (Tarceva™) (Ciardiello et al., 2005; Mamot, 2003; Normanno, Maiello et al., 2003) sowie

- Monoklonale Antikörper (Mab), die gegen die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle der Rezeptoren gerichtet sind, wie z.B. Cetuximab (Erbix) bei EGFR, Trastuzumab (Herceptin™) bei HER-2 Überexpression beim Mammakarzinom (Gschwind et al., 2004; Hynes et al., 2005).

In der Entwicklung befinden sich außerdem

- Methoden zur Inhibierung der Expression der EGF Rezeptor Gene durch Antisense-Oligonukleotide sowie
- Antikörperbasierte Immunokonjugate, wie Immunotoxine, Immunoradionukleotide und Immunoliposomen (Ciardiello et al., 2001; Grunwald et al., 2003; Mamot, 2003).

1.3 Zielsetzung

Die aktuellen Hormontherapien bei Endometriose führen zu einem relativen Östrogenentzug und darüber zu einem 'funktionellen Knock-out' des Östrogenrezeptors, der in Endometriosezellen exprimiert wird. Die Rezidivraten sind hoch und zudem sind die medikamentösen Therapien der Rezidive meist ineffektiv (Waller et al., 1993). Die Klinik weist auf die Entwicklung von Resistenzmechanismen hin. So findet man in GnRH-downregulierten oder endokrin-vorbehandelten Patientinnen gelegentlich vitale Endometrioseläsionen mit hohen Proliferationsraten. Denkbar ist, dass aufgrund der reduzierten Stimulation des Östrogenrezeptor-Systems (ERS) die Proliferationsaktivität der vitalen Endometrioseherde durch andere Signaltransduktionssysteme stimuliert wird. Wie bereits beschrieben, fungiert das EGFR-System in verschiedenen Malignomen als *survival pathway* und eine inverse Relation zwischen dem ERS und dem EGFR-System konnte für bestimmte Mammakarzinome nachgewiesen werden (Yarden, 2001). Die Ausschaltung des ER-Systems könnte auch im Endometriosegewebe eine Hochregulation von EGF Rezeptoren induzieren und somit zur Selektion aggressiver, hormonresistenter, HER-exprimierender Zellklone führen. Diese können möglicherweise verantwortlich für die hohen Rezidivraten und auch die Progression der Endometriose unter hormoneller Therapie sein.

Das Ziel des Promotionsvorhabens ist es daher, die Rolle der EGF Rezeptoren in der Endometriose zu evaluieren und eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem EGFR-System und dem ERS zu untersuchen.

Die Aufklärung dieser Zusammenhänge könnte langfristig zu einem neuen Ansatz in der medikamentösen Endometriosetherapie führen und somit einen wichtigen Beitrag zum Wohle der Patientinnen leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Die Frauen wurden zur Diagnosesicherung der Endometriose oder aufgrund einer symptomatischen Endometriose, bzw. von Endometriose-assoziierten Beschwerden wie Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhoe, Dyschezie und Dyspareunie laparaskopiert oder laparotomiert. Alle Frauen waren prämenopausal. Die jeweiligen Zyklusphasen wurden durch Korrelation des angegebenen Datums der letzten Menstruation und dem histologischen Befund des Endometriums, bestimmt nach Dallenbach-Hellweg, ermittelt. Die Stadieneinteilung der Endometriose wurde nach der überarbeiteten Klassifikation der American Society of Reproductive Medicine (rASRM) vorgenommen. Patientinnen mit zusätzlich malignen Tumoren wurden von der Probenentnahme ausgeschlossen.

Die klinischen Daten der Patientinnen wurden im Endometriosezentrum Berlin, Klinik für Gynäkologie, Charité-CBF, erhoben und in Tabelle I dargestellt.

Tab. 2 Übersicht klinische Daten der Endometriosepatientinnen

	Peritoneale Läsionen (n=48)	Ovarielle Endometriose (n=12)	Rectovaginale Endometriose (n=32)
Alter (Mittelwert)	32	36	36
rASRM Stadium			
Stadium 1	17	0	3
Stadium 2	12	1	2
Stadium 3	11	2	3
Stadium 4	8	9	18
Zyklusphase			
Proliferative Phase	21	6	4
Sekretorische Phase	11	1	7
Menstruelle Phase	5	0	9
andere	11	5	11
Therapie			
keine	23	9	9
orale Kontrazeptiva	12	1	1
GnRH-Analoga	11	2	2
* Keine Angaben n=1		*** Keine Angaben n=3	
** Keine Angaben n=2		**** Keine Angaben n=4	

2.2 Materialgewinnung und Probenentnahme

Die in dieser Studie untersuchten Gewebeproben wurden gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin gewonnen.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden peritoneale Endometriose-läsionen (n=48), Endometriosezysten des Ovars (n=12) und rectovaginale Endometrioseknoten (n= 22) entnommen und in 4%iger Formalinlösung für 12 Stunden fixiert und in dem Institut für Pathologie, Charité-CBF in Paraffin eingebettet.

Des Weiteren wurden ovarielle Endometriosezysten (n=20) für das Anlegen von Primärzellkulturen entnommen und unmittelbar nach Entnahme unter sterilen Bedingungen in Kulturmedium gegeben (Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin).

2.3 Immunhistochemische Färbungen

2.3.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Für die Untersuchung über die Lokalisation der Antigene im Endometriosegewebe werden Paraffinschnitte verwendet. Zur Herstellung wird das Gewebe in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken können dann mit dem Mikrotom 2-5 µm dicke Stufenschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht werden. Diese Schnitte wurden über Nacht bei 37° C getrocknet und konnten mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden oder sofort für die Immunhistochemie verwendet werden.

2.3.2 Entparaffinierung

Nach völligem Trocknen und nach Koagulation des Eiweißes im Trockenschrank bei 60° C werden die Paraffinschnitte zum Herauslösen des Paraffins für 2 mal 5 Minuten in Xylol gestellt. Danach werden sie jeweils 10 min in Aceton, Aceton/Tris-Puffer (1:1) und schließlich in Tris-Puffer rehydriert. Die Schnitte standen nun für die Färbungen zur Verfügung.

2.3.3 Antigen-Demaskierungsverfahren am Gewebeschnitt

Ein Verfahren zur Antigen-Demaskierung ist die Mikrowellenvorbehandlung (Dianova) der Schnitte. Bei diesem Verfahren wurden die Schnitte auf den Objektträgern zunächst 120 min in einem Trockenschrank „gebacken“ (60°C), dann in Küvetten gestellt, diese mit einem 0,1 M Citratpuffer, pH 6,0 aufgefüllt und 17 min in der Mikrowelle gekocht. Nach der Erhitzung wurden die Gewebeschnitte 20 min bei RT belassen, bevor dann zügig mit der immunhistochemischen Färbung fortgefahren werden konnte.

Für den Nachweis des EGFR-Antigens wurden die Schnitte anstelle der Denaturierung unter Hitzeeinwirkung enzymatisch mittels Proteinase K (DakoCytomation) vorbehandelt.

2.3.4 Immunhistochemische Färbungen

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte nach dem Antigen-Demaskierungsverfahren mit FKS für 30 min bei RT vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde lediglich überschüssiges FKS vom Schnitt abgeklopft, anschließend der jeweilige Primärantikörper aufgebracht und für eine Stunde in einer feuchten Kammer (*humidified chamber*) bei RT inkubiert.

Für den Nachweis der EGF Rezeptoren wurden folgende Antikörper in den angegebenen Verdünnungen (in Tris Puffer) verwendet:

- monoklonaler Antikörper gegen EGFR (Klon E 30, DakoCytomation), Verdünnung 1:20
- polyklonaler Antikörper gegen HER-2 (DakoCytomation), Verdünnung 1:50
- polyklonaler Antikörper gegen HER-3 (Santa Cruz Biotechnology), Verdünnung 1:40
- polyklonaler Antikörper gegen HER-4 (Santa Cruz Biotechnology), Verdünnung 1:25

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte sieben- bis zehnmal mit Tris Puffer gespült und mit den jeweiligen Sekundärantikörpern für eine weitere Stunde inkubiert. Für den EGFR-Antikörper wurde biotinyliertes Kaninchen-anti-Maus IgG (Dianova, Verdünnung 1:400 in Tris Puffer) verwandt, für die HER-2, -3, -4 - Antikörper biotinyliertes Maus-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Verdünnung 1:400 in Tris Puffer). Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gespült und mit Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin (Roche Diagnostics, Mannheim; Verdünnung 1:400 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Agent) für 30 min inkubiert und nach erneutem waschen mit Tris Puffer mit dem Fuchsin Substrate-Chromogen System (DakoCytomation) visualisiert. Abschließend wurde mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) für 25 s gegengefärbt und die Schnitte in Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt.

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse aufgrund unspezifischer Antikörperbindung wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch Tris Puffer ersetzt. Als Positivkontrollen wurden Gewebeschnitte von Haut (EGFR), invasiv-duktales Mammakarzinom (HER-2) und Plazenta (HER-3, -4) eingesetzt.

Die immunhistochemischen Färbungen von HER-3 und HER-4 an peritonealen Endometrioseläsionen wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Eilika Müller

hergestellt. Die Darstellung des ER α und des Proliferationsmarkers Ki67 in allen untersuchten Gewebeschnitten wurde von dem Institut der Pathologie, Charité-CBF übernommen und freundlicher Weise für eine Korrelation mit den EGF Rezeptoren zur Verfügung gestellt.

Tab.3 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper

Bezeichnung	gerichtet gegen Spezies	Hersteller	Ca.-No
monoklonal anti-EGFR Verdünnung 1:20	Mensch	DakoCytomation	M7239
polyklonal anti-HER-2 Verdünnung 1:50	Mensch	DakoCytomation	A 0485
polyklonal anti-HER-3 Verdünnung 1:40	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-285
polyklonal anti-HER-4 Verdünnung 1:25	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-283

Sekundärantikörper

Name	gegen Primärantikörper	Hersteller	Ca.-No
Biotin-SP-konjugiertes IgG Verdünnung 1:400	Kaninchen-anti-Maus	Dianova	315-065-045
Biotin-SP-konjugiertes IgG Verdünnung 1:400	Maus-anti-Kaninchen	Dianova	211-065-109

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zelllinien

Für die Untersuchungen wurde die Endometriosezelllinie 12Z, die freundlicherweise von Frau Prof. Anna Starzinski-Powitz, Johann-Wolfgang-von Goethe-Universität, Frankfurt a.M., zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Diese Zelllinie wurde in *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) (Biochrom, Berlin), unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (Biochrom, Berlin) und 1% L-Glutamin (Biochrom, Berlin), bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Weitere Vorgehensweisen sind unter 1.3.3 und 1.3.4 beschrieben.

2.4.2 Etablierung eines *in vitro*-Modells von endometriotischen Primärzellen

2.4.2.1 Gewinnung und Kultivierung von primären Endometriomzellkulturen

Unmittelbar nach der operativen Entnahme wurden die Endometriome unter sterilen Bedingungen in Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10% FKS, 1% P/S und 1% Glutamin, gegeben. Für die Herstellung von Primärkulturen wurden die Zysten zunächst mit *phosphate buffered saline* (PBS) (pH 7,4) gewaschen, mit einem

Skalpell ausgekratzt, zerkleinert und die Gewebesuspension mit 20ml Enzymmix, bestehend aus Collagenase und Dispase in PBS, versetzt. Das Gewebe wurde bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad für 45 min verdaut. Anschließend wurde der Ansatz mit 20ml Kulturmedium verdünnt und bei 1800 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die vereinzelt Zellen in Kulturmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch 2x wiederholt. Dann wurden die Zellen wie unter Punkt 1.3.4 quantifiziert und auf 6-well Platten ausgesät.

2.4.2.2 Passagierung

Nachdem ein Konfluenzgrad von ca. 80-90% erreicht war, wurden die 12Z mit PBS gespült und mit je 2 mL Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) Lösung pro Kulturflasche (75 cm²) bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Zellen mit Hilfe einer Pipette mechanisch abgelöst, vereinzelt und resuspendiert. Die 12Z wurden in mit Kulturmedium befüllten Flaschen ausgesät (Gesamtvolumen 15 mL). Die Passagierung erfolgte jeweils von 1 auf 4 Kulturflaschen.

Die Primärzellen wurden nicht passagiert, da sie sonst den Rezeptor ER α verlieren. Zudem konnten sie nicht länger als sieben Tage in Kultur gehalten werden, da die Epithelzellen sonst von den Stromazellen überwachsen wurden und der Charakter der Mischkultur verloren ging.

2.4.2.3 Quantifizierung

Die Primärzellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 pro 2 ml eingesetzt, die als optimal für einen Versuchsaufbau über vier Tage ausgetestet wurde. Die 12Z wurden als 5×10^6 pro well ausgesät. Für die Zählung der Zellen in Suspension wurde ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) verwendet. Nachdem ein Deckgläschen unter Ausbildung von Newtonringen auf die Zählkammer gedrückt worden war, wurde ein Tropfen der gut homogenisierten Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Zur Bestimmung der Zellzahl pro mL, wurden vier große Quadrate ausgezählt, der Mittelwert berechnet und mit 10^4 multipliziert. So konnten für die Versuche ähnliche Zellkonzentrationen eingesetzt werden.

2.4.3 Versuchsaufbau für die Expressionsanalyse der EGF Rezeptoren und des ER α mittels Westernblot

Die Endometriose ist eine östrogenabhängige Erkrankung und die medikamentöse Therapie begründet sich z. Zt. auf einen Östrogenentzug zum ‚Austrocknen‘ der Endometrioseläsionen. Die Rezidivrate ist mit 50-80% innerhalb von fünf Jahren sehr hoch und es scheint sich ein aggressiverer Phänotyp auszubilden, der noch schlechter durch Östrogenentzug behandelbar ist. Somit gibt es neben dem ER-System noch ein weiteres System, welches den Endometriosezellen das Überleben unter Östrogenentzug sichert. Dieses System könnte das EGFR-System sein, da es auch in anderen Tumoren als *survival pathway* unter Östrogenentzug fungiert, z.B. beim Mammakarzinom. Grundsätzlich sollte daher mit dem Versuchsprotokoll die Rolle der EGF Rezeptoren in der Endometriose näher charakterisiert werden und im Speziellen sollte der Einfluss von Östrogen auf die Zellen an sich und das EGFR-System durch Östrogengabe sowie einen Östrogenentzug in einem *in vitro*-Modell untersucht werden. Zunächst wurde die Funktionalität des EGFR-Systems mittels Gabe von EGF, einem Liganden des EGFR-Systems, und Östrogen getestet, um dann die zeitabhängigen Effekte eines Östrogenentzuges mit biochemischen Methoden wie Westernblot und PCR zu analysieren und auszuwerten. Dafür wurden Monolayerkulturen von primären Endometriozellkulturen und von der Endometriosezelllinie 12Z auf 6-well Platten ausgesät und für 24h mit Mangelmedium (DMEM mit 1% P/S für Primärzellen; DMEM mit 1% P/S und 5% steroidhormonfreies Serum für 12Z) kultiviert. Als Medium wurde phenolrotfreies DMEM gewählt, da Phenolrot östrogene Eigenschaften aufweist und somit die Untersuchungsergebnisse verfälschen könnte.

Es wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

1. Die Zellen werden nach 24h Kultivierung mit Mangelmedium mit PBS gewaschen und anschließend mit DMEM, mit 10% steroidhormonfreiem FKS, 1% P/S, 1% Glutamin versetzt, unter Zusatz von Ethanol als Vehikelkontrolle weiterkultiviert. Nach weiteren 24h, 48h und 72h werden die Zellen morphologisch untersucht, fotografiert und nach Waschen mit PBS lysiert. Dabei wurden ein spezieller Lysepuffer verwendet, um die Zellen mittels Westernblot weiter untersuchen zu können. Als Kontrolle werden Zellen mit DMEM (Zusammensetzung wie oben angegeben), dem jetzt in Ethanol gelöstes 17 β -Östradiol (10^{-8} mg/ml) zugesetzt ist, ebenfalls für 24h, 48h und 72h kultiviert. Die Kontrollansätze werden wie auch die Versuchsansätze

morphologisch untersucht, fotografiert und lysiert, um anschließend mittels Westernblot analysiert zu werden.

2. Um weiterhin zu überprüfen, ob die unter Teil 1 beobachteten Ergebnisse tatsächlich östrogenabhängig sind, wurde die Zellen im zweiten Teil mit Östradiol und zeitgleich mit einem ER α -Blocker behandelt, um feststellen zu können, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf eine östrogene Regulation zurückzuführen sind.

2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.5.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Die auf Deckgläschen gewachsenen primären Endometriomzellen werden mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden sie 10 min mit 20% Paraformaldehydlösung inkubiert, anschließend mit PBS 3x gespült. Um die Zellmembran zu permeabilisieren und somit für die Antikörper durchgängig zu machen, werden die Zellen mit 0,1% Triton X-100-Lösung für 10 min inkubiert und anschließend 3x gewaschen.

2.5.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Die Zellen werden mit *Dako Protein Block Serum-Free* (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) für 30 min vorinkubiert, um unspezifische Bindungen abzublocken. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Inkubation mit einem Gemisch der jeweiligen primären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur (RT).

Für den Nachweis der EGF Rezeptoren und des ER α wurden folgende Antikörper in den angegebenen Verdünnungen (in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Agent, DakoCytomation) verwendet:

- monoklonaler Antikörper gegen EGFR (Clone H 11, DakoCytomation), Verdünnung 1:20
- polyklonaler Antikörper gegen EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Verdünnung 1:20
- polyklonaler Antikörper gegen HER-2 (DakoCytomation), Verdünnung 1:50
- polyklonaler Antikörper gegen HER-3 (Santa Cruz Biotechnology), Verdünnung 1:20
- polyklonaler Antikörper gegen HER-4 (Santa Cruz Biotechnology), Verdünnung 1:20

- Polyklonaler Antikörper gegen ER α (Santa Cruz Biotechnology), Verdünnung 1:20

Endometriose ist definiert als Vorkommen von Endometrium-ähnlichem Gewebe (Drüsen- und Stromazellen) außerhalb des Uterus. Auch glatte Muskelzellen sind in den Läsionen beschrieben worden. Zudem wird der Endometriose die Eigenschaft der Invasivität zugeschrieben, welche mit einem Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin zusammenhängt.

Für die Charakterisierung der Endometriom-Primärzellkulturen wurden Doppelfärbungen von der EGF Rezeptoren und ER α mit Zytokeratin (Marker für Epithelzellen), Vimentin (Marker für Stromazellen), *smooth muscle Actin* (Marker für glatte Muskelzellen) und E-Cadherin (Marker für Adhäsionsmoleküle) durchgeführt und es wurden folgende Antikörper in den angegebenen Verdünnungen (in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Agent, DakoCytomation) verwendet:

- monoklonaler Antikörper gegen Vimentin (Clone Vim 3B4, DakoCytomation), Verdünnung 1:100
- monoklonaler Antikörper gegen Zytokeratin (Clone MNF116, DakoCytomation), Verdünnung 1:50
- polyklonaler Antikörper gegen Zytokeratin (Santa Cruz Biotechnology), Verdünnung 1:50
- monoklonaler Antikörper gegen *smooth muscle Actin*, (DakoCytomation), Verdünnung 1:100
- monoklonaler Antikörper gegen E-Cadherin (Santa Cruz Biotechnology), Verdünnung 1:100

Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen, bevor dann die Zellen für 2 h mit dem Gemisch der beiden Sekundärantikörper bestehend aus

- CyTM-2- konjugierten- F(ab')₂ Fragment Ziege-anti-Maus (Dianova, Hamburg), Verdünnung 1:200
- Rhodamine RedTM-X-konjugiertes IgG Esel-anti-Kaninchen (Dianova), Verdünnung 1:200

bei RT inkubiert wurden.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit Fluoromount-G eingedeckelt. Die Detektion der Proteine erfolgte mikroskopisch per Immunfluoreszenz bei einer 40-100fachen Vergrößerung.

Tab.4 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper			
Bezeichnung	gerichtet gegen Spezies	Hersteller	Ca.-No
monoklonal anti-EGFR Verdünnung 1:20	Mensch	DakoCytomation	M3563
polyklonal anti-EGFR Verdünnung 1:50	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-03
polyklonal anti-HER-2 Verdünnung 1:50	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	A 0485
polyklonal anti-HER-3 Verdünnung 1:20	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-285
polyklonaler anti-HER-4 Verdünnung 1:20	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-283
polyklonal anti-E-Cadherin Verdünnung 1:100	Mensch	Santa Cruz	sc-7870
monoklonal anti-Zytokeratin Verdünnung 1:100	Mensch	DakoCytomation	M0821
polyklonal anti-Zytokeratin Verdünnung 1:100	Mensch	DakoCytomation	A0575
monoklonal anti-Vimentin Verdünnung 1:100	Mensch	DakoCytomation	M0725
monoklonal anti-smActin Verdünnung 1:100	Mensch	DakoCytomation	M0851
polyklonal anti-ER alpha Verdünnung 1:100	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-542
Sekundärantikörper			
Name	gegen Primärantikörper	Hersteller	Ca.-No
Cy TM 2-konjugierte F(ab') ₂ Fragment Verdünnung 1:200	Ziege-anti-Maus	Dianova	115-226-062
Rhodamine Red TM -X-konjugiertes IgG Verdünnung 1:200	Esel-anti-Kaninchen	Dianova	711-295-152

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Transfektion der 12Z-Zelllinie

2.6.1.1 Transfektion

Da die Endometriosezelllinie nachweislich keinen ER α auf Proteinebene besitzt, wurde für eine Vergleichbarkeit der Versuche mit den Endometriose-Primärzellen und den Einfluss dieses Rezeptors auf die Morphologie der Zellen und das EGFR-Systems der ER α in die 12Z-Zellen transfiziert.

Dazu wurden die über drei Tage in Mangelmedium kultivierten Zellen abgelöst, in DMEM mit 1% P/S als Zusatz resuspendiert, quantifiziert und zu 400 μ l-Ansätzen in die Elektroporationsküvetten pipettiert.

Folgende Mengen der Plasmide wurden hinzugesetzt

- ER α : 1,04 μ g / μ l , für einen Einsatz von 6 μ g Zugabe: 5,77 μ l Plasmid
- β -Gal: 0,845 μ g / μ l, für einen Einsatz von 6 μ g Zugabe: 7,1 μ l Plasmid

- pCMv Neo: 0,92µg /µl, für einen Einsatz von 6µg Zugabe: 6,52 µl Plasmid

Im ersten Ansatz, es wurden für den Versuchsaufbau wie unter 1.3.5 beschrieben Dreifachansätze bereitet, wurde mit ER α und β -Galactosidase als internen Standard elektroporiert. Im zweiten Ansatz wurde mit pCMv Neo als Negativkontrolle und β -Galactosidase elektroporiert. Nach Zugabe der Plasmide ruhten die Lösungen für 5 min und wurden dann bei einer Spannung von 250 Volt und einer Kapazität von 1000µF elektroporiert und erneut 5 min ruhen gelassen. Danach wurden die Zellen in die jeweiligen Medien des Versuchsaufbaus (unter 1.3.5) gegeben.

2.6.1.2 Messung der Transfektionseffizienz

Die β -Galactosidase wurde als interner Standard bei dieser Transfektion benutzt, mit dem man die Transfektionseffizienz des Versuches bestimmen kann.

Dazu wurden die transfizierten Zellen nach 24h mit 600µl des Reporter Lysis Buffer 5x (Promega, Madison, WI, USA) für 20 min bei RT lysiert, in Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert. Anschließend wurden 50 µl vom Überstand in PCR-Gefäße pipettiert und 50 Min bei 48 °C im PCR-Cycler inkubieren. 10 µl des inkubierten Überstands wurden dann mit 70 µl Reaktionspuffer für mind. 30 min inkubiert und der Gehalt an von der β -Galactosidase umgesetzten Substrat anschließend am Fluoreszenzspektrometer gemessen.

2.7 Proteinbiochemische Untersuchungen

2.7.1 Proteinpräparation

2.7.1.1 Herstellung von Gewebehomogenaten

Die Endometriome wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in Lebermedium auf Eis gestellt, bzw. tiefgefroren.

Das Gewebe wurde mit Kochsalzlösung abgespült und homogenisiert. Dazu wurden die Endometriome in Lebermedium (5 ml/g Frischgewicht) mittels Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Staufen) zerkleinert. Anschließend wurden alle Homogenate in der Ultrazentrifuge bei 20.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Die Pellets enthielten die Rohmembranfraktionen, die Überstände lösliche, zumeist zytosolische Proteine.

2.7.1.2 Solubilisierung von Membranproteinen

Die Solubilisierung mit Triton X-100 wurde nach Josić et al. (1985) durchgeführt.

Bei -70°C eingefrorene und aufgetaute bzw. frische Membranfraktionen wurden mit dem Douncer-Homogenisator (Zeiss, Jena) homogenisiert und zentrifugiert (20.000

rpm, 20 min). Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in Solubilisationspuffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen wurde (ca. 1 mg Protein/ml). Die Suspension wurde 20x im Dounce-Homogenisator (Zeiss) homogenisiert, für mindestens 1 h auf Eis gestellt und anschließend 20 min bei 20.000 rpm zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die Triton X-100-löslichen Komponenten (z. B. Membranproteine), während im Pellet die Triton X-100-unlösliche Fraktion (zum großen Teil Zytoskelett) verblieb.

2.7.1.3 Zellyse für Westernblot

Die Endometriom-Primärzellkulturen und Endometriosezelllinie 12Z wurden zunächst 3x mit PBS gespült und anschließend mit Lysispuffer 20 min unter sanftem Schütteln abgebaut. Hierbei wurde für die Primärzellen der *Mammalian Protein Extraction Buffer* (300µl) (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet, wohingegen die 12Z mit CMR (Complete mini reagent) -Puffer (200µl) lysiert wurden. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturflasche vollständig abgekratzt und mittels einer Eppendorf Pipette (1mL) mechanisch durch Aufsaugen und Ablassen homogenisiert. Nachfolgendes Zentrifugieren (15000 Umdrehungen / min) bei 8 °C für 15 min sorgte für eine Abtrennung der löslichen Proteinfraction von Zelltrümmern bzw. Abbauresten (Pellet). Eine Lagerung des Lysats war bei –80 °C möglich.

2.7.1.4 Proteinbestimmung

Um im Westernblot die Stärke der Banden vergleichen zu können, müssen alle Proben auf die gleiche Gesamtproteinkonzentrationen eingestellt werden.

Dazu wurde eine 3-malige Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels des BCA Protein Assay Reagentkit (Pierce, Rockford, IL, USA) vorgenommen, wobei BSA als Referenzstandard diente.

2.7.1.5 Reduktion

Jeweils 20 µg der Proteinprobe, sowie 20 µg der Positivkontrollen (Zellysate der Zelllinien A431, MCF-7) wurden im Verhältnis 1:4 in SDS-Probenpuffer nach Herstelleranweisung (Invitrogen) verdünnt. Die Proben wurden für 10 min bei 75°C inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und weiterverarbeitet.

2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Abhängigkeit des Molekulargewichtes der zu analysierenden Proteine wurden für EGFR, HER-2, -3 und -4 gebrauchsfertige 3-7%ige Tris-Acetat-Gele und für ER α 4-12%ige Bis-Tris-Gele von Invitrogen verwendet. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der enthaltenen Proteine bei 150V für 1 h. Für die Elektrophorese wurde mit Aqua dest. verdünnter Laufpuffer (NuPage[®] MOPS SDS Running Buffer (20x), Invitrogen) verwendet. Als molekularer Massenstandard wurden der *Full Range RainbowTM Molecular Weight Marker* (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) und das *Biotinylated Protein Ladder Detection Pack* (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) verwendet.

2.7.3 Westernblot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nun zur Immunodetektion auf Nitrocellulosemembranen (Protan[®], Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurde das Gel in Transferpuffer zur Vermeidung der Austrocknung und Luftblasenbildung erst auf Filterpapier übertragen, dann mit der Membran überdeckt und als sogenanntes „Sandwich“ in die Transfereinheit gebracht. Unter Wasserkühlung erfolgte die Übertragung der Proteine auf die Membran in Transferpuffer bei 30 V für 55 min.

Die Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4-8 °C in mit 10% fettfreier Trockenmilch (nonfat dried milk, NFDM; Bio-Rad, München) gegeben und anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper, der spezifisch gegen das Zielprotein gerichtet war, für 1 h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte mit 5% fettfreier Trockenmilch im Verhältnis 1:1000. Zur Detektion des ER α wurde zunächst 3h mit 5% NFDM blockiert und anschließend über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4-8°C inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers wurden die Membranen 3x 10-15 min mit einem 0,5%igen Tween 20-PBS- Gemisch gespült und anschließend mit den Sekundärantikörpern für 1 h bei RT inkubiert. Hierbei handelte es sich je nach verwendetem Primärantikörper um mit Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova) bzw. Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (Dianova), die im Verhältnis 1:5000 in 5% fettfreier Trockenmilch verdünnt wurden. Es erfolgte ein abschließendes Waschen (3-5 x 30 min in PBS mit 0,5% Tween 20). Dann wurde die Blotmembran mit dem *ECLTM Westernblotting*

Detection Reagent Kit (Amersham, Braunschweig) für 1 min inkubiert. Zur Detektion wurde ein Röntgenfilm Hyperfilm™ ECL (Amersham) für verschiedene Zeiten (10 min, 24h) aufgelegt.

Tab.5 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Westernblot Analyse

Primärantikörper

Bezeichnung	gerichtet gegen Spezies	Hersteller	Ca.-No
polyklonal anti-EGFR Verdünnung 1:1000	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-03
polyklonal anti-HER-2 Verdünnung 1:1000	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-284
polyklonal anti-HER-3 Verdünnung 1:1000	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-285
polyklonal anti-HER-4 Verdünnung 1:1000	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-283
polyklonal anti-ER alpha Verdünnung 1:1000	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-542
polyklonal anti-Actin Verdünnung 1:1000	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616

Sekundärantikörper

Name	gegen Primärantikörper	Hersteller	Ca.-No
Peroxidase-konjugiertes IgG Verdünnung 1:5000	Kaninchen-anti-Maus	Dianova	315-035-047
Peroxidase-konjugiertes IgG Verdünnung 1:5000	Ziege-anti-Kaninchen	Dianova	111-035-144
Peroxidase-konjugiertes IgG Verdünnung 1:5000	Kaninchen-anti-Ziege	Dianova	305-035-047

2.8 Statistik

Aufgrund des unbalancierten Designs der Daten und dem Fehlen einer Referenzgruppe, wurde für die statistische Analyse der erhobenen Daten eine Varianzanalyse mit dem generellen linearen Modell (GLM) verwendet. Mit diesem Auswertungsmodell konnte bestimmt werden, welche Parameter Einfluss auf die Expression der untersuchten Rezeptoren hatten. Als Parameter gelten die Therapie, das Stadium der Endometriose, die Zyklusphase und die Expressionen von ER α und dem Proliferationsmarker Ki67. Zudem wurde zwischen uni- und multivariaten Varianzanalysen unterschieden, um Zusammenhänge zwischen den Parametern und den jeweiligen einzelnen Rezeptoren (univariat) oder auf die Gruppe der Rezeptoren (multivariat) aufzudecken, wobei das Modell nur mit Haupteffekten definiert wurde. Die aufgetretenen signifikanten Unterschiede wurden zusätzlich mit einem Post Hoc-Dunnett-Test untersucht, um diese weiter zu charakterisieren. Da für die wenigen Fälle der Lokalisation 2 (ovariell) kein GLM gefunden werden konnte, kam in diesem Falle der Kruskal-Wallis-Test (nichtparametrischer Test für mehrere unabhängige

Variablen) und zur weiteren Spezifikation anschließend der Mann-Whitney-Test zum Einsatz. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Die klinischen Daten, die subjektiv den Schmerz beschreiben, wurden rein deskriptiv mit dem χ^2 -Test untersucht und dargestellt.

2.9 Lösungen, Puffer und Medien

2.9.1 Lösungen

Enzymmix (Gewebeverdau)	0,5 mg Collagenase A 0,33 mg Dispase 1 in 20 mL PBS
20%ige Paraformaldehydlösung	0,4 g Paraformaldehyd ad 10 mL PBS
0,1%ige Triton X-100 Lösung	0,1 mL Triton X-100 Lösung in PBS
Perfusionslösung	150,0 mM NaCl 0,5 mM CaCl ₂
Lebermedium	1,0 mM NaHCO ₃ 0,5 mM CaCl ₂
5%/10% Trockenmilch-Lösung (NFDM)	5 g/10 g in 100mL fettfreier Trockenmilch

2.9.2 Puffer

PBS (phosphate buffered saline) pH 7,6	PBS Dulbecco Instamed in Aqua dest.
50mM Tris Puffer pH 7,4-7,6 (5L)	34,25 g Trizma [®] HCl 4 g Trizma [®] Base 43,9 g NaCl

Die pH-Einstellung erfolgte mit HCl/NaOH

10mM Citratpuffer pH 6,0

Lösung A

0,1 M Zitronensäure (21.01g in 1000 mL Aqua dest.)

Lösung B

0.1 M NaCitrat (29,41g in 1000 mL Aqua dest.)

18mL Lösung A und 82 mL Lösung B ad 1000 mL Aqua dest.

Solubilisationspuffer

150 mM NaCl
1 mM MgCl₂
1 mM CaCl₂
10 mM Tris/HCl, pH 7,8
1% Triton X-100
Aqua bidest.

1fach TAE-Puffer (pH 8,0)

40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA

CMR Puffer (Zelllyse Westernblot)

CMR Complete mini reagent (1 Tabl.)
5 µg 200 µM Sodium Orthovanadat
10 µl IGEPAL
50 mM Tris-HCl Puffer ad 10 ml

Transferpuffer

50 mL NuPage[®] Transfer Buffer (20x)
200 mL Methanol
750 mL Aqua bidest.

Waschpuffer (Westernblot)

0,5% Tween-20 in PBS oder
0,1% Tween-20 in PBS

2.9.3 Medien

Wachstumsmedium	Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000 µg/mL) 1% Glutamin (200 mM)
-----------------	--

Als Mangelmedium wurde für die Primärzellkultur oben angegebenes Medium ohne FKS, für die 12Z mit auf 5% verringertem FKS-Gehalt Medium verwandt.

Versuchsmedium	DMEM (phenolrotfrei) 10% steroidhormonfreies FKS 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000 µg/mL) 1% Glutamin (200 mM) 10 ⁻⁸ m Ethanol absolut (Vehikelkontrolle) 10 ⁻⁸ m 17β-Östradiol in Ethanol (Kontrolle)
----------------	---

Elektroporationsmedium	DMEM (phenolrotfrei) 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000 µg/mL)
------------------------	--

2.10 Geräte

Accu Jet (Pipettierhilfe)	Brand, Wertheim
Analysenwaage Navigator TM	Ohaus, Giessen
Autoklav, Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 25 Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bidestanlage GFL 2102	GFL, Burgwedel
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Canon PowerShot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Douncer	Zeiss, Jena
Flow bench NU 425-400	NuAire, Plymouth, MN, USA
Heizschrank/Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke und Kunkel, Taufen
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroliterzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Walldorf
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena
Power Ease Power Supply	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schwenker Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Schüttler 3005	GFL, Burgwedel
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke und Kunkel, Taufen
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu Europa, Duisburg
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge eppendorf centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Ehret, Emmendingen
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Heraeus, Hanau
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
Universalzentrifuge Labofuge 400R, Rotor 70.1 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
XCell II™ Blot Module Kit CE Mark	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.11 Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland
Aerosol Resistant Tips verschiedene Größen	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
Agarose	Pierce, Rockford, IL, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calcium Chlorid (CaCl ₂)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CMR Complete mini reagent	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako® Antibody Diluent with Background Reducing Agent	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako® Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläschen	Ansell, München
DermaClean, nicht sterile Einmal-Untersuchungshandschuhe	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dispase 1	Feather Safety Razor Co., pfm, Köln
Disposable Scalpel sterile	Biochrom, Berlin
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
ECL™ Westernblotting Detection Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Epidermal Growth Factor	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf T.I.P.S., verschiedene Größen	Merck, Darmstadt
Ethanol (96%) reinst	Becton Dickinson Labware,, Franklin Lakes, NJ USA
Ethanol (70%)	Becton Dickinson Labware,, Franklin Lakes, NJ USA
Falcon Serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25 mL	Biochrom, Berlin
Falcon Tubes 25 und 50 mL	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Fetales Kälberserum	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Fluoromount-G	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
Fuchsin Substrate-Chromogen-System	Biochrom, Berlin
Full Range Rainbow	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
L-Glutamin (200 mM)	Tocris Biosciences, Ellisville, MO, USA
Hyperfilm™ ECL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
ICI 182,780	
Ipegal CA-630	

Isopropanol	Steinheim
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Plastipur® sterile Kochsalzlösung	Merck, Darmstadt
	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Kollagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) min 99,0%	Merck, Darmstadt
	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Pierce, Rockford, IL, USA
Methanol	
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) min 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Schleicher und Schüll,
Nitrocellulose Membran	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Novex™ Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x)	Nunc, Wiesbaden
Nunc EasyFlask™ 25, 75, 150 cm ²	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Zellkulturschalen 8,8 und 21,5 cm ²	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Novex Bis-Tris Gel	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Novex Tris-Acetate Gel 3-8%	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
17-Beta Östradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	American National Can,
Parafilm	Neenah, WI, USA
	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Brand GmbH + Co, Wertheim
Pasteur Pipetten	Biochrom, Berlin
PBS Dulbecco Instamed	
	Biochrom, Berlin
PBS Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/mL	Plano, Wetzlar
Polyethylenbecher	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protease Inhibitor Cocktail	
	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Proteinase K	
	Brand GmbH + Co, Wertheim
Reaktionsgefäße	Promega, Madison, WI, USA
Reporter Lysis Buffer 5x	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium Orthovanadat	
	Braun, Melsungen
Softa-Man®	

Sterilfilter Millex® GP	Millipore, Bedford, MA, USA
sterile Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
steroidhormonfreies fetales Kälberserum	c.c.pro, Neustadt/W
Streptavidin-AP Coniugate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trizma® Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma® Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizol®	Bio-Rad, München
Trockenmilchpulver (Non-Fat Dry Milk)	Biochrom, Berlin
Trypsin / EDTA Solution in PBS 0,05% / 0,02% (w/v) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Bio-Rad, München
Tween® 20	J.T. Baker, Deventer, Holland
Xylol	Biochrom AG, Berlin
Zellkultur Testplatten 6-well Platten	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber, steril	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Färbungen

3.1.1 Expressionsanalyse der EGF Rezeptoren

48 peritoneale, 12 ovarielle und 30 rectovaginale Endometrioseherde wurden mittels Immunhistochemie auf die Anwesenheit und das Expressionsmuster der vier EGF Rezeptoren untersucht. Die Färbungen wurden mittels eines Scores ausgewertet, der unter 1.5.4 beschrieben ist. Zudem wurden in den Proben der ER α -Status und die Proliferationsrate mittels eines gegen Ki67 gerichteten Antikörpers bestimmt. Die Expressionen der einzelnen Rezeptoren wurden mit der Expression des ER α und der Proliferationsrate korreliert, um eventuelle Zusammenhänge zwischen dem ER α -System darzustellen und den Einfluss der EGF Rezeptoren auf die Proliferation in den Endometrioseläsionen zu untersuchen. Zusätzlich wurden das Stadium der Endometriose, die Therapie der Patientinnen und die drei verschiedenen Lokalisationen der Endometriose als weitere Parameter für die Expression der EGF Rezeptoren berücksichtigt.

3.1.1.1 Peritoneale Endometrioseläsionen

Zum Nachweis und Untersuchung des Expressionsmusters der EGF Rezeptoren wurden peritoneale Endometrioseläsionen von 48 Patientinnen untersucht. Alle vier Rezeptoren konnten im Epithel (Drüse) nachgewiesen werden, wobei EGFR und HER-2 hauptsächlich und HER-3 und -4 ausschließlich im Zytoplasma detektiert wurden. Im Stroma wurden EGFR, -3 und -4 als ausschließlich zytoplasmatische Färbung nachgewiesen, HER-2 war nicht nachweisbar (Übersicht in Abb.5).

Die Expressionsverteilung und Intensität ist in Tab.6 zusammengefasst.

Tab.6 Zusammenfassung der Expressionsmuster der EGF Rezeptoren in peritonealen Endometrioseläsionen

	Expression	keine Fälle (%)	schwach Fälle (%)	moderat Fälle (%)	stark Fälle (%)
EGFR	Epithel	25 (52)	19 (40)	4 (8)	0
	Stroma	2 (3)	17 (35)	25 (52)	5 (10)
HER-2	Epithel	4 (7)	23 (48)	17 (35)	5 (10)
	Stroma	48 (100%)	0	0	0
HER-3	Epithel	1 (1)	16 (33)	16 (33)	16 (33)
	Stroma	35 (73)	10 (21)	3 (6)	0
HER-4	Epithel	10 (21)	18 (38)	19 (40)	1 (1)
	Stroma	46 (96)	2 (4)	0	0

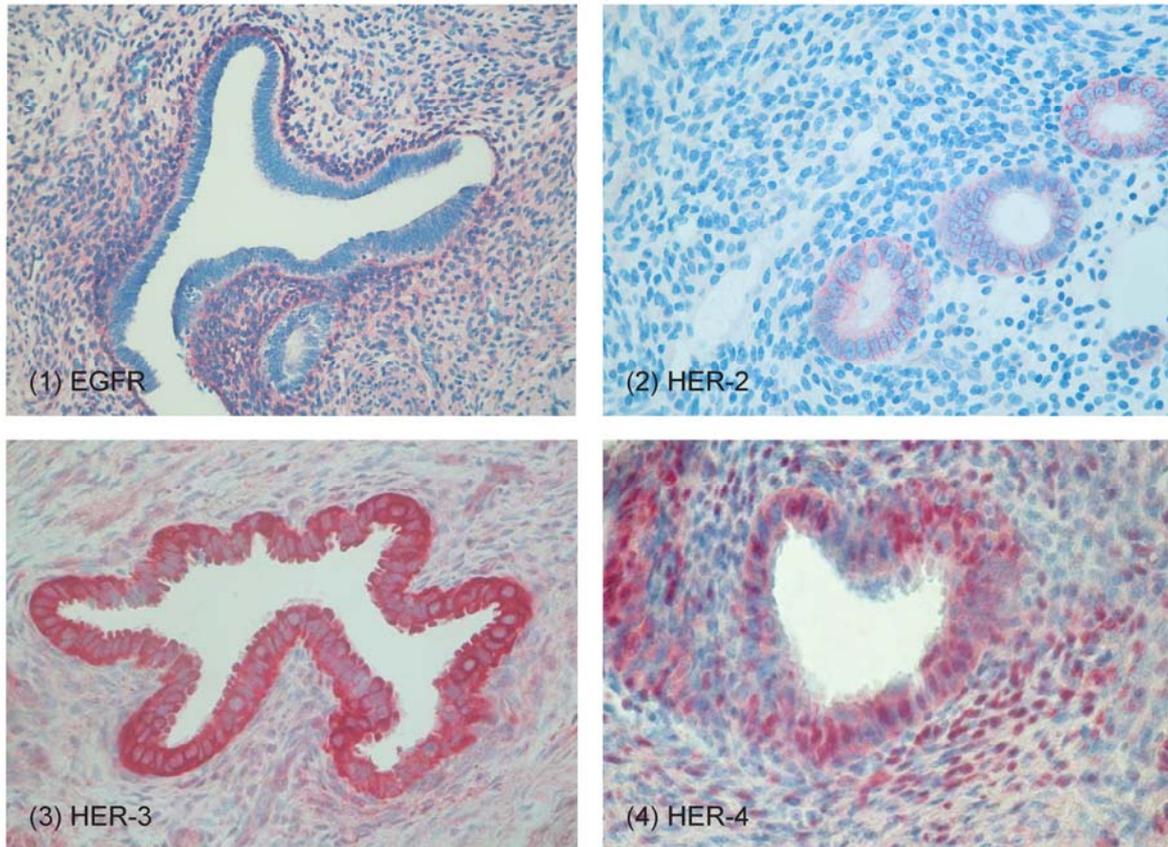


Abb.5 Darstellung der Expressionen der EGF Rezeptoren in peritonealen Endometrioseläsionen. (1) starke Expression von EGFR in den stromalen Zellen; Ausbildung eines Stromaringes; keine epitheliale Expression (2) Moderate membranständige Expression von HER-2; keine stromale Expression. (3) Starke zytoplasmatische Expression von HER-3 in den Epithelien; schwache stromale Expression. (4) Schwache zytoplasmatische und moderate nukleare Expression von HER-4 in epithelialen und stromalen Zellen.

Im Vergleich zwischen der Expression von EGFR im Epithel und im Stroma zeigt sich ein gegenläufiger Effekt (s. Diagramm). Während über die Hälfte der Fälle (25 von 48) im Epithel keine, 19 eine schwache und 4 eine moderate Expression zeigten, waren hingegen im Stroma die Läsionen hauptsächlich moderat gefärbt (24 von 48) und nur zwei von 48 zeigten keine Färbung (17 schwach, 5 stark). Die Färbungen waren bis auf wenige Ausnahmen sowohl im Stroma als auch im Epithel zytoplasmatisch. Auffällig war, dass die stromalen Zellen, die direkt am Epithel liegen, am stärksten gefärbt waren. Diese Beobachtung unter 3.1.3 nochmals gesondert betrachtet.

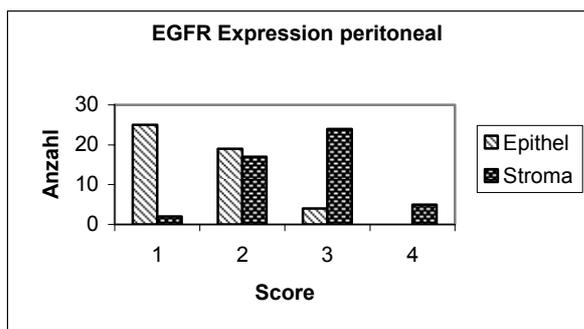


Diagramm 1

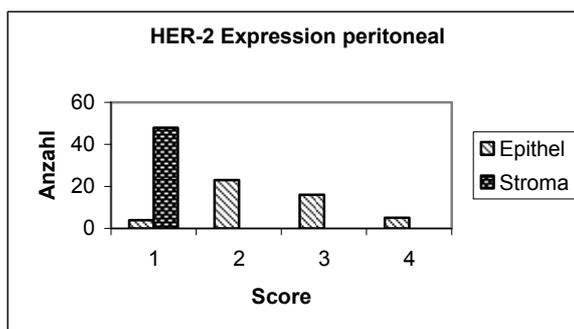


Diagramm 2

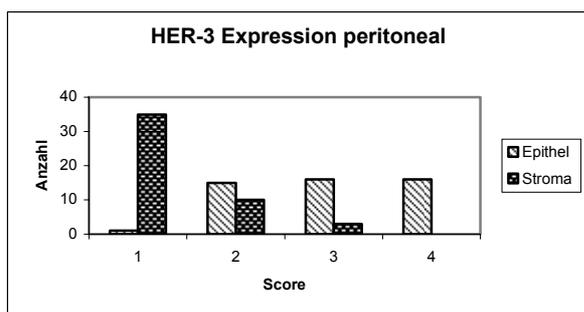


Diagramm 3

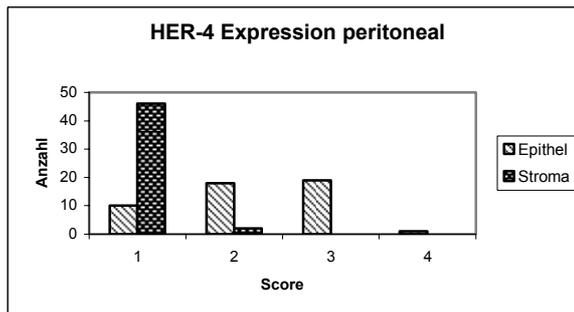


Diagramm 4

Darstellung der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von EGFR, HER-2, HER-3 und HER-4 im Vergleich im Peritoneum (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

HER-2 zeigt im Epithel der peritonealen Läsionen ebenfalls wie EGFR mit steigender Farbintensität eine abnehmende Tendenz. Jedoch ist HER-2 grundsätzlich in mehr Epithelzellen exprimiert als EGFR, wenn auch hauptsächlich schwach (48%). Auch hier war die Färbung bis auf wenige Ausnahmen zytoplasmatisch. Im Stroma konnte kein HER-2 detektiert werden (Abb.5). Die Expression von HER-3 im Epithel teilt sich mit jeweils 33% für schwach, moderat und stark homogen auf. Nur ein Fall zeigte keine HER-3 Expression im Epithel. Im Stroma hingegen konnte bei über 2/3 der Fälle keine HER-3 Expression beobachtet werden und die Anzahl der Fälle nahm mit zunehmender Expression ab (10=schwach, 3=moderat), wobei keine starke Färbung festgestellt werden konnte. Die Färbungen waren ausschließlich zytoplasmatisch (Abb.5). HER-4 zeigte wie HER-3 eine recht gleichmäßige Expression in den Epithelien der peritonealen Läsionen, wobei sich die Verteilung über keine, schwach und moderat erstreckte und somit insgesamt weniger Fälle positiv waren als bei der Expression von HER-3. Ähnlich HER-2 zeigten 96% der Fälle keine Expression von HER-4 im Stroma, lediglich zwei waren schwach zytoplasmatisch gefärbt. Auch HER-3 zeigte diese abnehmende Tendenz wohingegen EGFR hauptsächlich im Stroma exprimiert wurde (s. Diagramm). Auffällig bei der Expressionsanalyse von HER-4

war, dass über 90% der Epithelzellen und über 60% der Stromazellen eine HER-4 Kernfärbung aufwiesen (Abb.5).

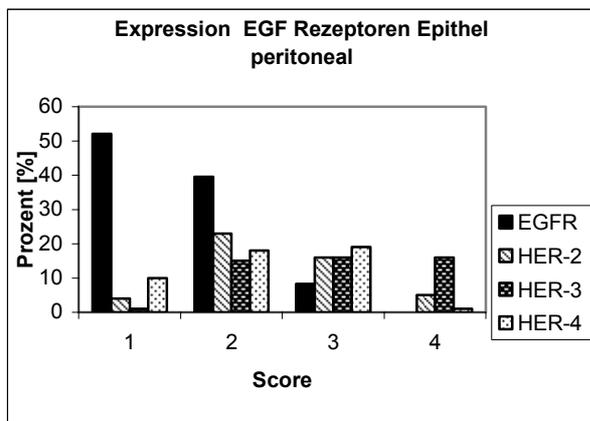


Diagramm 5

Darstellung der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von EGFR, HER-2, HER-3 und HER-4 im Vergleich im Peritoneum (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

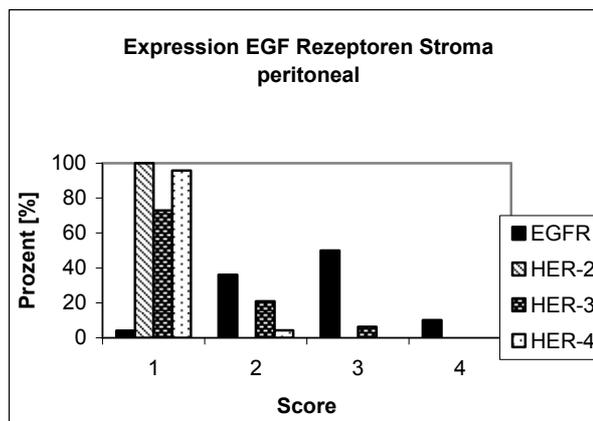


Diagramm 6

Zusammenfassend konnte man beobachten, dass der EGFR im Epithel am wenigsten exprimiert ist und HER-3 am stärksten. Das Expressionsmuster von HER-2 und HER-4 ähnelt sich (Diag 5). Bei der stromalen Expression der EGF Rezeptoren nimmt EGFR wiederum eine Sonderstellung ein, da er am stärksten von allen EGF Rezeptoren im Stroma exprimiert wird. HER-2 und HER-4 wiesen wiederum eine sehr ähnliche Expression auf (Diag. 6).

3.1.1.2 Ovarielle Endometrioseläsionen

Es wurden 12 ovarielle Endometriosezysten auf das Vorkommen und das Expressionsmuster der EGF Rezeptoren untersucht. Alle vier Rezeptoren konnten sowohl im Epithel als auch im Stroma in diesem Typ der Endometriose nachgewiesen werden. Die Färbungen waren bis auf vier Fälle von EGFR ausnahmslos zytoplasmatisch (Abb.6). Das Verteilungsmuster ist in Tab.7 dargestellt.

Tab.7 Zusammenfassung der Expressionsmuster der EGF Rezeptoren in ovariellen Endometrioseläsionen

	Expression	keine	schwach	moderat	stark
		Fälle (%)	Fälle (%)	Fälle (%)	Fälle (%)
EGFR	Epithel	7 (58)	3 (25)	2 (17)	0
	Stroma	0	3 (25)	5 (42)	4 (33)
HER-2	Epithel	3 (25)	3 (25)	5 (42)	1 (8)
	Stroma	9 (75)	2 (17)	1 (8)	0
HER-3	Epithel	0	5 (41,5)	2 (17)	5 (41,5)
	Stroma	1 (8)	5 (42)	6 (50)	0
HER-4	Epithel	0	4 (33)	6 (50)	2 (17)
	Stroma	4 (33)	6 (50)	1 (8,5)	1 (8,5)

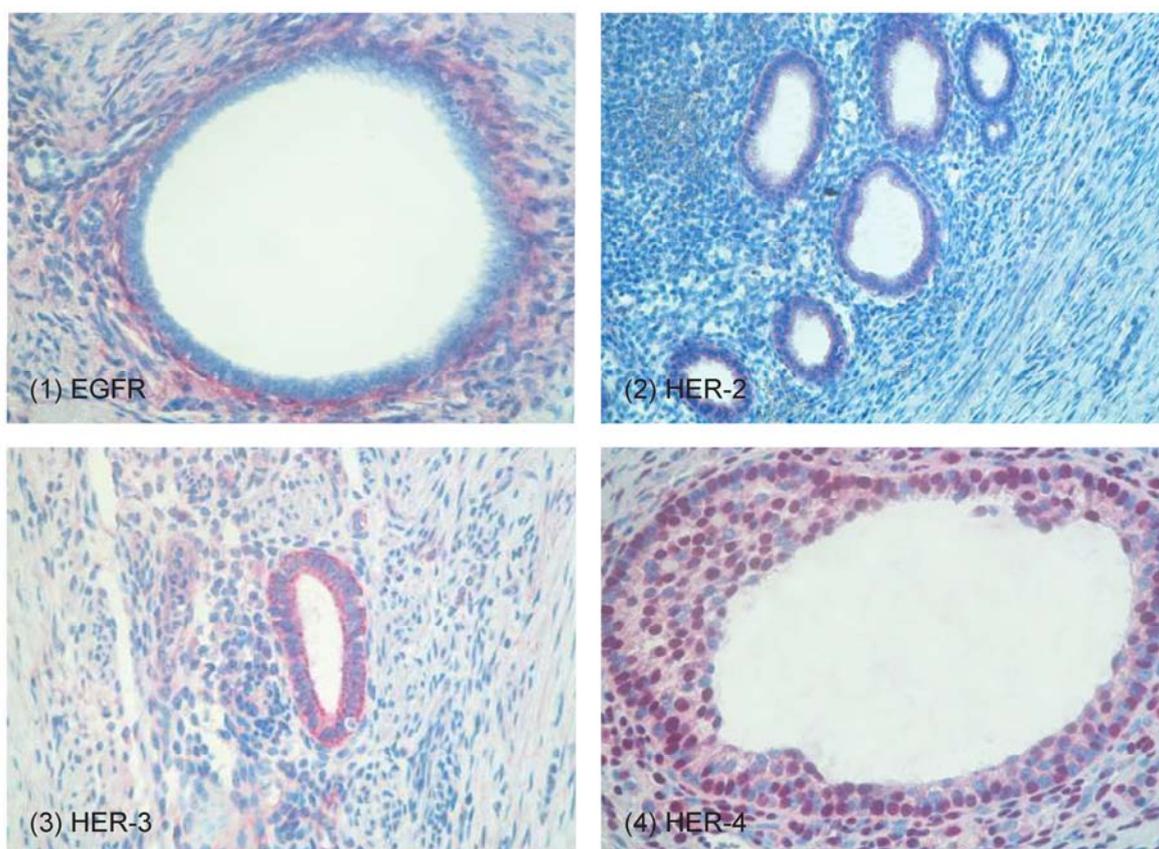


Abb.6 Darstellung der Expressionen der EGF Rezeptoren in ovariellen Endometrioseläsionen. (1) Moderate Expression von EGFR in den stromalen Zellen; Ausbildung eines Stromaringes; keine epitheliale Expression (2) Schwache, zytoplasmatische Expression von HER-2, keine stromale Expression. (3) Moderate zytoplasmatische Expression von HER-3; diffuse stromale Expression. (4) schwache zytoplasmatische und starke nukleare Expression von HER-4 in epithelialen und stromalen Zellen.

EGFR war im Epithel der ovariellen Endometrioseläsionen in über 50% der Fälle nicht exprimiert und zeigte des Weiteren einen abnehmenden Verlauf je stärker die Expression wurde. Es konnte keine starke, epitheliale Färbung beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu waren alle stromalen Zellen EGFR positiv, wobei die sich Expression relativ gleichmäßig auf schwach, moderat und stark verteilte. Die epitheliale Expression von HER-2 zeigte einen Anstieg, wobei der Höhepunkt auf der moderaten Expression lag (42%), stark war HER-2 nur 1% der Fälle exprimiert. Im Stroma war HER-2 zu 75% im Epithel nicht detektierbar. Für die verbleibenden Fälle zeigt sich lediglich eine schwache (2 von 12) und moderate (1 von 12) Färbung. HER-3 konnte in allen Epithelzellen detektiert werden, wobei die Expression sich hauptsächlich auf schwach oder stark (jeweils 5 von 12) aufteilte, 2 Fälle zeigten eine moderate Färbung. Im Stroma hingegen zeigte die HER-3 Expression einen zunehmenden Verlauf, wobei keine starke Expression beobachtet werden konnte. In allen epithelialen Zellen konnte HER-4 detektiert werden. Die Expression nimmt zunächst zu und fällt dann wieder ab, so dass hauptsächlich eine moderate Expression vorliegt (50%). Im Stroma hingegen ist HER-4 weniger stark detektierbar, der Schwerpunkt liegt bei einer schwachen Expression (6 von 12).

Es konnte auch in diesem Endometriosegewebe eine HER-4 Kernfärbung im Epithel (>90%) und im Stroma (>60%) beobachtet werden.

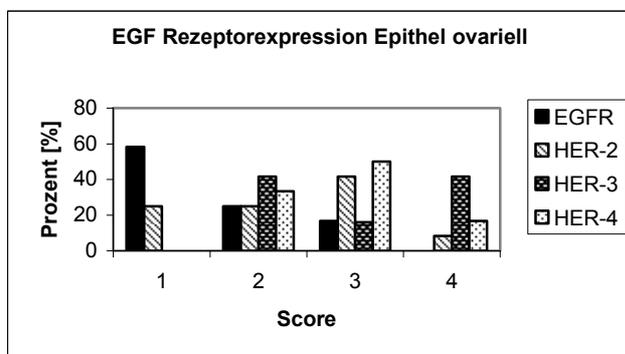


Diagramm 7

Darstellung der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von EGFR, HER-2, HER-3 und HER-4 im Vergleich in ovariellen Läsionen (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

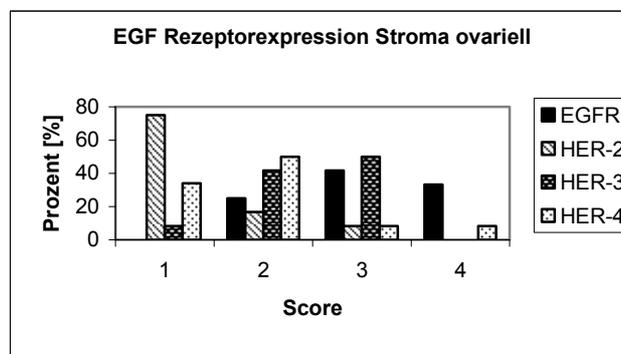


Diagramm 8

Die Zusammenfassung zeigt, dass HER-3 und HER-4 am stärksten im Epithel der ovariellen Endometrioseläsionen exprimiert werden, wobei sie ein gegenläufiges Expressionsmuster aufwiesen. EGFR und HER-2 zeigten einen ähnlichen Expressionsverlauf mit stark abnehmender Tendenz. Im Stroma waren alle EGF Rezeptoren mit Ausnahme von HER-4 stärker exprimiert als im Epithel. Die Expressionsmuster von EGFR, HER-2 und HER-4 zeigten einen glockenartigen Kurvenverlauf, wobei HER-2 und -4 nicht so stark exprimiert wurden wie EGFR. Nur

HER-3 zeigte einen Anstieg, allerdings konnte keine starke Expression detektiert werden.

3.1.1.3 Rectovaginale Endometrioseläsionen

Neben der peritonealen und ovariellen Erscheinungsform der Endometriose wurde auch die Form der rectovaginalen Endometriose auf die Anwesenheit und das Expressionsmuster der EGF Rezeptoren hin untersucht. Auch hier konnten alle vier Rezeptoren im epithelialen und stromalen Kompartiment der Läsionen nachgewiesen werden. Die Rezeptoren waren ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb.7). Tab. 7 fasst die Expressionsdaten zusammen.

Tab.7 Zusammenfassung der Expressionsmuster der EGF Rezeptoren in rectovaginalen Endometrioseläsionen

	Expression	keine	schwach	moderat	stark
		Fälle (%)	Fälle (%)	Fälle (%)	Fälle (%)
EGFR	Epithel	6 (19)	16 (49)	6 (19)	4(13)
	Stroma	1(3)	8 (25)	13 (41)	10 (31)
HER-2	Epithel	5 (16)	18 (58)	7 (13)	1 (3)
	Stroma	28 (90)	3 (10)	0	0
HER-3	Epithel	0	0	7 (23)	23 (77)
	Stroma	8 (27)	14 (46)	6 (20)	2(7)
HER-4	Epithel	0	3 (9)	14 (44)	15 (47)
	Stroma	13 (43)	9 (29)	7 (23)	2 (6)

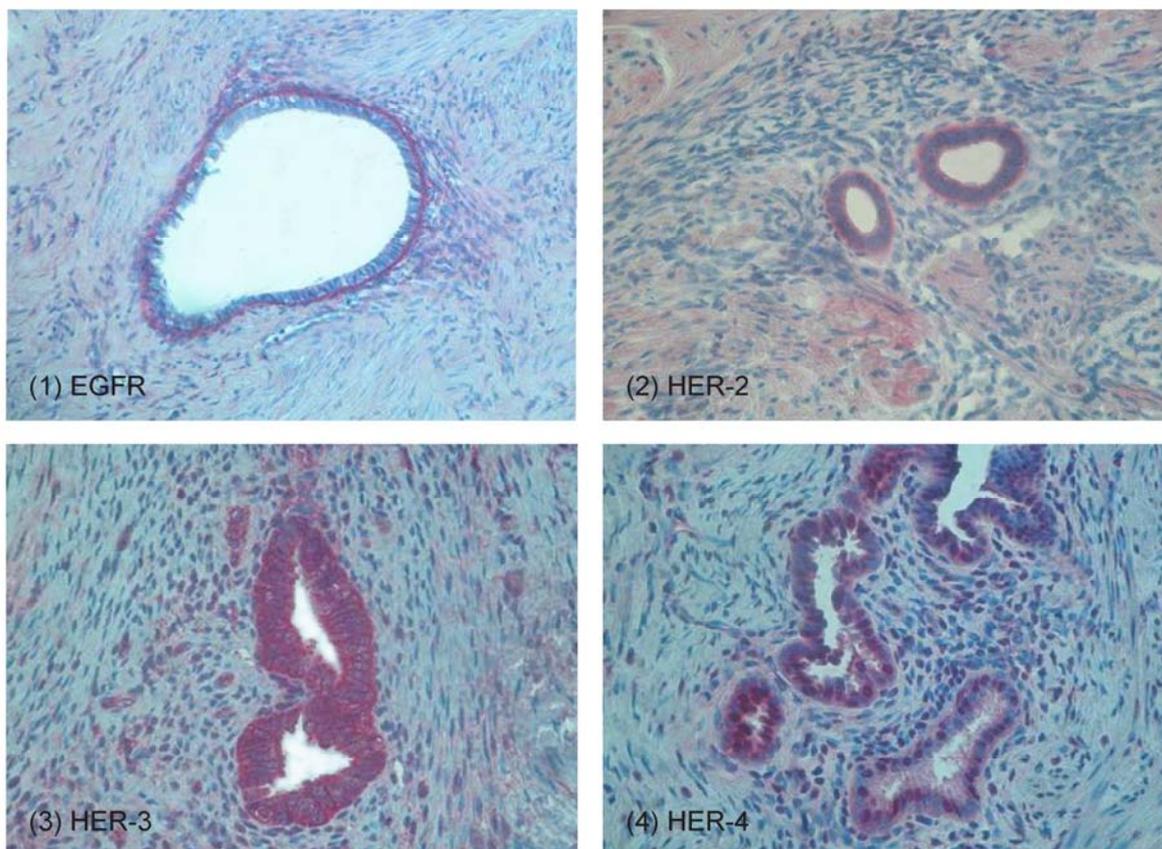


Abb.7 Darstellung der Expressionen der EGF Rezeptoren in rectovaginalen Endometrioseläsionen. (1) Starke Expression von EGFR in den Stromalen Zellen; starke Ausbildung eines Stromaringes, keine epitheliale Expression (2) Moderate zytoplasmatische Expression von HER-2 in den Epithelien; keine stromale Expression. (3) Starke zytoplasmatische Expression von HER-3 in den Epithelien; diffuse, schwache stromale Expression. (4) schwache zytoplasmatische und starke nukleare Expression von HER-4 in epithelialen Zellen; keine stromale zytoplasmatische Expression, moderate nukleare Expression in den Stromazellen.

Das Expressionsmuster von EGFR zeigte im Epithel wie auch im Stroma zunächst einen Anstieg der Expression, wobei EGFR in den epithelialen Zellen hauptsächlich schwach exprimiert ist (58%). In den Stromazellen hingegen ist EGFR stärker exprimiert, wobei die meisten Fälle in der moderaten Expression lagen (41%). HER-2 im Epithel hauptsächlich schwach exprimiert (58%) und im Stroma ist HER-2 zu 90% nicht detektierbar. Die Expression von HER-3 im Epithel war stark ansteigend und nur im moderaten (23%) und starken (77%) Bereich zu finden, wohingegen HER-3 im Stroma zu über 70 % lediglich schwach bis gar nicht exprimiert wird. HER-4 war in 100% der Fälle im Epithel detektierbar und zeigte hauptsächlich eine moderate (44%) bis starke (47%) Expression. Im Stroma hingegen zeigt sich ein umgekehrter Verlauf, die Expression von HER-4 ist stark abnehmend und zu 47% konnte kein HER-4 detektiert werden.

Auch hier konnte eine starke Kernfärbung durch HER-4 im Epithel (auch hier >90%) und Stroma (ebenfalls >60%) beobachtet werden.

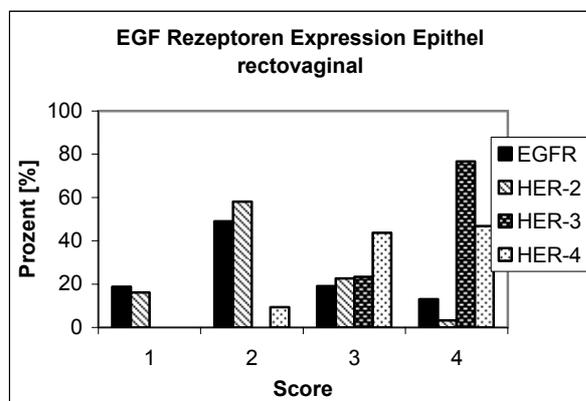


Diagramm 9

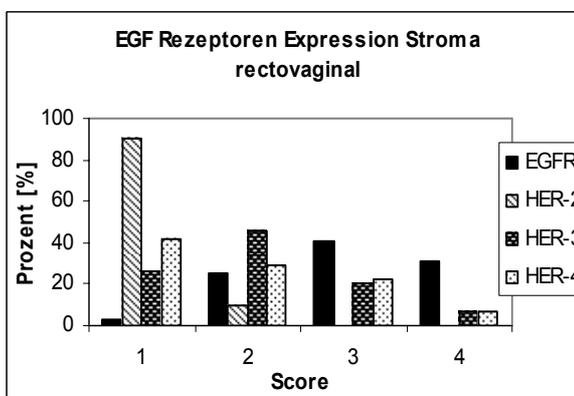


Diagramm 10

Darstellung der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von EGFR, HER-2, HER-3 und HER-4 im Vergleich in rectovaginalen Läsionen (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

Die Zusammenfassung zeigt, dass sich die Expressionsmuster von EGFR und HER-2 im Epithel stark ähneln. HER-3 und HER-4 zeigen beide einen ansteigenden Verlauf, wobei HER-3 am stärksten im Epithel exprimiert wurde. Im Stroma der rectovaginalen Läsionen ist allgemein eine abnehmende Tendenz der Expression der EGF Rezeptoren zu beobachten. Während HER-2 zu 90% nicht detektierbar ist, weist EGFR die höchste Expressionsrate auf. HER-3 und HER-4 zeigen ähnliche Tendenzen wie der EGFR, sind aber allgemein weniger stark exprimiert.

3.1.2 Vergleich der EGF Rezeptoren in den verschiedenen Lokalisationen und Statistische Analyse

Die Expressionsmuster der einzelnen EGF Rezeptoren in den drei verschiedenen Lokalisationen der Endometriose (peritoneal, ovariell, rectovaginal) werden untereinander verglichen. In der statistischen Analyse werden mittels GLM (vgl. Kap.) das Stadium der Endometriose, die endokrinen Therapie der Patientin, die Zyklusphase, der Östrogenrezeptorstatus und der Proliferationsrate der jeweiligen Läsionen (erfasst durch den Proliferationsmarker Ki67) sowie der Lokalisation Läsionen im Hinblick auf das Expressionsmuster der vier EGF Rezeptoren miteinbezogen.

3.1.2.1 Expression von EGFR

Das Expressionsmuster von EGFR in den epithelialen Zellen zeigt ähnliche Tendenzen zwischen den peritonealen und ovariellen Läsionen. Die EGFR Expression ist hauptsächlich schwach bis gar nicht vorhanden. In rectovaginalen Läsionen nimmt die EGFR Expression zunächst zu und fällt dann wieder ab, EGFR ist hauptsächlich schwach exprimiert. In allen drei Lokalisationen gilt, je stärker die Expression von EGFR, desto geringer die Anzahl der Fälle. Im Stroma verhalten sich die Expressionsmuster von EGFR alle kurvenförmig und ähnlich, wobei die Muster in ovariellen und rectovaginalen Läsionen ähnlich sind. Interessanterweise ist hier die Mehrzahl der Fälle positiv und EGFR im Vergleich zum Epithel viel stärker exprimiert.

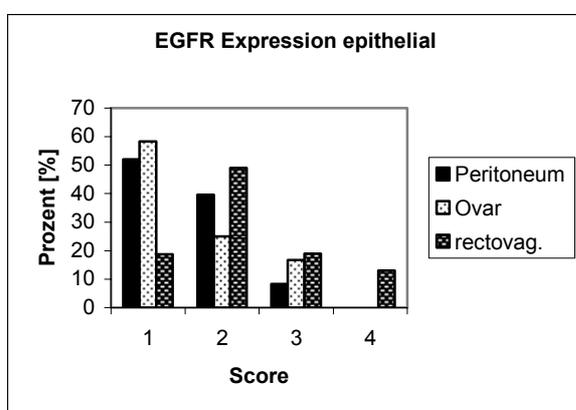


Diagramm 11

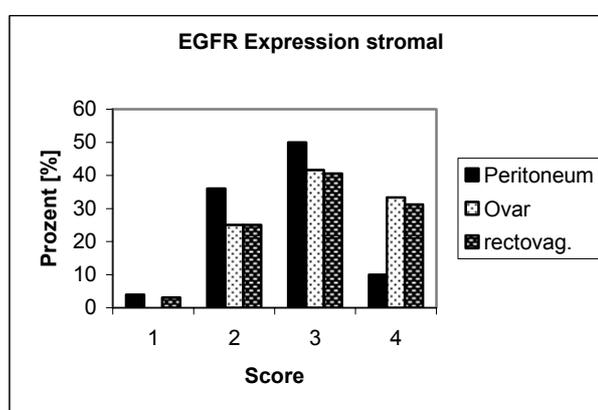


Diagramm 12

Vergleich der der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von EGFR in den drei Lokalisationen (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

Die GLM Analyse zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von EGFR im Epithel und der Lokalisation der untersuchten Läsionen ($p \leq 0,001$, $r^2 = 0,555$). Der nachfolgende Post-Hoc-Dunnett-T-Test spezifizierte die gefundene Signifikanz folgendermaßen: Es wurden signifikante Zusammenhänge zwischen den Lokalisationen

1. Peritoneum und rectovaginal ($p = 0,001$) und
2. Ovar und rectovaginal ($p = 0,037$) gefunden.

Der Zusammenhang zwischen Lokalisation der Expression von EGFR im Epithel, insbesondere der Unterschied, ob es eine rectovaginale Läsion ist oder eine peritoneale, bzw. ovarielle ist statistisch signifikant.

Da die Grundgesamtheit der ovariellen Proben nicht für ein GLM ausreichte, wurde hier ein Kruskal-Wallis-Test (KW) und folgend ein Mann-Whitney-U-Test (MW) durchgeführt, um eventuelle statistisch signifikante Zusammenhänge zu untersuchen.

Hierbei wurden das epitheliale und stromale Expressionsmuster von EGFR mit ER α , Ki67, dem Stadium, den Zyklusphasen und der Therapie korreliert. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von ER α und EGFR im epithelialen Kompartiment der ovariellen Endometrioseläsionen im KW ($p = 0,036$) und im MW ($p = 0,017$).

Die Tabelle mit den Expressionsmustern von ER α (in %) und EGFR zeigt eine inverse Tendenz der beiden Expressionen. Ist der ER α -Status hoch, so ist wenig EGFR detektierbar. Sinkt allerdings der ER α -Status, so steigt die Expression von EGFR (s. Tabelle 8).

Tab.8 Expressionsdaten des ER α (in %) und des epithelial exprimierten EGFR in ovariellen Endometrioseläsionen (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression)

ER	EGFR
epithelial	epithelial
100	1
99	1
95	2
90	1
90	1
100	1
50	3
90	2
99	1
80	2
80	3
100	1

3.1.2.2 Expression von HER-2

Im Vergleich der Expressionsmuster von HER-2 im Epithel der peritonealen, ovariellen und rectovaginalen Läsionen ist für alle drei Lokalisationen eine abnehmende Tendenz der Fälle bei zunehmender Expressionsstärke zu erkennen. Am stärksten ist HER-2 in den peritonealen Herden exprimiert, die ovariellen Läsionen zeigen die geringste Expression. Das rectovaginale Expressionsmuster ist dem der peritonealen Läsionen ähnlich. Auch in den stromalen Zellen der verschiedenen Läsionen ist HER-2 nur gering exprimiert. Im Gegensatz zum Epithel war hier in den peritonealen und den rectovaginalen fast kein HER-2 nachweisbar, wohingegen HER-2 stärker als im Epithel exprimiert wurde.

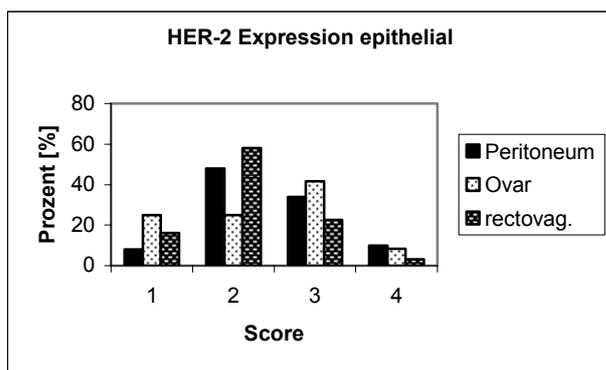


Diagramm 13

Vergleich der der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von HER-2 in den drei Lokalisationen (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

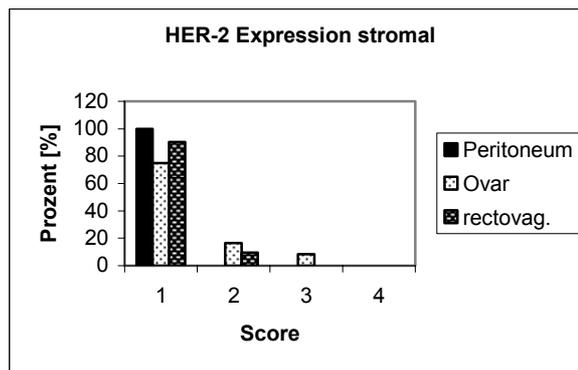


Diagramm 14

Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der stromalen HER-2-Expression und der Lokalisation ($p = 0,041$, $r^2 = 0,472$). Der Post-Hoc-Dunnett-T-Test zeigte signifikante Zusammenhänge zwischen folgenden Lokalisationen

1. Peritoneum und Ovar ($p = 0,001$) und
2. rectovaginal und Ovar ($p = 0,009$).

Dies Ergebnis zeigt, dass HER-2 ein anderes stromales Expressionsmuster in ovariellen Endometrioseläsionen besitzt als in peritonealen oder rectovaginalen.

3.1.2.3 Expression von HER-3

Im Epithel aller drei Lokalisationen ist im Vergleich zu EGFR und HER-2 der HER-3 Rezeptor am stärksten exprimiert. Die Expressionsmuster der peritonealen und ovariellen Läsionen zeigen ein ähnliches, relativ homogenes Bild, während HER-3 in rectovaginalen Läsionen am stärksten exprimiert ist. Im Gegensatz dazu steht die stromale Expression von HER-3, deren Schwerpunkt für die peritonealen und rectovaginalen Läsionen bei keiner bis schwacher Expression liegt und somit gegenläufig zum Muster im Epithel ist. Nur in der ovariellen Lokalisation ist ein Anstieg der Fälle mit steigender Expression zu sehen, allerdings nur bis zur moderaten Expression.

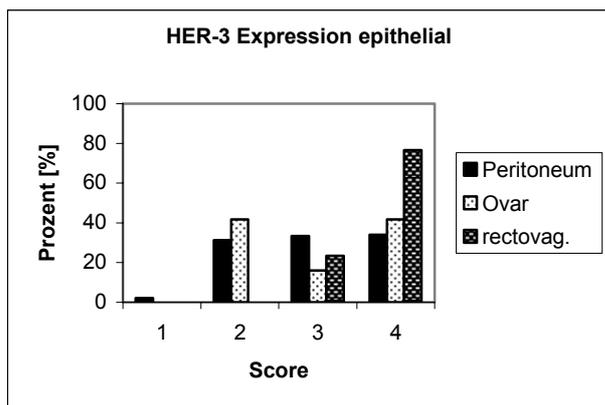


Diagramm 15

Vergleich der der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von HER-3 in den drei Lokalisationen (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

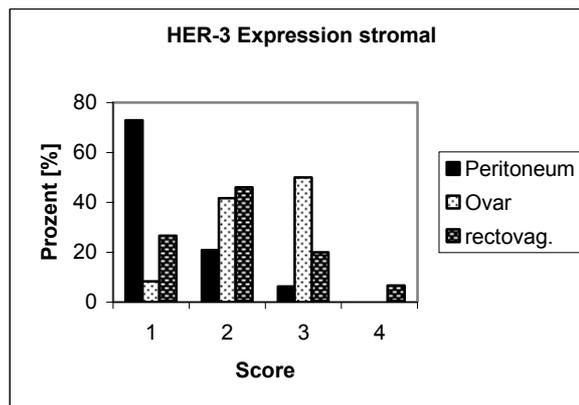


Diagramm 16

Die Unterschiede in der HER-3-Expression in den verschiedenen Lokalisationen zeigen sich auch in der statistischen Auswertung. Statistisch signifikante Zusammenhänge wurden für epitheliale sowie die stromale Expression von HER-3 und der Lokalisation ($p = 0,033$, $r^2 = 0,518$; $p \leq 0,001$, $r^2 = 0,572$) gefunden. Die anschließende Analyse mittels Post-Hoc-Dunnett-T-Test ergab für die epitheliale Expression signifikante Zusammenhänge zwischen

1. peritonealer und rectovaginaler Lokalisation ($p = 0,004$) und
2. ovarieller und rectovaginaler Lokalisation ($p = 0,032$).

Für die stromale Expression wurde signifikante Zusammenhänge für

1. peritonealer und ovarieller Lokalisation ($p \leq 0,001$) und
2. peritonealer und rectovaginaler Lokalisation ($p = 0,001$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch das Expressionsmuster von HER-3 im Epithel wie auch im Stroma von der Lokalisation der Läsionen beeinflusst wird.

3.1.2.4 Expression von HER-4

Im Epithel zeigen die Expressionsmuster von HER-4 in peritonealen und rectovaginalen Läsionen, je mehr Fälle positiv sind, desto stärker ist die Expression. Allerdings bleibt die peritoneale Expression im Bereich von keiner über schwach bis zu moderat, während die rectovaginale Lokalisation die stärkste HER-4-Expression aufweist und 100% der Fälle HER-4 positiv sind. In den ovariellen Läsionen steigt die Zahl der Fälle mit zunehmender Expression erst an und fällt dann wieder, somit weisen die rectovaginalen Läsionen die höchste Expression von HER-4 im Epithel auf. Im Gegensatz dazu steht die stromale Expression von HER-4, die entweder fast keine Expression wie in den peritonealen Herden aufweist oder einen abnehmenden

Verlauf, d.h. je stärker HER-4 exprimiert wird, desto weniger Fälle waren positiv. Dieses Phänomen der gegenläufigen Expression im Epithel und Stroma wurde auch bei den Expressionsmustern von HER-2 und HER-3 beobachtet. Bei EGFR verhält es sich umgekehrt. Im Epithel ist die Expression gering und dafür im Stroma stärker.

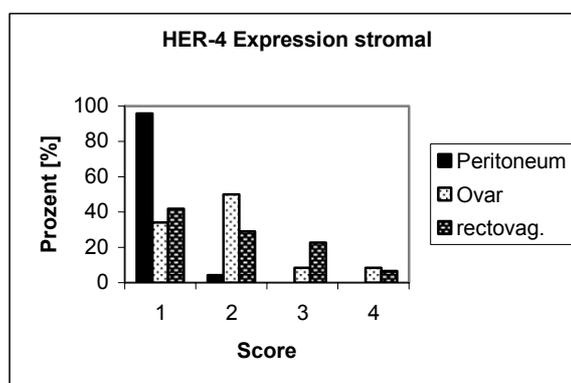
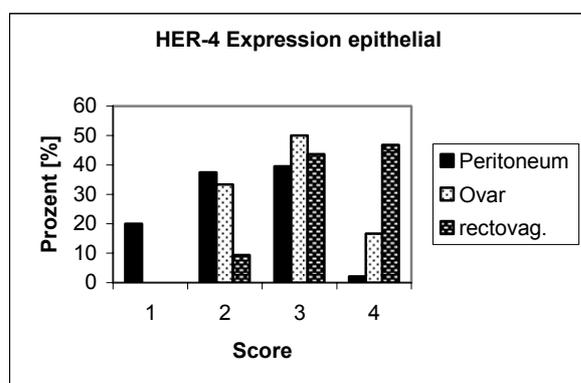


Diagramm 17

Diagramm 18

Vergleich der der epithelialen und stromalen Expressionsmuster von EGFR in den drei Lokalisationen (Score 1 = keine Expression, 2 = schwache Expression, 3 = moderate Expression, 4 = starke Expression)

Die statistische Analyse der HER-4-Expression zeigt auch hier wieder nur einen Zusammenhang mit der Lokalisation im Epithel ($p = 0,021$, $r^2 = 0,523$) wie auch im Stroma ($p \leq 0,001$). Die Parameter wie Stadium der Erkrankung, Östrogenrezeptorstatus und auch die Proliferationsrate scheinen im keinen signifikanten Zusammenhang mit den Expressionsmustern von HER-2, HER-3 und HER-4 zu stehen. Auch hier wurde zur weiteren Spezifizierung ein Post-Hoc-Dunnett-T-Test angehängt, der folgende signifikanten Zusammenhänge für die epitheliale Expression ergab:

1. peritoneale und rectovaginale Lokalisation ($p \leq 0,001$)

und für die stromale HER-4-Expression

1. peritoneale und ovarielle Lokalisation ($p \leq 0,001$)

2. peritoneale und rectovaginale Lokalisation ($p \leq 0,001$).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die epithelialen Expressionen von EGFR, HER-3 und HER-4 sich hauptsächlich unterscheiden in der rectovaginaler Lokalisation. Die stromalen Expressionen von HER-3 und HER-4 werden unterschiedlich von der peritonealen und ovariellen/rectovaginalen Lokalisation beeinflusst. HER-2 zeigt ein anderes Expressionsmuster in ovariellen Läsionen. Es ist kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der EGF Rezeptoren und der

Therapie, dem Stadium, der Zyklusphase und der Expression von Ki67 festgestellt worden.

3.1.3 Besonderheit im Expressionsmuster von EGFR

Die Expression von EGFR zeigte in allen drei untersuchten endometriotischen Lokalisationen ein einheitliches, aber im Gegensatz zur Expression der anderen EGF Rezeptoren, auffällig Muster im Stroma der Läsionen. Die Zellen, die direkt die Epithelzellen angrenzen, waren am stärksten angefärbt und bildeten einen ‚Ring‘ um die Drüse. Die Färbung wird diffuser und verliert sich, je weiter die Stromazellen von der Drüse entfernt sind. Zudem stellt sich der Ring unter den verschiedenen Therapien (unterteilt in keine Therapie, OC, GnRH-a) anders dar. Unter GnRH-a-Therapie ist der Ring scharf begrenzt und intensiv, ohne Therapie hingegen ist die Färbung diffus und schwächer. Für die OC-Therapie konnte kein einheitliches Bild gefunden werden (Abb.8). Es wurde zudem beobachtet, dass die Läsionen unter endokriner Therapie weniger Stromazellen besaßen als ohne Therapie. Bei den epithelialen Zellen konnte kein solcher Unterschied festgestellt werden.

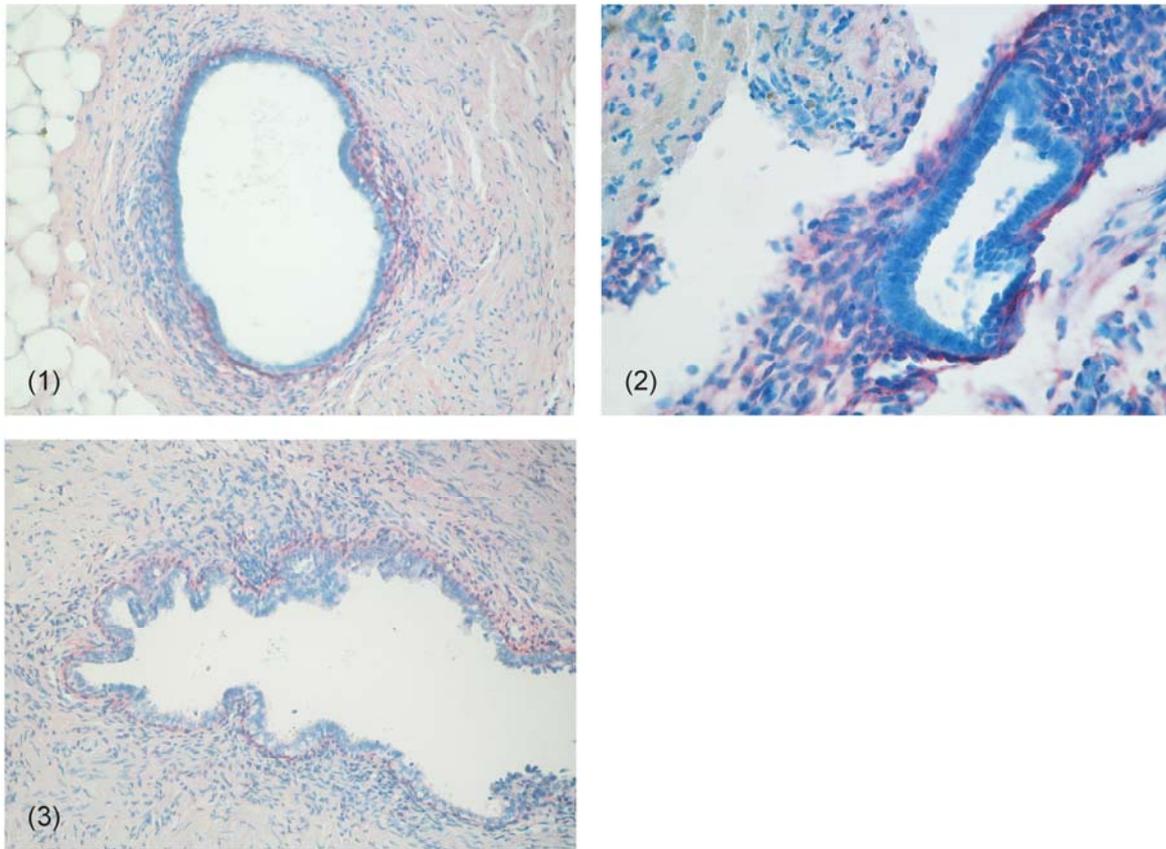


Abb.8 Darstellung der stromalen Expression von EGFR und unterschiedliche Ausprägung des Stromarings unter endokriner Therapie (1) stark abgrenzender, stark positiver Stromaring unter GnRH-a-Therapie (2) diffuse, nur in Teilen vorhandener Stromaring unter OC-Therapie (3) gut ausgebildeter Stromaring ohne Therapie, der nicht so stark positiv und abgegrenzt ist wie unter GnRH-a-Therapie

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Therapie und dem Vorhandensein des Stromarings gefunden werden. Allerdings ließen sich die Färbungen an den ovariellen Herden schwieriger auswerten, da das Gewebe häufig schon während der operativen Entfernung zusammenklebt und sich im Gewebeschnitt meist mit Artefakten darstellt, was eine Gesamtbeurteilung den Stromaring betreffend erschwert hat.

3.1.4 Expressionsanalyse von ER α und Ki67 in Endometrioseläsionen

ER α wurde im Epithel wie im Stroma der peritonealen, ovariellen und rectovaginalen Endometrioseläsionen nachgewiesen (Abb.9). Alle drei untersuchten Läsionstypen wiesen annähernd das gleiche Expressionsmuster auf, wobei der ER α im Epithel etwas stärker exprimiert wurde als im Stroma.

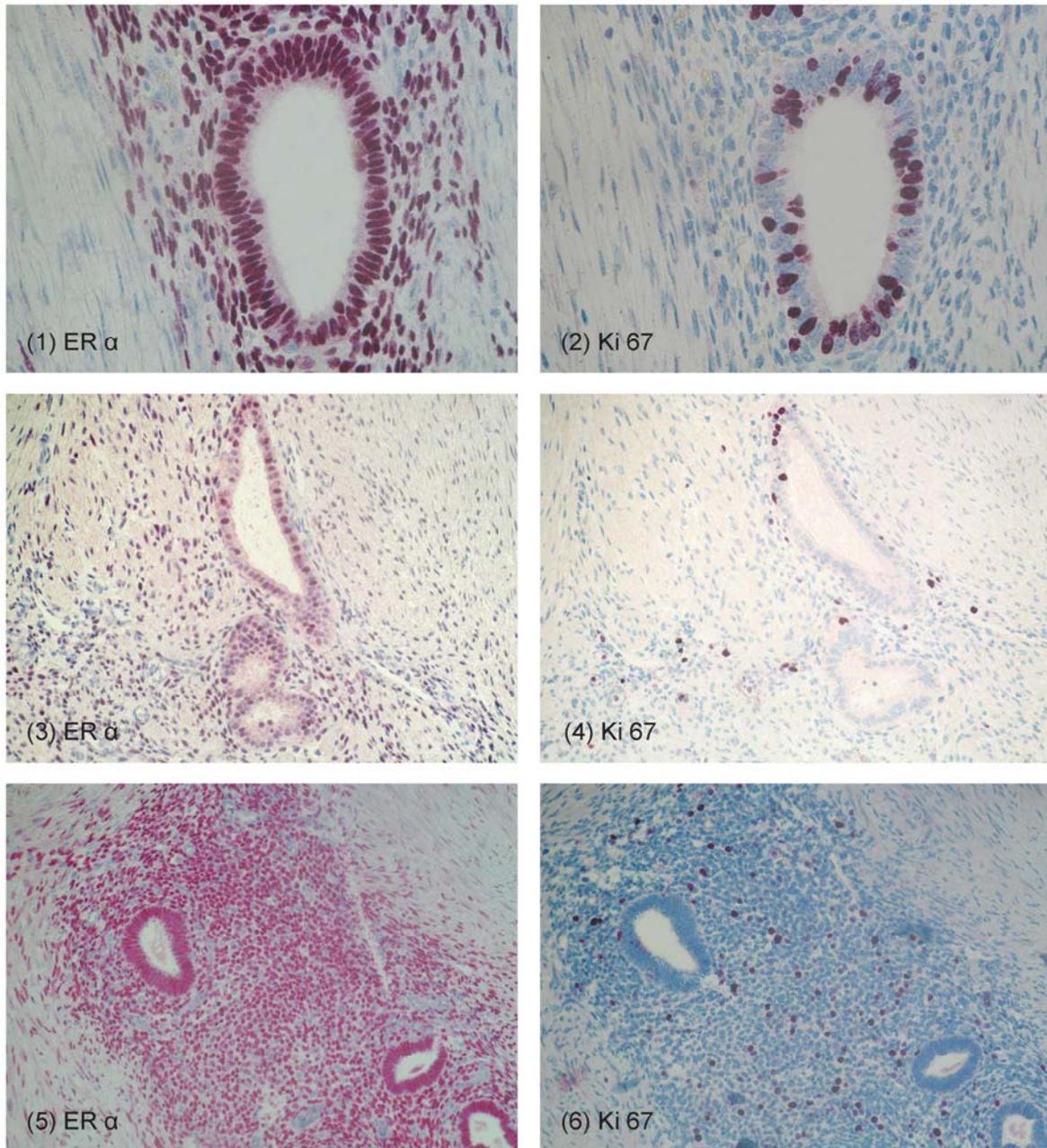


Abb.9 Nachweis der nuklearen Expression von ER α und dem Proliferationsmarker Ki67 in peritonealen (1,2), ovariellen (3,4) und rectovaginalen (5,6) Endometrioseläsionen

Auch die Proliferationsraten, die anhand des Proliferationsmarkers Ki 67 bestimmt wurden, glichen sich in den Läsionen der drei verschiedenen Lokalisationen. Auch hier wurde beobachtet, dass im Epithel die Expressionsrate höher war als im Stroma.

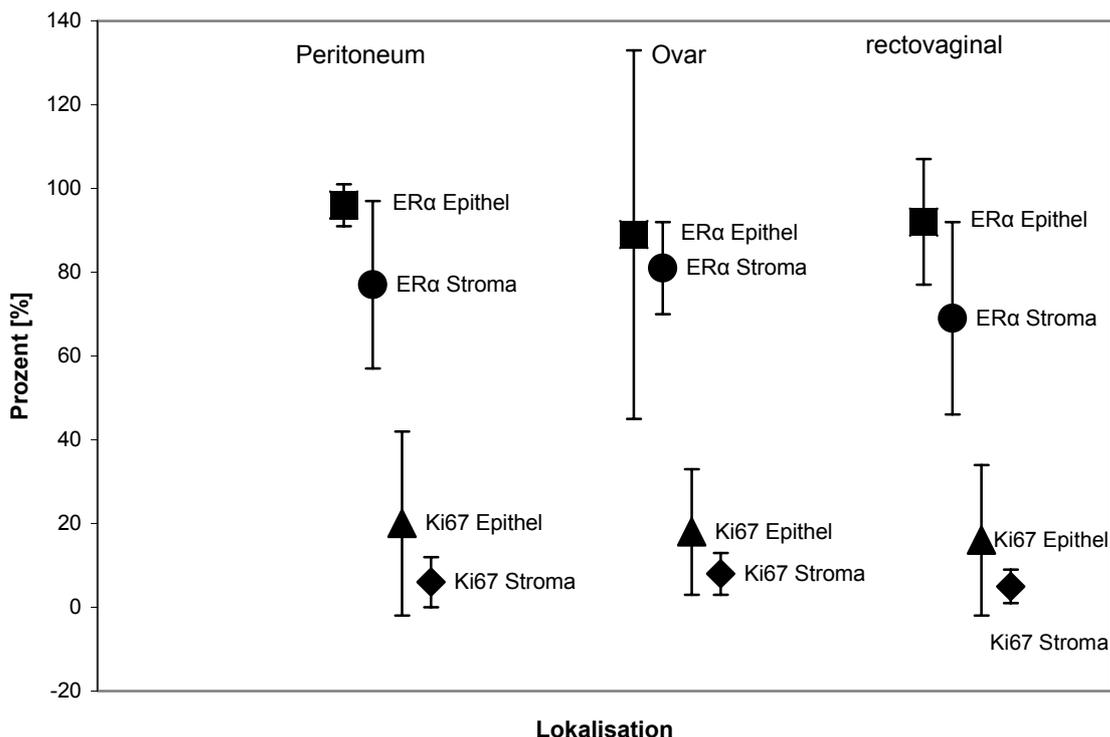


Diagramm 19 Darstellung der epithelialen sowie stromalen Verteilung von ERα und Ki67 in peritonealen, ovariellen und rectovaginalen Endometrioseläsionen

3.2 Immunfluoreszenzanalyse der primären Zellkultur und der Zelllinie 12Z

3.2.1 Charakterisierung der Primärzellkultur und der Zelllinie 12Z

Die primären Zellen wurden zunächst identifiziert und hinsichtlich der verschiedenen endometriotischen Zelltypen charakterisiert.

Die Zellen konnten folgendermaßen per Immunfluoreszenz charakterisiert werden:

- positiver Nachweis von Drüsenzellen mittels Zytokeratin
- positiver Nachweis von Stromazellen mittels Vimentin
- positiver Nachweis von glatten Muskelzellen mittels smooth muscle Actin

Die als Drüsenzellen identifizierten Zellen stellten sich erwartungsgemäß in kleinen, zusammenhängenden Zellverbänden dar, während die Stromazellen, prinzipiell häufiger vorkommend, sowohl einzeln als auch in Zellverbänden detektiert wurden. Die glatten Muskelzellen waren eher vereinzelt zu beobachten. Somit konnten alle Zelltypen, die histologisch die Diagnose einer Endometriose erlauben, identifiziert werden.

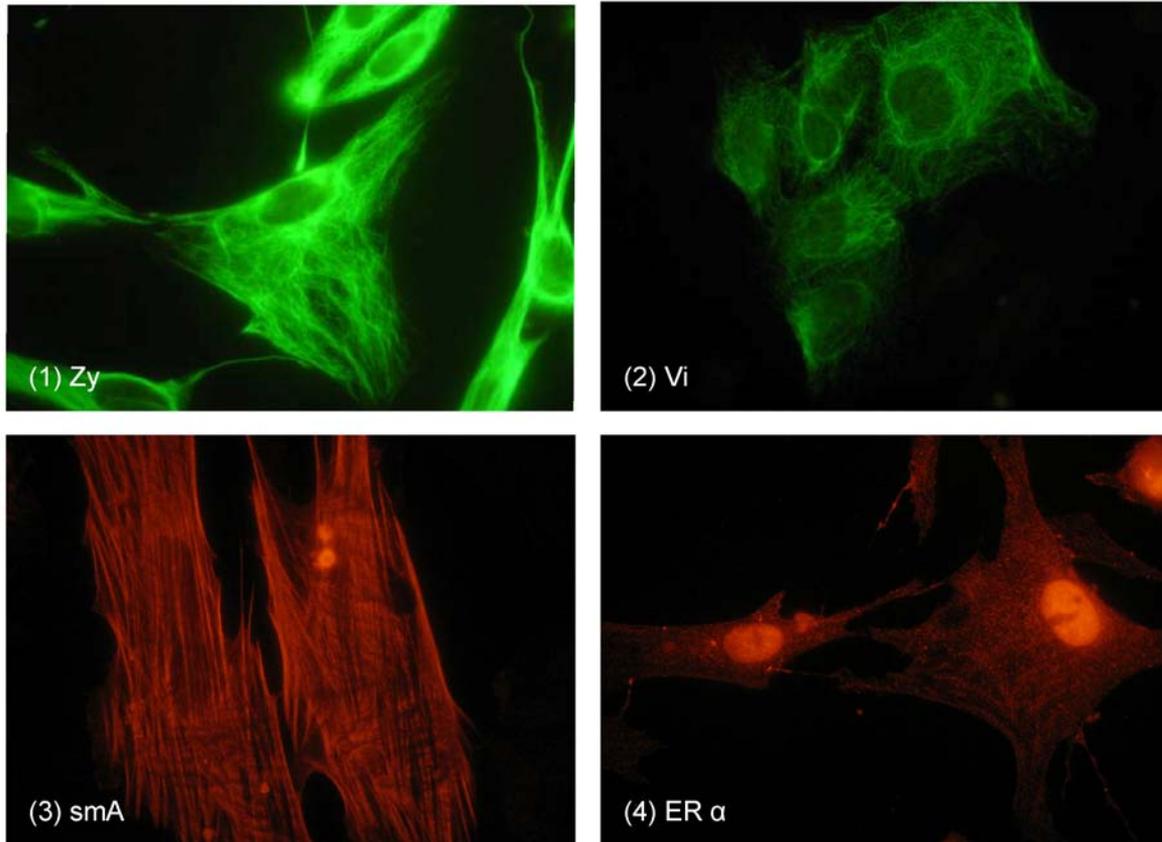


Abb.10 Allgemeine Charakterisierung der endometriotischen Primärzellen. Nachweis von (1) Epithelzellen mittels anti-Zytokeratin Antikörper (Zy), (2) Stromazellen mittels anti-Vimentin Antikörper (Vi), (3) glatten Muskelzellen mittels anti-*smooth muscle Actin* Antikörper (smA) und (4) ER α mittels ER α Antikörper in endometriotischen Primärzellen

Die Endometriosezelllinie 12Z wurde hinsichtlich ihrer Endometrioseeigenschaften von dem Arbeitskreis Prof. A. Starzinski-Powitz charakterisiert und publiziert (Zeitvogel et al., 2001).

3.2.2 Detektion der EGF Rezeptoren in endometriotischen Primärzellen und der Zelllinie 12Z

Alle EGF Rezeptoren konnten in den Primärzellen wie auch in den 12Z Zellen nachgewiesen werden.

Anhand von Doppelfärbungen mit EGFR, HER-2, -3 und -4 und jeweils Zytokeratin (Abb.11) oder Vimentin (Abb.12) konnte gezeigt werden, dass sowohl die Drüsenzellen wie auch die Stromazellen alle vier Rezeptoren exprimieren. Die Muskelzellen wurden, da ihre Rolle in den Endometrioseläsionen noch nicht geklärt ist, bei den weiteren Untersuchungen vernachlässigt.

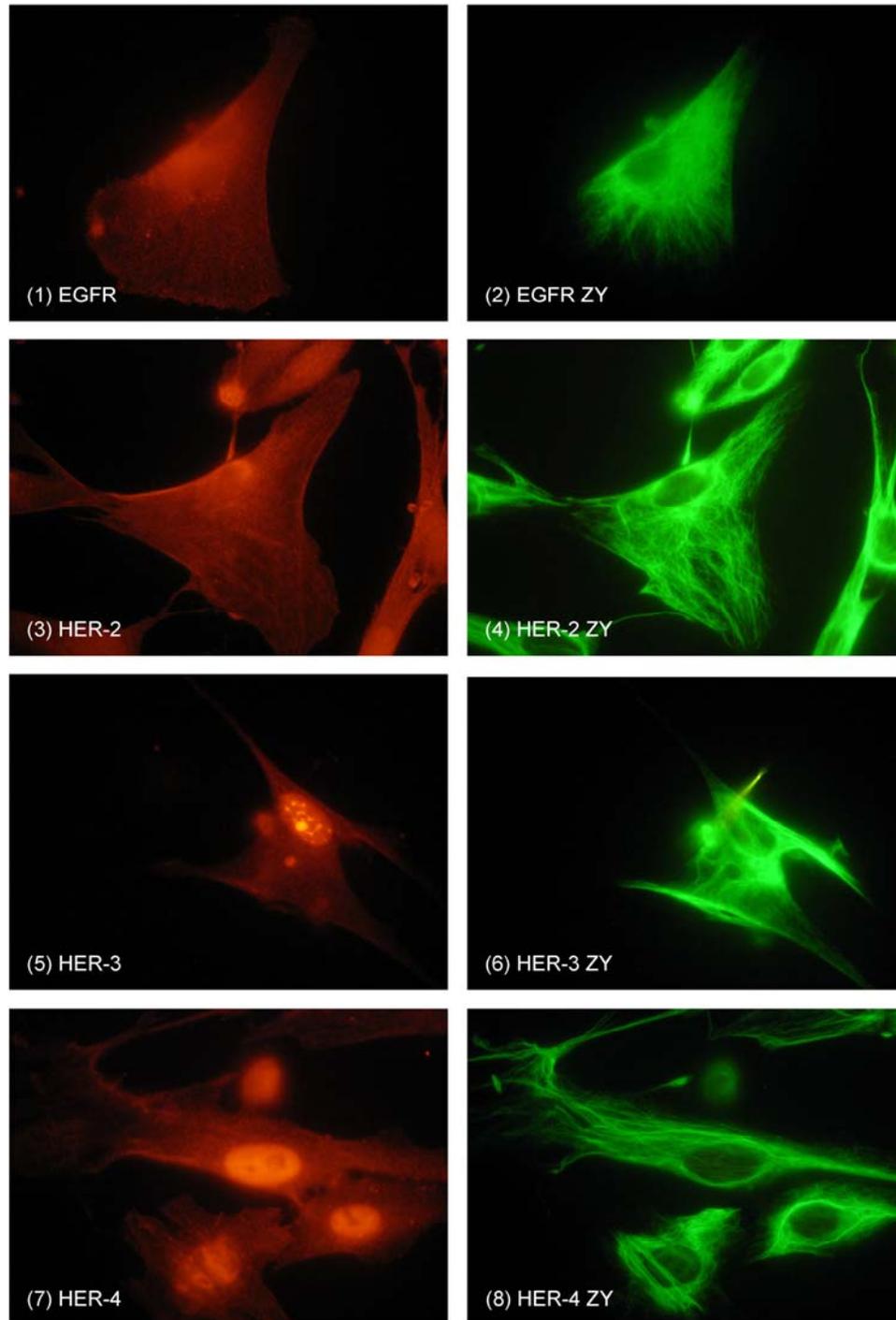


Abb.10 Nachweis der vier EGF Rezeptoren in den Epithelzellen (Zytokeratin als Epithelzellmarker der primären Zellkultur mittels Doppelfärbung (1) von EGFR (2) Doppelfärbung mit Zytokeratin; (3) diffuse zytoplasmatische Expression von HER -2 mit teilweiser membranständigen Expression (4) Doppelfärbung mit Zytokeratin; (5) schwache diffuse HER-3 Expression mit degranulierendem Kern (6) Doppelfärbung mit Zytokeratin; (7) schwache zytoplasmatische und starke nukleare Expression von HER-4 (8) Doppelfärbung mit Zytokeratin

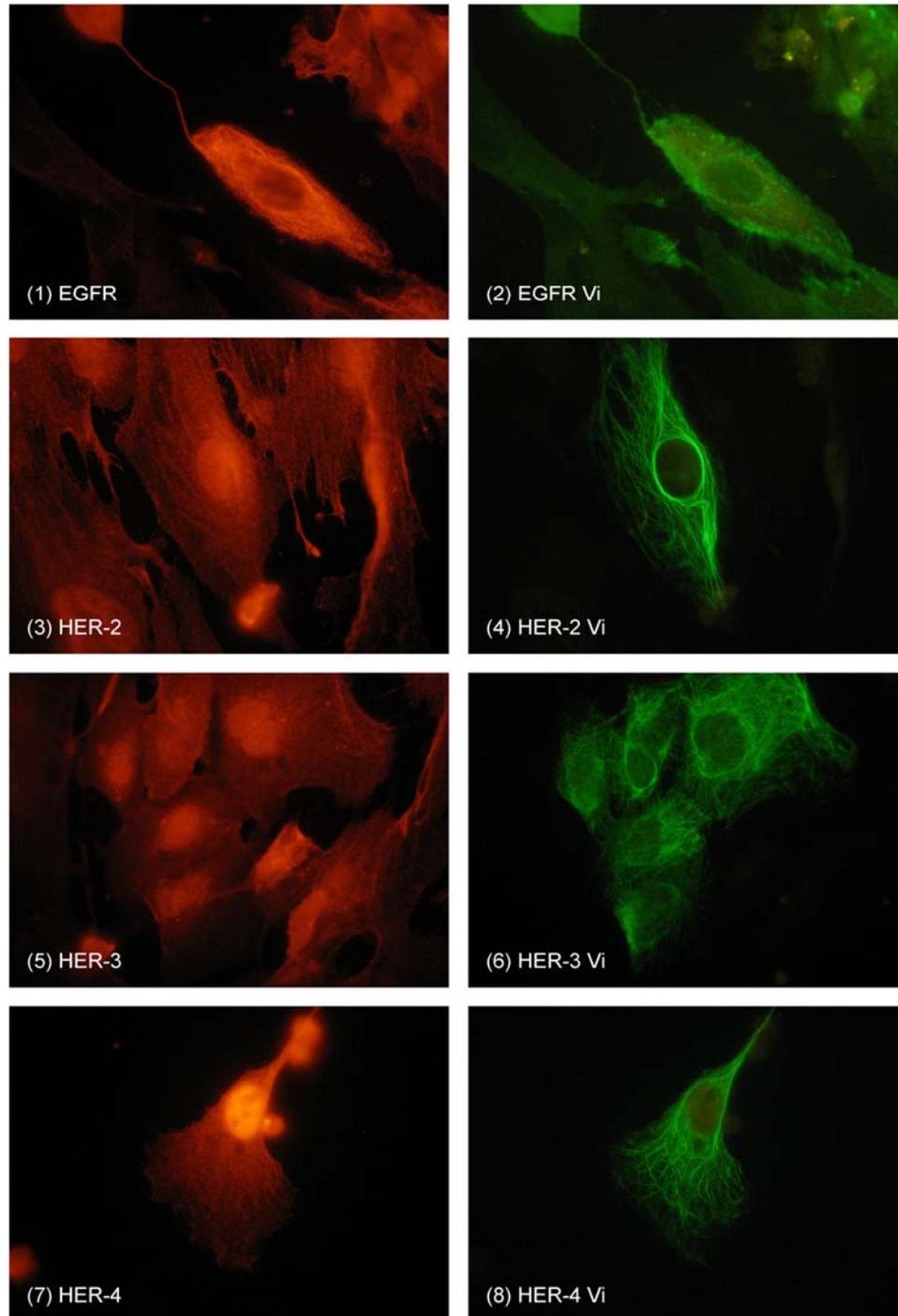


Abb.11 Nachweis der vier EGF Rezeptoren in den Stromazellen (Vimentin als Stromazellmarker) der primären Zellkultur mittels Doppelfärbung (1) von starke zytoplasmatische Expression von EGFR mit teilweiser membranständiger Expression (2) Doppelfärbung mit Vimentin; (3) diffuse zytoplasmatische Expression von HER -2 (4) Doppelfärbung mit Vimentin; (5) schwache diffuse zytoplasmatische HER-3 Expression (6) Doppelfärbung mit Vimentin; (7) schwache zytoplasmatische und starke nukleare Expression von HER-4 (8) Doppelfärbung mit Vimentin

Alle vier Rezeptoren wurden hauptsächlich im Zytoplasma detektiert, wobei HER-2 und HER-4 am stärksten angefärbt waren. Zudem konnte eine nukleare Färbung bei HER-4 beobachtet werden. EGFR und HER-2 zeigten in einzeln liegenden Zellen

keine oder nur eine schwach-diffuse zytoplasmatische Färbung. Sind die Zellen jedoch im Zellverband detektiert worden - es konnten so genannte *stress fibers* als Verbindung zwischen den einzelnen Zellen gesehen werden - konnte eine stark positive membranäre Färbung, vorzugsweise an den interzellulären Verbindungsstellen, beobachtet werden.

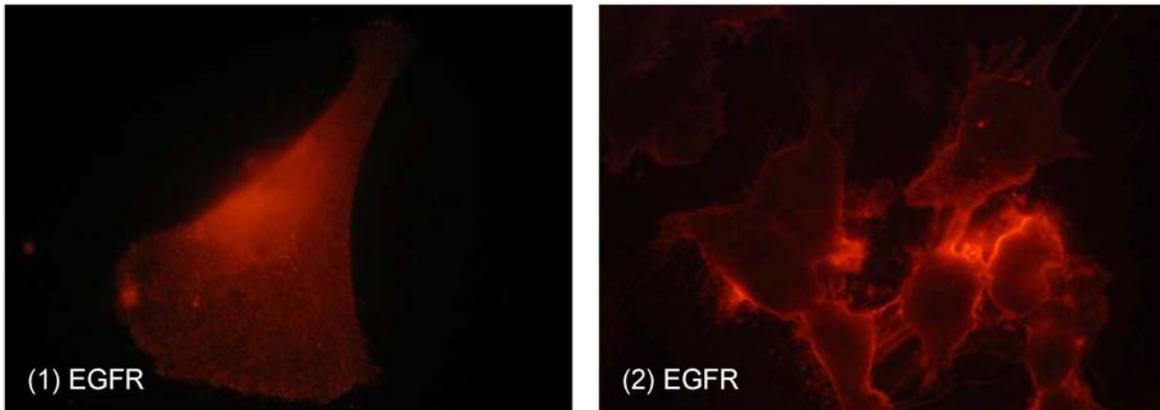


Abb.12 Auftreten einer membranären Expression von EGRF bei Zell-Zell-Kontakt (1) In Einzelzellen liegt eine diffuse zytoplasmatische Expression von EGFR vor. (2) Bei der Ausbildung von sog. ‚stress fibers‘, die als Zell-Zell-Kontakt dienen, tritt eine starke membranäre Expression von EGFR auf.

Diese Beobachtungen konnten sowohl in den primären Zellen als auch in der Zelllinie 12Z gemacht werden.

3.3 Ergebnisse der Regulationsversuche

3.3.1 Morphologische Untersuchung

Die morphologischen Untersuchungen zeigen, dass die Zellen ohne Östrogenzusatz schlechter wachsen. Nach 24h Östrogenentzug wachsen die Zellen im Vergleich zur Kontrolle etwas langsamer, wobei man nach 48h ein schlechteres Wachstum erkennen kann. Nach 72h wiederum scheinen sich die Zellen erholt zu haben und wachsen erneut (Abb.13). Diese Beobachtung gilt sowohl für die Primärzellkultur als auch für die Zelllinie 12Z.

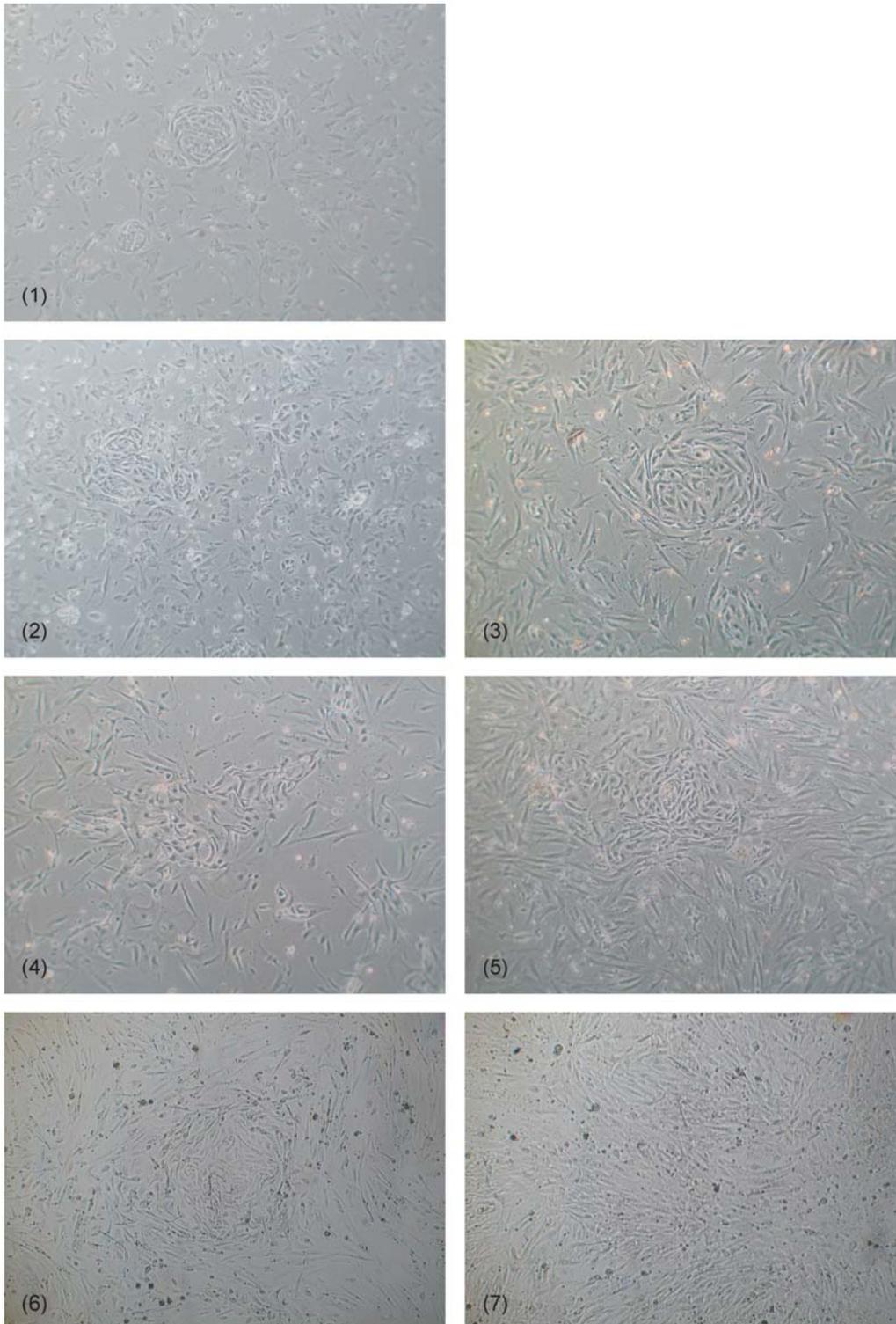


Abb.13 Morphologische Untersuchungen der endometriotischen Primärzellkultur unter Östrogenentzug (1) Primäre Endometriosezellen nach 24h ohne FCS (2) 24 h Östrogenentzug; Zellen wachsen schlechter als in der Kontrollgruppe (3), (4) 48h Östrogenentzug; deutlich weniger Zellen als im Kontrollversuch (5), (6) nach 72h Östrogenentzug nur noch wenig Unterschied zur Zellwachstum im Kontrollversuch (7); In beiden Versuchansätzen sind auch nach 72h noch Epithelzellen sowie Stromazellen zu sehen

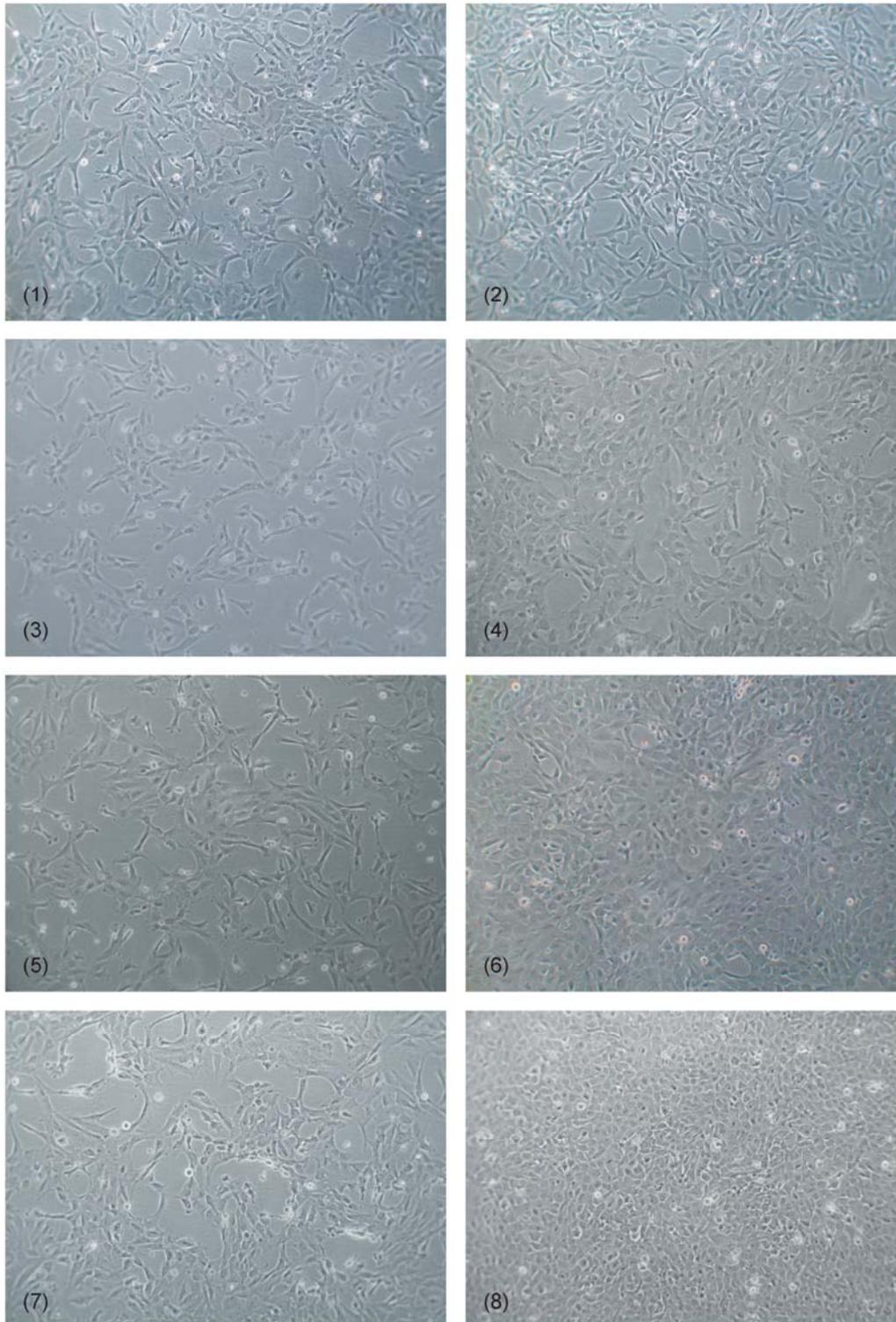


Abb.14 Morphologische Untersuchungen der Endometriosezelllinie 12Z unter Östrogenentzug
 (1) Ausgangszellen im normalen Medium (+10% FCS, 1% P/S) kultiviert (2) Zellen nach 24h mit nur 5% FCS (3) 24 h Östrogenentzug; Zellen wachsen schlechter als in der Kontrollgruppe (4), (5) 48h Östrogenentzug; deutlich weniger Zellen als im Kontrollversuch (6), (7) nach 72h Östrogenentzug immer noch zur weniger Zellwachstum als im Kontrollversuch (8), aber das Zellwachstum hat sich erholt und steigert sich wieder trotz Östrogenentzug

3.3.2 Westernblot Analyse

Mittels Westernblot Analyse sollten die EGF Rezeptoren zum einen in endometriotischen Gewebe nachgewiesen und zum anderen sollte das EGFR-System auf seine Funktionalität, zumindest auf seine Teilfunktionalität, hin charakterisiert werden. Des Weiteren wurde im *in vitro*-Modell der Effekt eines Östrogenentzuges auf die Regulation der EGF Rezeptoren untersucht.

3.3.2.1 Untersuchung zur Teilfunktionalität der EGF Rezeptoren im *in vitro*-Modell

Mittels Westernblot Analyse konnte eine Downregulation von EGFR nach Gabe von EGF im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (Abb.15). Dies zeigt, dass der EGFR in der primären Zellkultur funktionsfähig ist

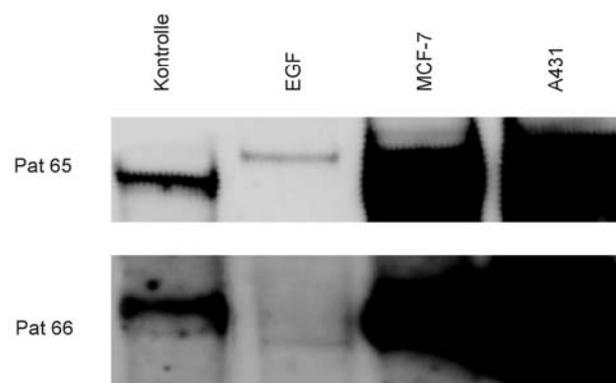


Abb.15 Westernblot Analyse der EGFR Expression unter Gabe von EGF in endometriotischen Primärzellen. Unter Zusatz des spezifischen Liganden ist über 48h eine Downregulation im Vergleich zum Kontrollversuch von EGFR zu beobachten. Die Zelllinien A431 und MCF-7 wurden als Kontrolle für die spezifische Expression von EGFR bei 170 kDa eingesetzt.

Die Dimerisierungspartner (HER-2 bis -4) waren ebenfalls von der Regulation des EGFR betroffen.

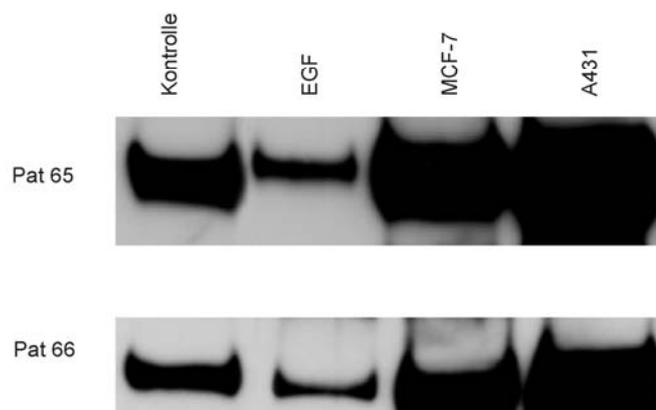


Abb.16 Westernblot Analyse der HER-2 Expression unter Gabe von EGF in endometriotischen Primärzellen.

Unter Zusatz des spezifischen Liganden von EGFR ist über 48h eine Downregulation im Vergleich zum Kontrollversuch von HER-2 zu beobachten. Die Zelllinien A431 und MCF-7 wurden als Kontrolle für die spezifische Expression von HER-2 bei 185 kDa eingesetzt. Die untersuchten Primärzellkulturen sind Mischkulturen und ihre Zusammensetzung differiert abhängig vom Ausgangsmaterial. Daraus folgend können sich Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen EGF Rezeptoren für verschiedene Primärzellkulturen ergeben.

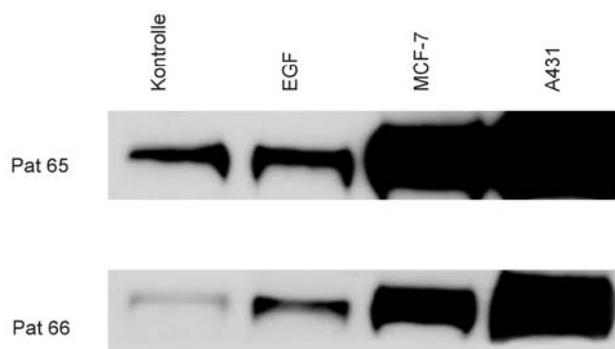


Abb.17 Westernblot Analyse der HER-3 Expression unter Gabe von EGF in endometriotischen Primärzellen.

Unter Zusatz des spezifischen Liganden für EGFR ist nach 48h eine stärkere Expression im Vergleich zum Kontrollversuch von HER-3 zu beobachten. Die Zelllinien A431 und MCF-7 wurden als Kontrolle für die spezifische Expression von HER-3 bei 160 kDa eingesetzt.

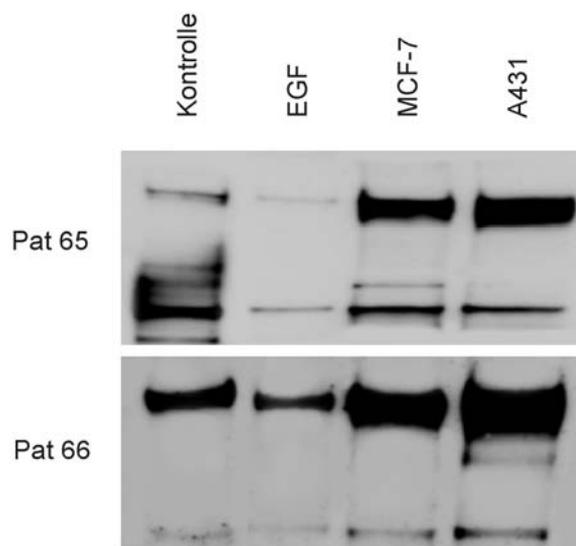


Abb.18 Westernblot Analyse der HER-4 Expression unter Gabe von EGF in endometriotischen Primärzellen.

Unter Zusatz des spezifischen Liganden ist über 48h eine Downregulation im Vergleich zum Kontrollversuch von HER-4 zu beobachten. Die Zelllinien A431 und MCF-7 wurden als Kontrolle für die spezifische Expression von HER-4 bei 165 kDa eingesetzt. In diesen Primärzellkulturen konnte auch eine zweite Bande von HER-4 bei 80 kDa detektiert werden, die ein Teilfragment des HER-4 darstellt und durch proteolytische Prozesse entsteht. Da diese Bande in den Regulationsversuchen nur minimal detektiert werden konnte, wurde auf eine weitere Berücksichtigung verzichtet.

3.3.2.2 Regulation der EGF Rezeptoren unter Östrogenentzug

Die folgenden Ergebnisse stellen den Einfluss von Östrogen auf die Regulation der EGF Rezeptoren in Endometriosezellen dar. Es konnte östrogenabhängige Expression der EGF Rezeptoren und zudem ein inverser Effekt für die Expression von EGFR und ER α beobachtet werden.

3.3.2.2.1 Endometriotische Primärzellkultur

Unter Östrogenentzug wurde beobachtet, dass sowohl EGFR als auch ER α über 72h hochreguliert wurden. Unter Gabe von 17 β -Hydroxyöstradiol (Kontrollgruppe) wurde ER α über 48h hochreguliert und blieb annähernd auf diesem Niveau über 72h, wohingegen EGFR nach 72h wieder runterreguliert wurde.

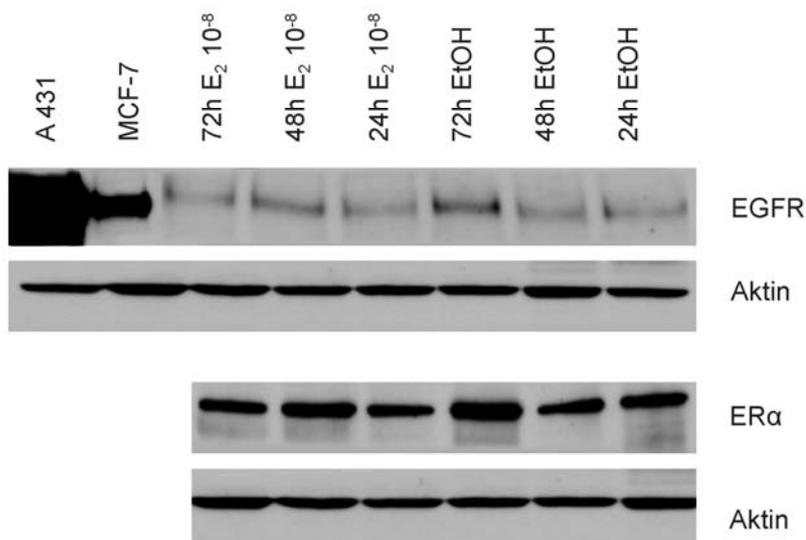


Abb. 19 Expression von EGFR und ER α unter Östrogenentzug nach 24h, 48h, 72h in endometriotischen Primärzellkulturen; Ladekontrolle: Aktin

HER-2 und HER-4 zeigten in der Kontrollgruppe ebenso wie EGFR eine Abnahme über 72h, HER-3 eine leichte Zunahme, wobei dieser Rezeptor in der Kontrollgruppe nur schwach detektierbar war. Unter Östrogenentzug wurden HER-2, -3 und -4 zunächst hochreguliert, nach 72h konnte wieder eine Abnahme der Rezeptoren beobachtet werden.

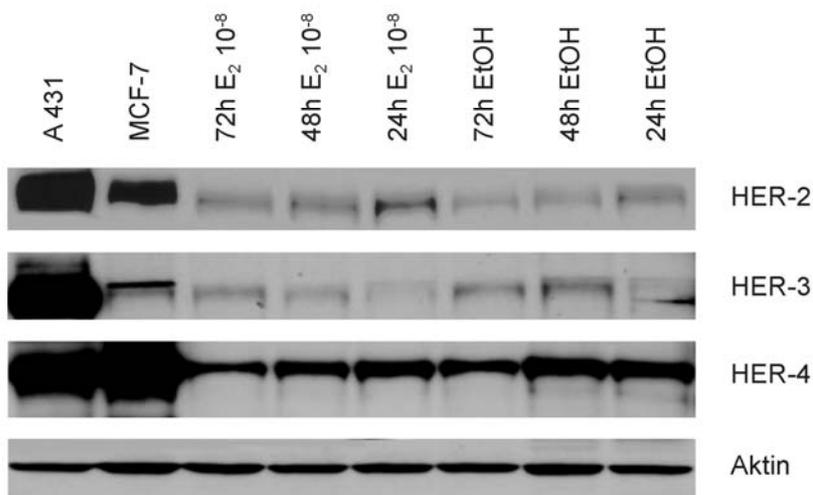


Abb. 20 Expression von HER-2, -3 und -4 unter Östrogenentzug nach 24h, 48h, 72h in endometriotischen Primärzellkulturen; Ladekontrolle: Aktin

Diese Ergebnisse zeigen, dass die EGF Rezeptoren in endometriotischen Primärzellen einer endokrinen Regulation durch Östrogen unterliegen. Ist Östrogen vorhanden, so steigt die Expression des ER α , die von EGFR sinkt, es ist also eine inverse Korrelation vorhanden. Ist kein Östrogen vorhanden, so nimmt sowohl die Expression von ER α als auch die von EGFR zu.

3.3.2.2 Zelllinie 12Z

Die Endometriosezelllinie 12Z, die mit ER α transfiziert wurde, zeigt unter Östrogenentzug die gleiche Regulation der EGF Rezeptoren wie sie bei den Primärzellen beobachtet werden konnte. Zudem wurde die Zelllinie mit einem Nullvektor (Neo) transfiziert, damit eine Regulation der Zelllinie über andere Mechanismen ausgeschlossen werden konnte. Um zu überprüfen, ob die hervorgerufene Regulation tatsächlich durch Östrogen hervorgerufen wurde, wurde jeweils ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem die Zellen mit ICI 182 780, einem ER α -Blocker, vorbehandelt wurden, um eine direkte Wirkung von Östrogen abzufangen.

1. EGFR, Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogenentzug

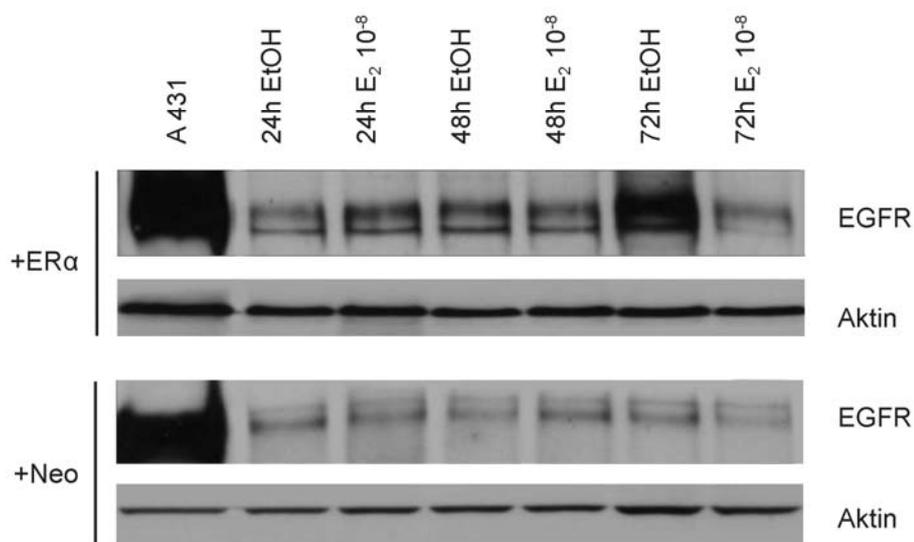


Abb.21 Vergleich der Expressionsmuster von EGFR unter Östrogenentzug in ER α - und Nullvektor-transfizierten (Neo) 12Z Zellen

Der EGFR wird unter Östrogenentzug über 72h hochreguliert. Unter Östrogenzugabe sinkt die Expression des Rezeptors. In der Kontrolle ist eine leichte Downregulation des EGFR zu beobachten.

2. EGFR, Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogengabe/ ER α -Blocker

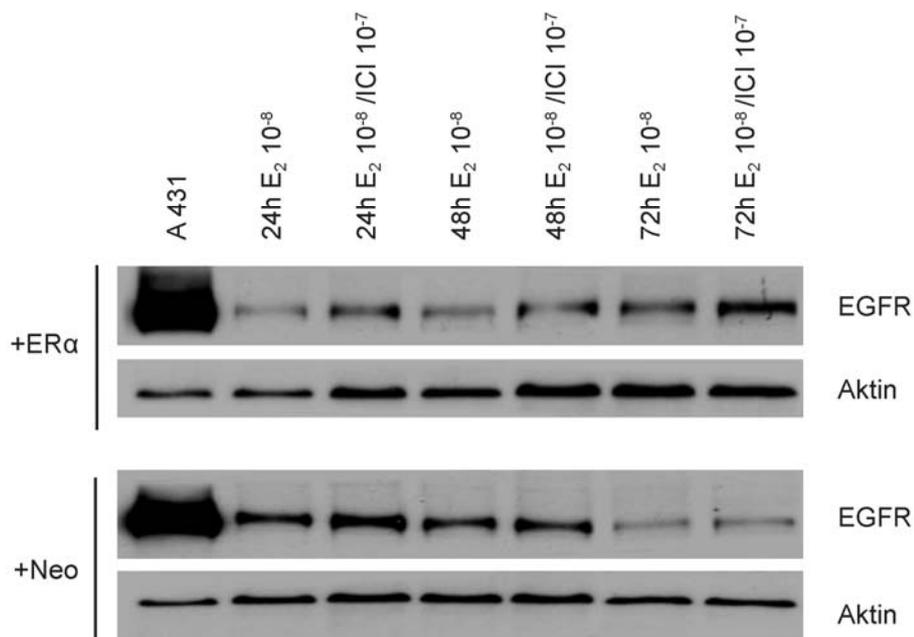


Abb.22 Vergleich der Expressionsmuster von EGFR unter Östrogengabe, bzw. Östrogen mit ER α -Blocker ICI 182 780 (ICI) in ER α - und Nullvektor-transfizierten (Neo) 12Z Zellen

In diesem Versuch wird deutlich, dass in Zellen, bei denen der ER α geblockt ist, EGFR wesentlich stärker exprimiert wurde. Unter Östrogengabe ist ein leichter Expressionsanstieg zu verzeichnen, der aber nur im Verhältnis zur Expression bei einem Östrogenentzug beurteilbar ist. In den Kontrollzellen ist kein solcher Effekt zu beobachten. Die starke Downregulation nach 72h ist in diesem Fall so zu erklären, dass die Zellen schon in die Apoptose gingen (morphologische Kontrolle) und somit der Rezeptorbesatz allgemein gesunken sein kann. Eine endokrine Regulation des EGFR durch Östrogen ist somit zu erkennen.

3. HER-2 Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogenentzug

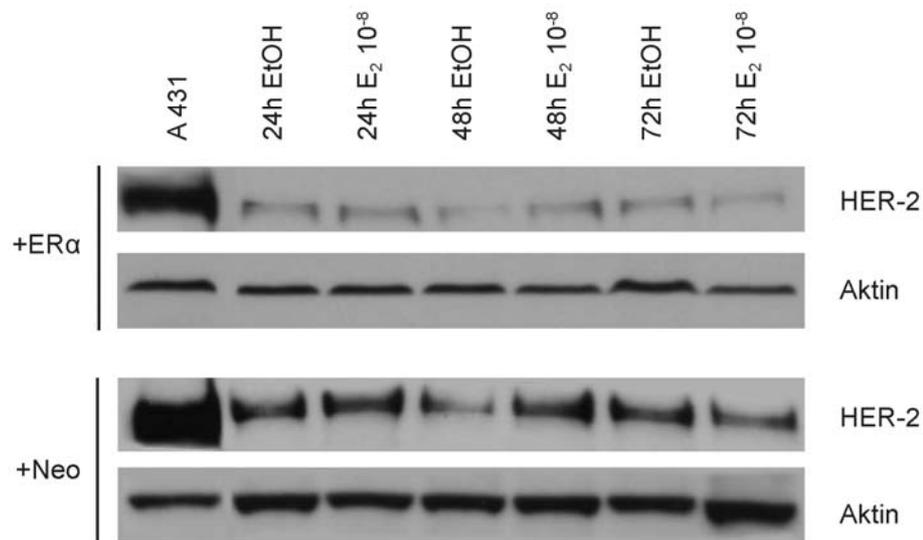


Abb.23 Vergleich der Expressionsmuster von HER-2 unter Östrogenentzug in ER α - und Nullvektor-transifizierten (Neo) 12Z Zellen

HER-2 zeigt bei allgemein schwacher Expression eine Abnahme der Expression über 72h bei Östrogengabe wie auch bei Östrogenmangel, was wiederum die Regulation von HER-2 in den Primärzellen widerspiegelt. Die Kontrollzellen zeigen ein uneinheitliches Bild der HER-2 Expression, wobei auch hier eine Abnahme der HER-2 Expression über 72h zu beobachten war. Somit kann nicht eindeutig festgestellt werden, dass hier die Regulation hauptsächlich über den ER α stattfindet.

4. HER-2 Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogengabe/ ER α -Blocker

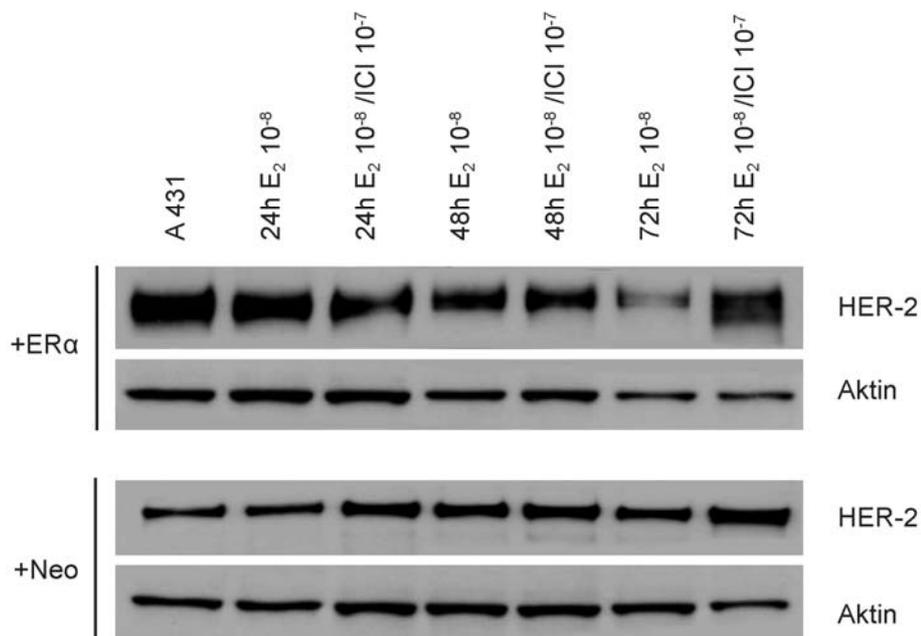


Abb.24 Vergleich der Expressionsmuster von HER-2 unter Östrogengabe, bzw. Östrogen mit ER α -Blocker ICI 182 780 (ICI) in ER α - und Nullvektor-transfizierten (Neo) 12Z Zellen

Hier zeigt sich, wie auch vorher beschrieben, eine Abnahme der HER-2 Expression unter Östrogengabe. Durch die Gabe des ER α -Blockers wird dieser Effekt aufgehoben. Die Kontrolle der kotransfizierten Zellen zeigt keine Regulation, so dass hier eine Regulation durch Östrogen bewiesen werden konnte.

5. HER-3 Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogenentzug

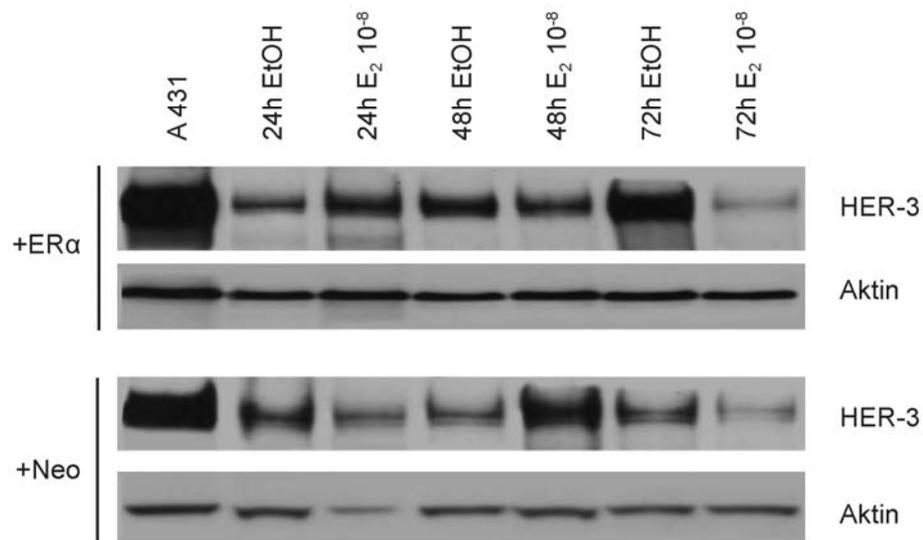


Abb.25 Vergleich der Expressionsmuster von HER-3 unter Östrogenentzug in ER α - und Nullvektor-transifizierten (Neo) 12Z Zellen

Unter Östrogenmangel konnte eine starke Hochregulation von HER-3 über 72h detektiert werden, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der Primärzellen steht. Unter Östrogengabe ist ein Abfall der HER-3 Expression zu sehen, was wiederum nicht deckungsgleich mit den Beobachtungen der Primärzellen ist. Die Kontrollzellen zeigen ein ähnliches Expressionsmuster, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, wie die ER α -transifizierten Zellen. Daher ist eine endokrine Regulation nicht zu erkennen.

6. HER-3 Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogengabe/ ER α -Blocker

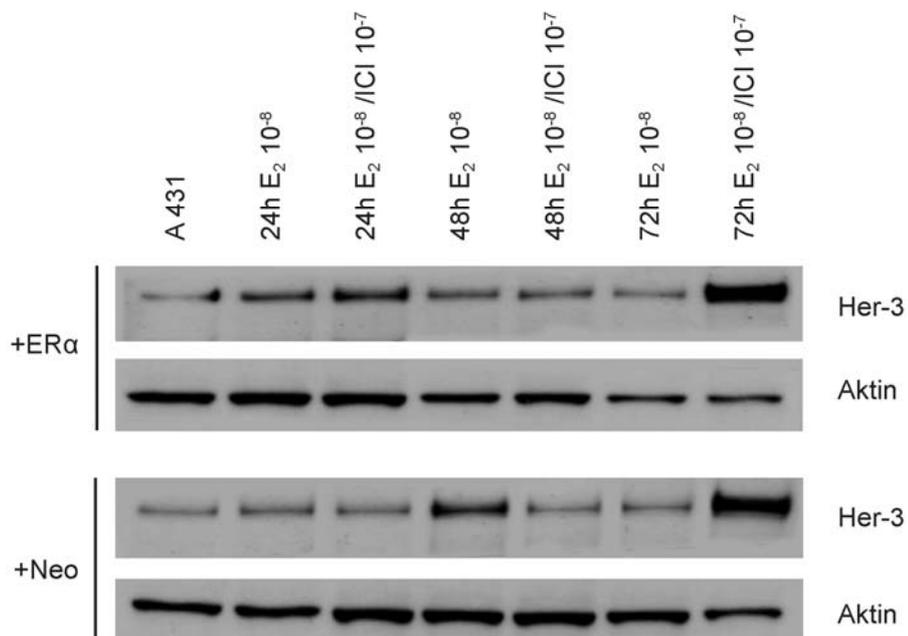


Abb.26 Vergleich der Expressionsmuster von HER-3 unter Östrogengabe, bzw. Östrogen mit ER α -Blocker ICI 182 780 (ICI) in ER α - und Nullvektor-transfizierten (Neo) 12Z Zellen

Dieser Versuch bestätigt, dass HER-3 bei Östrogengabe über 72h runterreguliert wird. Unter der Blockierung des ER α ist dieser Effekt aufgehoben, da HER-3 hochreguliert wird. Der Kontrollversuch zeigt ein ähnliches Ergebnis wie die ER α -transfizierten Zellen, so dass eine ausschließliche Regulation von HER-3 über Östrogen unwahrscheinlich ist.

7. HER-4 Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogenentzug

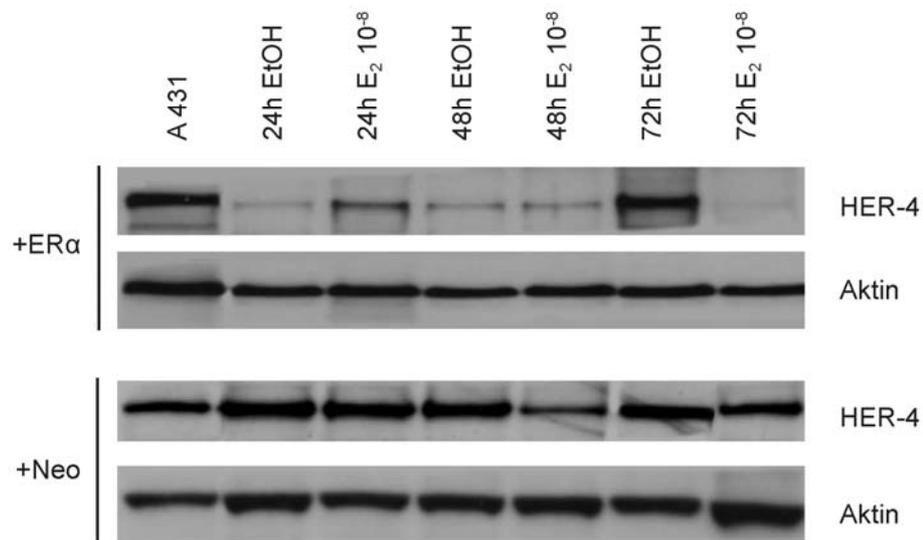


Abb.27 Vergleich der Expressionsmuster von HER-4 unter Östrogenentzug in ER α - und Nullvektor-transifizierten (Neo) 12Z Zellen

HER-4 wird unter Östrogenentzug hochreguliert, wie zunächst in den Primärzellen auch eine Hochregulation zu beobachten ist. Unter Östrogengabe wird der schwach exprimierte Rezeptor runterreguliert, so dass er nicht mehr detektierbar ist. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis der Regulation in den Primärzellen überein.

Die Kontrolle weist keine Regulation von HER-4 auf, somit ist von einer Regulation über den ER α auszugehen.

8. HER-4 Vergleich ER α -Nullvektor (Neo) unter Östrogengabe/ ER α -Blocker

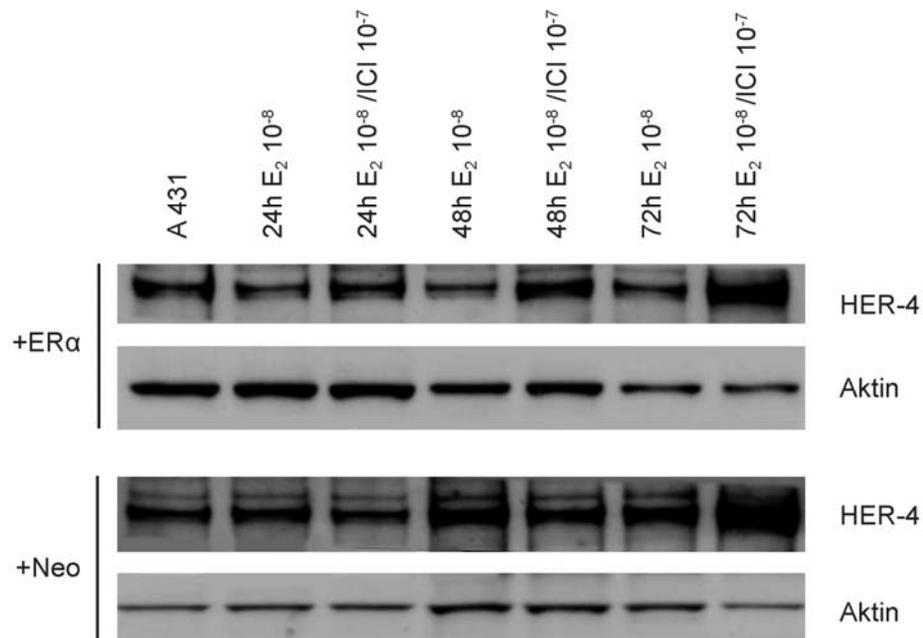


Abb.28 Vergleich der Expressionsmuster von HER-4 unter Östrogengabe, bzw. Östrogen mit ER α -Blocker ICI 182 780 (ICI) in ER α - und Nullvektor-transfizierten (Neo) 12Z Zellen

Diese Untersuchung zeigt, dass die Expression von HER-4 wenig reguliert ist unter Östrogengabe. Dieser Effekt wird aufgehoben durch die Blockierung des ER α . Die Kontrolle zeigt ein ähnliches Bild wie der Hauptversuch. Insofern ist es fraglich, ob Östrogen allein die Regulation von HER-4 in Endometriosezellen beeinflusst.

4 Diskussion

Endometriose ist eine östrogenabhängige Erkrankung, deren Pathogenese und Progressionsmechanismen unbekannt sind (Kitawaki et al., 2002). Obwohl Endometriose als gutartig gilt, zeigt sie Eigenschaften, die malignen Tumoren zugeordnet werden wie Invasivität, Migration von Zellen und destruierendes Wachstum (Gaetje et al., 1995; Swiersz, 2002) oder auch hormonabhängiges Wachstum wie z.B. beim Mammakarzinom (Hynes et al., 2005). Zudem weist Endometriose, auch unter medikamentöser Therapie, hohe Rezidivraten auf mit denen ein aggressiverer Phänotyp einhergehen kann (Ebert, 2003; Waller et al., 1993). Daher ist davon auszugehen, dass neben dem ER-System auch andere Systeme die Ausbildung und das Wachstum von Endometrioseläsionen beeinflussen und den Zellen auch unter Östrogenentzug das Überleben sichern. Das EGF Rezeptor System spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Tumoren, insbesondere bei östrogenabhängigen Malignomen wie dem Mammakarzinom (Yarden, 2001), und kann als *survival pathway* für malignen Zellen zu fungieren (Prenzel et al., 2001; Salomon et al., 1995). In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das EGF Rezeptor System auch von Endometriosezellen als ein *survival pathway* benutzt werden kann und in wieweit eine endokrine Regulation des EGFR Systems vorliegt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass alle vier EGF Rezeptoren in peritonealen, ovariellen und rectovaginalen Endometrioseläsionen exprimiert werden (Abb.5, 6, 7). Zudem wurden statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den Expressionsmustern der einzelnen Rezeptoren und den Lokalisationen der Endometrioseläsionen gefunden. In den ovariellen Endometriosezysten zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von EGFR und der von ER, die einen inversen Charakter besitzt (Tab.8). Mit den Regulationsversuchen konnte eine endokrine Regulation von EGFR und HER-2 in Endometriosezellen gezeigt werden, wohingegen HER-3 und HER-4 nicht direkt von Östrogen beeinflusst wurden.

Die Expression von EGFR und HER-2 in endometriotischem Gewebe wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben. Allerdings sind die Daten dieser immunhistochemischen Untersuchungen widersprüchlich in Bezug auf das

Vorhandensein, die Lokalisation der Rezeptoren und ihrer Expressionsstärke (Bergqvist et al., 1991; Di Lieto et al., 1997; Melega et al., 1991; Prentice et al., 1992; Zhang et al., 1993). Bezug nehmend auf die kontroverse Datenlage ist allgemein zu berücksichtigen, dass bei den Untersuchungen verschiedene Methoden und Antikörper gegen EGFR eingesetzt wurden, die heute optimiert sind und somit besser interpretierbare Ergebnisse liefern. Zudem wurde in unserer Untersuchung eine größere Grundgesamtheit betrachtet, was die Ergebnisse besser beurteilbar macht. Der EGFR wurde bislang nur in peritonealen Endometrioseherden untersucht. Die Expression dieses Rezeptors wurde zum einen von Bergqvist als diffus-zytoplasmatisch beschrieben (Bergqvist et al., 1991), von Prentice et al. hingegen als membranständig charakterisiert (Prentice et al., 1992), wobei dort nur die Hälfte der 27 untersuchten Läsionen einen positiven Nachweis für EGFR zeigten. In unsere Untersuchungen konnte EGFR in allen drei Endometrioseformen detektiert werden. Dabei wurde hauptsächlich eine zytoplasmatische Lokalisation, wie bei Bergqvist beschrieben, beobachtet, aber auch einige membranständige Expressionsmuster festgestellt, was die Beobachtung von Prentice unterstützt (Abb. 5). Obwohl die EGF Rezeptoren hauptsächlich membranständig lokalisiert sind, ist auch für andere Gewebe eine diffus-zytoplasmatische Expression beschrieben worden (Hughes et al., 2004; Sorkin, 2001; Srinivasan et al., 2000; Wiley, 2003). Man geht davon aus, dass die Lokalisation der Rezeptoren abhängig ist von dem Aktivitätsgrad und der Phosphorylierung (Hughes et al., 2004). Die EGF Rezeptoren unterliegen einem ständigen Erneuerungsprozess, indem sie nach Ligandenbindung internalisiert und recycled werden. Der EGFR wird allerdings in Endosomen langsamer abgebaut und nicht recycelt (Wiley, 2003), so dass er noch eher als die anderen drei EGF Rezeptoren im Zytoplasma detektierbar ist. Da bei unseren Untersuchungen alle vier Rezeptoren fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert waren (Abb. 5, 6, 7), scheint es, dass die EGF Rezeptoren in Endometriosezellen hauptsächlich nach ihrer Aktivierung und folgender Internalisierung detektiert wurden. HER-4 bildete mit seiner nuklearen Lokalisation eine Ausnahme, auf die später noch eingegangen wird (Abb. 5, 6, 7). Bestätigend zu den immunhistochemischen Untersuchungen, wurde in der primären Zellkultur bei Einzelzellen zunächst ebenfalls eine diffus-zytoplasmatische der EGF Rezeptoren beobachtet (Abb. 10, 11). Interessanterweise konnte im Zellverband unter Ausbildung von sog. *stress fibers* ein starke membranständige EGFR-Expression beobachten werden, wobei der EGFR an den

Zell-Zell-Verbindungsstellen kumulierte (Abb.12). Gleiches wurde auch für die HER-2 Expression beobachtet. Dieses Phänomen wird als Translokation bezeichnet und ist für den EGFR beschrieben worden (Gladhaug et al., 1988), wobei der Auslöser der Translokation weitgehend unbekannt ist (Pike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002). Da die EGF Rezeptoren im membranständigen Zustand durch Ligandenbindung aktiviert werden, gehen wir davon aus, dass die Translokation von einem uns unbekanntem Stimulus induziert wird und somit die EGF Rezeptoren für ihre Aktivierung bereitgestellt werden.

Der EGFR wird in peritonealen Endometrioseläsionen sowohl im Epithel als auch Stroma exprimiert (Huang et al., 1994; Prentice et al., 1992). Huang et al. zeigten, dass die epithelialen Zellen eine stärkere Expression von EGFR aufwiesen als die stromalen Zellen (Huang et al., 1994) wohingegen Zhang et al. keinen Unterschied in der Expression zwischen den beiden Kompartimenten beschrieben (Zhang et al., 1993). Keine stromale Expression und nur eine schwache epitheliale Färbung wurde von Scotti et al. beobachtet (Scotti et al., 2000). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen unsere Untersuchungen, die zeigen, dass EGFR von allen vier EGF Rezeptoren der am stärksten exprimierte Rezeptor in den stromalen Zellen ist (Tab.6, 7, 8). Zudem wird er auch im Epithel der drei Läsionstypen exprimiert (Tab.6, 7, 8). Diese abweichenden Ergebnisse können durch verschiedene angewandte Methoden oder verschiedene Antikörper auftreten. Unsere immunhistochemischen Untersuchungen konnten wir mit einem zweiten, anderen Primärantikörper gegen EGFR bestätigen. Interessanterweise war der EGFR in den Stromazellen, die direkt an den epithelialen Zellen lokalisiert sind, am stärksten exprimiert, so dass sich ein stark angefarbter Ring um die Drüse bildete (Abb.5, 6, 7). Diese Zellen unterschieden sich auch morphologisch von den anderen Zellen, da sie kleiner und enger gepackt waren. Zudem war zu beobachten, dass die Expression von EGFR schwächer und diffuser wurde je weiter die stromalen Zellen von der Drüse entfernt lagen. Eine ähnliche Beobachtung machten Coleman et al. schon 1988 an der Brustdrüse einer Maus und schlossen daraus, dass das Epithel die Expression von EGFR im Stroma induziert (Coleman et al., 1988). Wechselwirkungen zwischen Epithel- und Stromazellen sind wurden schon von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Cunha et al., 2004; Roberts et al., 1988). Zum einen können unsere Untersuchungen darauf hinweisen, dass diese direkt an der Drüse anliegenden Stromazellen eine spezielle parakrine Funktion

besitzen, die das Zellwachstum sowie das Überleben der Zellen beeinflussen. Zum anderen können diese Zellen, die sich morphologisch eindeutig von den anderen Zellen absetzen, einer phänotypischen Änderung unterliegen. Diese Art der Änderung wird als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet und ist ebenfalls von mehreren Autoren beschrieben worden (Boyer et al., 2000; Guarino et al., 1999; Rosivatz et al., 2002). Die EMT ist ein natürliches Phänomen in der Entwicklung von Organen und der Wundheilung, bei dem sich epitheliale Zellen in mesenchymale umwandeln, indem ihr Zytoskelett neu geordnet wird (Guarino et al., 1999). Dieser Prozess beinhaltet u.a. den Verlust der adhäsiven Zellkontakte, Ausbildung einer fibroblastenartigen Zellform und eine erhöhte Zellmotilität (Hay, 2005). Da die EMT auch mit einem Verlust über die Wachstumskontrolle einhergehen kann, wird sie mit der malignen Transformation von Zellen in der Tumorgenese in Verbindung gebracht (Hay, 2005). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine EMT auch durch Wachstumsfaktoren aus der Familie der Tyrosinkinase Rezeptor-bindenden Faktoren, wie z.B. EGF oder Heregulin, induziert werden kann und somit ein verstärktes Wachstum über die EGF Rezeptor Signaltransduktionswege ausgelöst wird (Boyer et al., 2000; Kiemer et al., 2001). Das Vorkommen von EGF und anderen spezifischen Liganden der EGF Rezeptoren in endometriotischen Läsionen ist beschrieben worden (Scotti et al., 2000; Simms et al., 1991). Demir et al. konnten zeigen, dass Menstrualblut, welches durch retrograde Menstruation in den Bauchraum gelangt, eine EMT unter Einbeziehung von Tyrosinkinase assoziierten Signaltransduktionswegen auslösen kann (Demir et al., 2004). Auch Mai et al. gingen von einer Neuentstehung von Stromazellen in Endometrioseläsionen aus, die ebenfalls durch eine Transformation ausgelöst wurde. Zusätzlich wurde diskutiert, dass die schon bestehende Läsion als Produzent für EMT induzierende Faktoren, wie Wachstumsfaktoren oder Hormone, dienen kann und somit den Umwandlungsprozess und im weiteren Sinne ein gesteigertes Wachstum fördert (Mai et al., 1997). Nimmt man diese Fakten und Thesen zusammen, so kann man annehmen, sich die Zellen, die den von uns beobachteten Stromaring bilden, in der Phase einer epithelialen-mesenchymalen Transition befinden, die durch EGFR spezifische Wachstumsfaktoren induziert ist. Dies wäre ein Erklärungsansatz für das Wachstum der Endometrioseläsionen und ihre Metastasierung. Zudem zeigen unsere Untersuchungen, dass sich der Stromaring unter verschiedenen endokrinen Behandlungen verändert. Der Ring ist unter GnRH-

a-Therapie klarer und stärker ausgeprägt als unter OC-Gabe oder ohne endokrine Therapie (Abb.8). Daher scheint es, dass trotz Östrogenentzug die Endometriosezellen sich verbreiten und so einen endokrin resistenteren Phänotyp ausbilden können. Hier bedarf es zur vollständigen Klärung aber noch weiterer Untersuchungen.

Ein bestehender Zusammenhang zwischen dem EGFR und Östrogenrezeptor ist mittlerweile bewiesen. Auch in Endometrioseläsionen wurde ein möglicher Einfluss eines Östrogenentzuges auf die EGFR Expression schon untersucht. Di Lieto et al. und Melega et al. verglichen die Expression von EGFR in Endometrium und Endometrioseläsionen von 36 bzw. 41 Endometriosepatientinnen vor und nach der Therapie mit einem GnRH-Analogum (Goserelin) bzw. Danazol. Di Lieto stellte fest, dass die Behandlung mit dem GnRH-Analogum zu einer starken Abnahme der EGFR Expression sowohl im Endometrium als auch in den Endometrioseläsionen führte (Di Lieto et al., 1997). Melega beobachtete ein ähnliches Ergebnis nach der Behandlung mit Danazol. Dabei konnte er ebenfalls nachweisen, dass 20% der Patientinnen nach 6-monatiger Therapie keine Östrogenrezeptoren mehr exprimierten – wogegen die EGFR Expression zwar abgenommen hatte, aber noch nachweisbar war (Melega et al., 1991). Unsere Untersuchungen zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Therapie und der Expression von EGFR in den Endometrioseläsionen. Auch für HER-2 bis -4 ließ sich kein Zusammenhang mit der Therapie darstellen, die Expression des Östrogenrezeptors war auch nach Therapie mit GnRH-Analoga im Gegensatz zu den Untersuchungen von Melega unverändert. Ein Expressionsvergleich der EGF Rezeptoren und dem korrespondierenden Endometrium wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da der Fokus auf der endokrinen Regulation der EGF Rezeptoren in Endometrioseläsionen lag, auf die im weiteren Verlauf ausführlich eingegangen wird. Die Untersuchungen zur Expression von HER-2 in peritonealen Läsionen und ovariellen Endometriosezysten zeigten grundsätzlich nur eine schwache bis keine Expression von HER-2 (Bergqvist et al., 1991; Nasu et al., 1995; Schneider et al., 1998) wobei beschrieben wurde, dass der Rezeptor stärker in den epithelialen Zellen als in den Stromalen exprimiert wurde (Bergqvist et al., 1991). Unsere Ergebnisse bestätigen die Angaben, dass HER-2 hauptsächlich in den epithelialen Zellen exprimiert ist, wobei rectovaginalen Zellen die stärkste Expression zeigen (Diagramm 13, 14). HER-2 wird in den peritonealen, ovariellen und rectovaginalen Läsionen meist

schwach (48%; 25%; 58%) bis moderat exprimiert (35%; 42%; 13%), wobei die Expressionsmuster der EGF Rezeptoren in rectovaginalen Endometrioseläsionen vorher noch nicht untersucht wurden. Die Stromalen Zellen der ovariellen und rectovaginalen Endometrioseläsionen zeigen eine schwache (17%; 10%) bis keine (75%; 90%) Expression von HER-2. In den Stromazellen der peritonealen Läsionen war keine HER-2 Expression detektierbar.

Die vorhandenen Unterschiede in den Expressionsmustern der EGF Rezeptoren können verschiedene Ursprünge haben, die im weiteren Verlauf noch ausführlich diskutiert werden. HER-2 gilt als der bevorzugte Dimerisierungspartner für die anderen EGF Rezeptoren, obwohl er keinen bekannten Liganden besitzt (Hudelist et al., 2003). Trotzdem erhöht sich durch HER-2 in einem Heterodimer die Ligandenbindungsaffinität, was ein verlängertes und verstärktes Signal zu Folge hat (Citri et al., 2003). Der bevorzugte Dimerisierungspartner von HER-2 ist erstaunlicherweise HER-3, der keine Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Dieses Heterodimer ist besonders stabil und zeichnet sich durch eine hohe Ligandenbindung und potente Aktivierung der Signaltransduktionswege aus (Citri et al., 2003). In dieser Arbeit wurden erstmals die Expressionsmuster aller vier EGF Rezeptoren in verschiedenen Endometrioseläsionen untersucht. Molekularbiologische Untersuchungen zu den Bindungsverhältnissen der einzelnen Rezeptoren miteinander sind nicht unternommen worden. Aber die Tatsache, dass HER-2, HER-3 und HER-4 in den epithelialen Zellen zu über 70% koexprimiert sind, legt nahe, dass sich auch in endometriotischen Zellen potente Heterodimere ausbilden können, die die Proliferation und Migration der endometriotischen Zellen beeinflussen. Eine Koexpression von EGFR und HER-2 wird mit der Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps assoziiert, der sich negativ auf die Prognose des jeweiligen Tumors auswirkt (Normanno, Bianco et al., 2003). Auch für Endometriose kann gelegentlich ein aggressiverer Phänotyp unter, bzw. nach endokriner Therapie beobachtet werden (Ebert, 2003), so dass auch hier ein Zusammenhang mit der Expression von EGFR und HER-2 denkbar ist. Neben HER-2 Heterodimere können sich sowohl im Epithel als auch im Stroma EGFR oder HER-4 Homodimere, bzw. EGFR Heterodimere mit HER-3 und HER-4 ausbilden. Die Zusammensetzung der Dimere hat Einfluss auf die weitere Signaltransduktionskaskade und somit verschiedene Effekte auf die Zielzelle (Olayioye et al., 2000). Es ist also davon auszugehen, dass die EGF Rezeptoren verschiedene Funktionen im Stroma und im Epithel erfüllen.

Für HER-4 wurde neben seiner zytosolischen auch eine nukleare Lokalisation sowohl in den Epithel- als auch in den Stromazellen beobachtet (Abb. 5, 6, 7). Eine nukleare Detektion ist für den EGFR sowie für HER-3 und -4 für verschiedene Gewebe beschrieben worden, u.a. für endometriale Stromazellen oder beim invasiven Mammakarzinom (Gullick et al., 1998; Offterdinger et al., 2002; Srinivasan et al., 2000; Wells et al., 2002). Normalerweise nehmen die EGF Rezeptoren auf die Aktivierung von Zielstrukturen im Nukleus indirekt über Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden Einfluss (Carpenter, 2000). HER-4 ist aber in der Lage, die Genexpression im Nukleus direkter zu beeinflussen, zum einen durch eine eigene transkriptionale Aktivität und zum anderen als transkriptionaler Kofaktor (Heldin et al., 2001; Komuro et al., 2003; Williams et al., 2004). Durch Proteolyseprozesse in der membranösen Domäne des Rezeptors wird HER-4 in zwei Teile zerlegt, wovon der intrazelluläre Teil, der die aktive Tyrosine Kinasedomäne besitzt, in den Nukleus wandert. Dieses 80 kDa schwere Fragment von HER-4 konnte mittels Westernblot Analyse in den Primärzellen von uns nachgewiesen werden (Abb.18). Der proteolytische Vorgang wird als RIP für *regulated intramembrane proteolysis* bezeichnet, wobei der intrazelluläre Teil des Rezeptors im Falle von HER-4 durch eine γ -Secretase abgetrennt wird (Heldin et al., 2001). Ni et al. konnten zeigen, dass durch die Blockade der γ -Secretase das Wachstum von Fibroblasten, die eine HER-4-Überexpression aufwiesen, gehemmt wurde (Ni et al., 2001). Somit scheint die intrazelluläre Domäne von HER-4 eine Rolle bei der Expression von Genen zu spielen, die das Wachstum der Zelle kontrollieren. Auch für den EGFR gezeigt, dass Teile des aktivierten Rezeptors eine starke transkriptionale Aktivität aufwiesen und ebenso wie HER-4 das Wachstum der Zelle direkt beeinflussen können (Lin et al., 2001). Eine nukleare Lokalisation von EGFR konnte in den in dieser Arbeit untersuchten Endometrioseläsionen nur zu 1% gefunden werden und ist somit vernachlässigbar. Interessanterweise wurde für das nukleare HER-4-Fragment ein transkriptionaler Einfluss auf das *estrogen response element* (ERE), welches östrogene Wirkungen vermittelt, in Mammakarzinomzellen beobachtet (Zhu et al., 2006). Zudem war das Auftreten der nuklearen HER-4 Form mit dem Vorkommen des ER signifikant assoziiert (Junttila et al., 2005). Somit scheint eine weitere Interaktion zwischen dem EGF Rezeptor System und dem ER System zu bestehen, welche auch in Endometriosezellen zum Tragen kommen

könnten und somit das Wachstum der Zellen auf eine weitere Weise beeinflussen könnte.

Betrachtet man die Expressionsmuster der EGF Rezeptoren im Überblick, so fällt auf, dass sich die Muster im Epithel und Stroma für den EGFR, HER-3 und HER-4 gegenläufig verhalten. EGFR ist in allen drei Lokalisationen im Stroma hauptsächlich moderat exprimiert, im Epithel hingegen schwach bis gar nicht (Diagramm.11,12). Für HER-3 und HER-4 verhält es sich entgegengesetzt. Ist die epitheliale Expression der beiden Rezeptoren hoch, so ist die stromale eher gering (Diagramm 15, 16, 17, 18). Es scheint eine wechselseitige Beeinflussung auf die Expressionsstärke der EGF Rezeptoren in den endometriotischen Epithel- und Stromazellen vorzuliegen. Eine Ausnahme bildet die Expression von HER-2, die Stroma hauptsächlich gering bis gar nicht vorhanden ist. Wechselwirkungen zwischen epithelialen und stromalen Zellen sind bekannt, jedoch ist der Mechanismus, bei dem Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, bis heute ungeklärt (Cunha et al., 2004; Roberts et al., 1988). Unsere Ergebnisse sowie die Ausbildung des Stromarings von EGFR liegen nahe, dass in Endometrioseläsionen starke Wechselwirkungen zwischen Epithel- und Stromazellen vorliegen. Aber nicht nur die Epithelzellen können Einfluss auf die Stromazellen nehmen. Unlängst wurde von verschiedenen Autoren diskutiert, dass Stromazellen eine entscheidende Rolle von in der Tumorgenese besitzen (Bhowmick et al., 2005; Kim et al., 2005). Das Stroma kann, ebenso wie das Epithel, Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen und extrazelluläre Matrixproteine, von denen einige auch in Endometrioseläsionen nachgewiesen wurden wie z.B. EGF, exprimieren (Kim et al., 2005; Koninckx, Kennedy et al., 1999). Die dadurch hervorgerufenen Änderungen in der Mikroumwelt können Mutationen in Epithelzellen hervorrufen, die wiederum zu Transformationen führen können (Bhowmick et al., 2005). So ist anzunehmen, dass ein interzellulärer *cross talk* das Wachstum, die Progression und auch Differenzierungsprozesse der Endometrioseläsionen beeinflusst. Vergleicht man die einzelnen Rezeptorexpressionen in den drei untersuchten Läsionstypen, findet man statistisch signifikante Unterschiede in den Expressionsmustern der EGF Rezeptoren abhängig von der Lokalisation der Läsionen (Kap. 3.1.2). Interessanterweise zeigt sich für epitheliale Zellen, dass die signifikanten Expressionsunterschiede immer im Bezug auf die rectovaginalen Läsionen auftreten. So ähnelt sich das Expressionsmuster von EGFR im Epithel in den peritonealen und ovariellen Herden, unterscheidet sich aber von dem der

rectovaginalen Läsionen ($p=0,001$, bzw. $p=0,37$), da EGFR in den rectovaginal stärker exprimiert ist (Abb.11). Dieses Phänomen ist auch bei der epithelialen Expression von HER-3 ($p=0,004$ (perit-rv); $p=0,032$ (ov-rv)) und HER-4 ($p=0,001$ (perit-rv)) zu beobachten. HER-3 und HER-4 sind wesentlich stärker in den Epithelzellen der rectovaginalen Läsionen exprimiert (Diagramm 15, 16, 17, 18). Betrachtet man die stromale Expression der EGF Rezeptoren, so treten hier signifikante Unterschiede zwischen der peritonealen Expression von HER-3 und HER-4 und den beiden anderen Läsionstypen auf (alle $p=0.001$), da diese beiden EGF Rezeptoren fast keine stromale Expression in den peritonealen Läsionen aufweisen. Ein signifikanter Expressionsunterschied von HER-2 ist zwischen dem stromalen, ovariellen Expressionsmuster und dem der anderen beiden Läsionsarten vorhanden ($p=0,001$) (ov-perit); $p=0,009$ (ov-rv)). HER-2 ist im Stroma der peritonealen Herde gar nicht und in den rectovaginalen zu 90% nicht exprimiert. In den ovariellen Läsionen ist HER-2 in den stromalen Zellen im Vergleich stärker exprimiert, aber im Allgemeinen auch nur schwach (keine 75%, schwach 17%, moderat 8%). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsmuster der EGF Rezeptoren sich grundsätzlich ähneln, es aber doch signifikante Unterschiede in den Expressionen in den jeweiligen Lokalisationen gibt. Untersuchungen zu anderen Proteinexpressionen, wie z.B. von Matrixmetalloproteinasen, Kollagen IV oder der Aromatase, zeigen ebenfalls lokalisationsabhängige Expressionsunterschiede (Dufournet et al., 2006; Heilier et al., 2006; Nezhat et al., 2002). Da die Pathogenese der Endometriose bislang ungeklärt ist, gibt es kontroverse Meinungen über die Entstehung der verschiedenen Erscheinungsformen der Endometriose. Es wurde diskutiert, dass peritoneale, ovarielle und rectovaginale Endometrioseläsionen als drei eigenständige Erkrankungen mit unterschiedlichen Pathogenesen definiert werden sollten (Brosens et al., 2000; Donnez et al., 1996; Nisolle et al., 1997). Dabei sollte die peritoneale Endometriose sich retrograde Menstruation und folgende Implantation von Endometriumfragmenten an das Peritoneum manifestieren, wohingegen die ovarielle Endometriose aus metaplastischen Vorgängen entsteht. Da die rectovaginale Form der Endometriose einen ähnlichen Aufbau ist wie Adenomyoma zeigen, wird die Entstehung dieser Form durch Überbleibsel der Müllergänge postuliert (Nisolle et al., 1997). So könnten unsere Ergebnisse von lokalisationsabhängigen Expressionsmustern der EGF Rezeptoren durchaus die These unterstützen, dass peritoneale, ovarielle und rectovaginale

Endometrioseläsionen drei Entitäten verschiedenen Ursprungs sind. Andererseits können die unterschiedlichen Expressionsmuster auch ein Resultat der verschiedenen Mikroumwelten sein, die die Manifestation und Entwicklung der endometriotischen Läsionen beeinflussen. Die Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu der von gesunden Frauen (Giudice et al., 2004). Es ist z.B. die Zahl der aktivierten Makrophagen erhöht und dadurch auch die Konzentrationen diverser Zytokine, wie TNF alpha, verschiedener Interleukine, Wachstumsfaktoren oder angiogenetischer Faktoren (Siristatidis et al., 2006; Ulukus et al., 2005). Auf das proinflammatorische Milieu und die immunologische Komponente der Endometriose soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden. Wichtig ist allerdings, dass die peritonealen Endometrioseläsionen eher von der Peritonealflüssigkeit beeinflusst werden, wohingegen ovarielle Läsionen einer Mikroumwelt mit viel höheren Steroidhormonkonzentration ausgesetzt sind (Koninckx, Kennedy et al., 1999). Dies könnte eine Erklärung für die signifikant höhere HER-2 Expression im Stroma der ovariellen Herde sein, da eine endokrine Regulation des HER-2 schon für andere Gewebe beschrieben wurde (Yarden, 2001). Auch die rectovaginalen Endometrioseläsionen unterliegen dem Einfluss der Mikroumwelt, die allerdings an dieser Lokalisation anders zusammengesetzt sein kann. Zeigt die rectovaginale Endometriose ein invasives Wachstum, so können auch immunologische Faktoren aus dem Blut Einfluss auf die Expression von Zytokinen und Proteinen in den Läsionen nehmen (Koninckx, Kennedy et al., 1999). Diese Annahmen bieten eine mögliche Begründung für die unterschiedliche epitheliale wie auch stromale Expression von EGFR, HER-3 und HER-4 in rectovaginalen und auch peritonealen Läsionen im Vergleich zu den jeweils anderen Läsionstypen.

EGF Rezeptoren nehmen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Der Proliferationsmarker Ki67 wird in der G1 bis hin zur M Phase des Zellzykluses exprimiert, aber nicht in der G0 Phase und kann somit als ein Marker für Zellproliferation und Wachstum genommen werden (Gerdes et al., 1984). Nicholson et al. untersuchten, ob die Expression der EGF Rezeptoren in Mammakarzinomen mit einer erhöhten Proliferationsrate (gemessen durch Ki67) der Tumorzellen zusammenhing. Nur für EGFR konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression und erhöhter Proliferationsrate gefunden werden. Es wurde postuliert, dass HER-2, -3 und -4 indirekt Einfluss auf die Proliferation der Zellen nehmen

können, indem sie mit anderen Systemen, die das Zellwachstum regulieren wie dem ER System, interagieren (Knowlden et al., 1998; Nicholson et al., 1993). In unseren Untersuchungen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression und der Expression von Ki67 gefunden werden, wenn gleich positive Tendenzen zu beobachten waren. Dies kann mit der zytoplasmatischen Lokalisation der EGF Rezeptoren zusammenhängen, die auf ein postaktives Stadium der EGF Rezeptoren hinweist. Andererseits können die EGF Rezeptoren auch, wie Nicholson postulierte, über andere Rezeptorsysteme indirekt Einfluss auf die Proliferation. Es ist mehrfach beschrieben und gilt als bewiesen, dass zwischen den EGF Rezeptor System und dem ER System ein enger *cross talk* besteht (Lee et al., 2001; Schiff et al., 2004; Smith, 1998). Der ER ist in den Epithelien aller von uns untersuchten Läsionen im Durchschnitt zu 92% und im Stroma zu 76% im Zellkern exprimiert (Abb.19). Es ist bekannt, dass Endometriose eine östrogenabhängige Erkrankung ist (Kitawaki et al., 2002), auch wenn die Ansprechbarkeit der Endometriosezellen auf Östrogen variabler ist als die der Endometriumzellen (Fujimoto et al., 1999). Dies führt zu ineffektiven Resultaten bei der endokrinen Behandlung der Endometriose, was zudem mit hohen Rezidivraten einhergeht (Scotti et al., 2000; Waller et al., 1993). Aufgrund dieser Tatsachen nimmt man an, dass andere Systeme neben dem ER System das Wachstum der Endometriosezellen und die Progression der Erkrankung unter Östrogenentzug sicherstellen. In Hinblick darauf haben wir die Expression der EGF Rezeptor Familie in Endometriose untersucht, da bekannt ist, dass dieses Rezeptorsystem auch in anderen hormonabhängigen Tumorarten als *survival pathway* fungiert (Salomon et al., 1995). Nicholson et al. beschrieben eine inverse Korrelation zwischen dem ER α und EGFR, bzw. HER-2 im Mammakarzinom (Nicholson et al., 2002). Auch unsere immunhistochemischen Untersuchungen zeigen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den epithelialen Expressionsmustern von ER α und EGFR, die einen inversen Charakter aufweist. Allerdings konnte dieser Zusammenhang nur in den ovariellen Endometrioseläsionen gefunden werden. Da ovarielle Läsionen einer anderen Mikroumwelt ausgesetzt sind, die z.B. wesentlich höhere Steroidhormonkonzentrationen besitzt als die am Peritoneum (Koninckx, Kennedy et al., 1999), ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass das umgebende Milieu signifikante Einflüsse auf die Expression der EGF Rezeptoren hat. Wie vorher schon angesprochen stellen die hohen Rezidivraten von 50-75% innerhalb von fünf Jahren nach operativer und endokriner Behandlung ein

großes Problem in der Behandlung der Endometriose dar (Waller et al., 1993). Die sekundäre Tamoxifen (Antiöstrogen)-Resistenz im Mammakarzinom ist oftmals mit der inversen Expression von ER α und EGFR, bzw. HER-2 assoziiert. So scheinen die EGF Rezeptoren nicht nur als *survival pathway*, sondern auch im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Antiöstrogen-Resistenz in diesem Tumor zu stehen (Britton et al., 2006; Schiff et al., 2004). So ist es möglich, die EGF Rezeptoren die Ausbildung einer endokrinen Resistenz in der Endometriose begünstigen. Um den Einfluss eines Östrogenmangels auf die Endometriosezellen zu analysieren, wurde erfolgreich ein *in vitro*-Modell der Endometriose entwickelt und zusätzliche Untersuchungen mit der Endometriosezelllinie 12Z unternommen. Alle vier Rezeptoren wurden in den epithelialen sowie in den stromalen Zellen mittels Doppelfärbung in unserem primären Zellkulturmodell nachgewiesen (Abb.10, 11). Da das Zellkulturmodell aus Endometrioma etabliert wurde, konnte HER-2 auch im Stroma nachgewiesen werden anlehnend an die immunhistochemischen Ergebnisse. Die Downregulation des EGFR durch seinen Liganden EGF ist für verschiedene Gewebe in der Literatur beschrieben. Es wird angenommen, dass EGF eine interne Kontrolle für den Expressionslevel von EGFR darstellt und somit die EGFR vermittelten Effekte wie die Proliferation steuern kann (Carpenter et al., 1975; Watson et al., 1994). Unsere Charakterisierung der primären Zellkultur zeigt eine Downregulation von EGFR bei Zugabe von EGF (Abb.15). Wir gehen also davon aus, dass das EGF Rezeptorsystem in unserem Zellkulturmodell funktionsfähig ist. Die Regulierung der weiteren EGF Rezeptoren lässt sich über den *cross talk* der Rezeptoren untereinander erklären (Abb.16-18), allerdings ist die Funktionalität durch Zugabe anderer spezifischer Liganden nicht weiter belegt worden. Die Ergebnisse der Regulationsversuche zeigen, dass Östrogen einen direkten Einfluss auf die Expression von EGFR und HER-2 nimmt. Unter Östrogenmangel ist im *in vitro*-Modell eine Hochregulation des EGFR zu beobachten. HER-2 wird unter Östrogenmangel hingegen runterreguliert. So lässt sich auch in der Zellkultur ein enger *cross talk* zwischen dem EGF Rezeptor System und dem ER System beweisen. Als molekularer Mechanismus, der den *cross talk* zwischen dem ER System und anderen Signaltransduktionswegen steuert, wird die Phosphorylierung des ER postuliert (Lundholt et al., 2001). So konnte gezeigt werden, dass die MAP Kinase, die über die EGFR Signaltransduktionsweg aktiviert wird, den ER an der phosphoryliert und den Rezeptor somit aktiviert (Hynes et al., 2005). McClelland et

al. untersuchten die Expression von EGFR und ER in MCF-7 Brustkrebszellen, die mittels ICI 182 780 über drei Monaten in einem Östrogenentzug kultiviert wurden. Sie konnten zeigen, dass der ER runterreguliert wurde und das Zellwachstum über die EGF Rezeptor Signaltransduktionswege beeinflusst wurde (McClelland et al., 2001). In unseren Versuchen wurden die Zellen nur 72h einem Östrogenentzug ausgesetzt. Eine Hochregulation des EGFR, war deutlich zu erkennen, wohingegen keine Downregulation von ER α detektiert werden konnte. Es ist daher möglich, dass die Endometriosezellen erst über einen länger andauernden Östrogenentzug den ER α runterregulieren. Damit würde sich auch der in der Immunhistochemie festgestellte inverse Zusammenhang zwischen EGFR und ER α in den Epithelien der ovariellen Läsionen bestätigen. Die Ergebnisse der Regulationsversuche zeigen explizit, dass die Endometriosezellen EGFR und die damit zusammenhängenden Signaltransduktionskaskaden als *survival pathway* nutzen können und so auch Östrogenunabhängig proliferieren können. Obwohl keine direkte endokrine Regulation von HER-3 und HER-4 im *in vitro*-Modell gefunden werden konnte, können diese Rezeptoren dennoch indirekt auf die ER-Aktivierung Einfluss nehmen. Da der ER α auch unter endokriner Therapie in den Endometrioseläsionen exprimiert wird, könnte er auch unter Östrogenmangel durch die EGF Rezeptoren aktiviert werden (Britton et al., 2006; Osborne et al., 2001). So kann, wie schon an anderer Stelle besprochen, die nukleare Form des HER-4 mit dem ERE im Nukleus interagieren und die ER-assoziierte Transkription verstärken (Junttila et al., 2005). Neben seiner klassischen genomischen Aktivität, besitzt der ER auch eine nichtgenomische, über die auch EGFR aktiviert werden kann (Levin, 2001). Andererseits kann ER auch durch eine Reihe von Kinasen, wie c-Src, Erk1/2 oder Akt phosphoryliert und damit aktiviert werden (Levin, 2005; Osborne et al., 2005). Diese Kinasen gehören u.a. zu der EGF Rezeptor Signaltransduktionskaskade (Yarden, Sliwkowski, 2001). Somit können HER-3 und HER-4, auch wenn sie in unseren Regulationsversuchen nicht wie EGFR direkt von endokrin reguliert werden, großen Einfluss auf die Aktivierung des ER in endometriotischen Zellen nehmen. Somit würden die EGF Rezeptoren auf zwei verschiedene Wege das Überleben der Zellen unter Östrogenentzug sichern.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das EGF Rezeptor System auf multiple Weise auf die molekularen Abläufe in Endometriosezellen Einfluss nimmt. Zudem bietet es den Endometriosezellen unter Östrogenentzug einen *survival pathway*, so

dass die Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps unter endokriner Therapie und die hohen Rezidivraten der Endometriose im direkten Zusammenhang mit dem EGF Rezeptor System stehen können.

Diese Arbeit bietet eine gute Grundlage für eine weitere Erforschung der molekularen Netzwerke der Endometriosezellen und ihrer klinischen Auswirkungen in der benignen Tumorerkrankung der Endometriose.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden erstmals alle vier EGF Rezeptoren in endometriotischen Läsionen nachgewiesen und ihre endokrine Regulation in Endometriosezellen untersucht.

Endometriose ist eine gutartige, hormonabhängige Erkrankung, die medikamentös mittels Östrogenentzug behandelt wird. Sie weist jedoch auch Parallelen zu malignen Erkrankungen auf, wie Metastasierung und invasives Wachstum. Zudem ist die endokrine Therapie häufig unzureichend, was sich auch in den hohen Rezidivraten (50-80% innerhalb von fünf Jahren) widerspiegelt. Die Rezidive sind oftmals schlechter endokrin behandelbar, so dass sich ein anderer Phänotyp herauszubilden scheint. Es ist daher davon auszugehen, dass die Endometriosezellen andere Systeme als *survival pathway* benutzen können und somit das Wachstum Progression der Endometrioseläsionen unter endokriner Downregulation sichern. Das EGF Rezeptor-System, mit seinen Vertretern EGFR und HER-2 bis -4, ist stark mit endokrin-abhängigen, malignen Erkrankungen assoziiert und kann als *survival pathway* für diese Tumorzellen fungieren, wie z.B. HER-2 im Mammakarzinom. Über einen möglichen Einfluss dieses Systems in der Endometriose ist wenig bekannt. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die EGF Rezeptoren in Endometrioseläsionen exprimiert werden und weiterführend von den Endometriosezellen als *survival pathway* unter endokriner Therapie benutzt werden können und somit ein Einfluss der EGF Rezeptoren auf die Behandelbarkeit und Rezidivbildung der Endometriose postuliert werden kann.

Im ersten Schritt der Untersuchungen wurden die EGF Rezeptoren per Immunhistochemie in endometriotischen Läsionen nachgewiesen. Dabei wurden die Expressionsmuster der vier EGF Rezeptoren in 48 peritonealen, 12 ovariellen und 32 rectovaginalen Endometrioseläsionen untersucht und unter den drei Läsionstypen verglichen. Zudem wurden das Expressionsmuster von und die Proliferationsraten mittels Ki67 der endometriotischen Läsionen bestimmt. Es erfolgte eine statistische Auswertung der Expressionsmuster der EGF Rezeptoren und des ER α unter Einbeziehung der klinischen Daten der Patientinnen im generellen linearen Modell (GLM). Im zweiten Schritt sollte die endokrine Regulation der EGF Rezeptoren in primären Endometriosezellen analysiert werden. Dafür wurde ein *in vitro*-Modell der

Endometriose etabliert und die Anwesenheit der vier EGF Rezeptoren per Immunfluoreszenz-Färbung geprüft. Im *in vitro*-Modell wurde dann zunächst die Funktionalität des EGFR durch Gabe eines Liganden mittels Westernblot Analyse untersucht. Folgend wurde der Einfluss eines Östrogenentzuges über 24h, 48h und 72h auf alle vier EGF Rezeptoren ebenfalls mittels Westernblot Analyse analysiert.

Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst.

- Alle vier EGF Rezeptoren sind in peritonealen, ovariellen und rectovaginalen Endometrioseläsionen exprimiert und können Einfluss auf das Wachstum, die Progression und Migration von Endometriosezellen nehmen.
- Die Expressionsmuster der vier Rezeptoren verliefen tendenziell gegenläufig in den epithelialen Zellen verglichen mit den stromalen Zellen, so dass ein direkte Interaktion, bzw. Regulation zwischen beiden Zelltypen wahrscheinlich ist.
- Die stromale Expression des EGFR zeigt sich in allen drei Läsionstypen in Form eines Ringes um die Epithelzellen, wobei der EGFR in den Stromazellen, die direkt an den epithelialen Zellen lokalisiert sind, am stärksten exprimiert ist. Dieses Phänomen weist auf eine spezielle parakrine Funktion dieser Stromazellen in dem *cross talk* zwischen Stroma und Epithel hin. Es kann aber auch in einen Zusammenhang mit der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) gestellt werden, die schon anderweitig für peritoneale Endometrioseläsionen diskutiert wurde.
- Die Koexpression von EGFR und HER-2 kann mit der Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps, wie aus anderen Tumoren bekannt, assoziiert werden.
- Die nukleare Expression von HER-4 zeigt eine mögliche Rolle dieses Rezeptors als Transkriptionsfaktor auf, der so auch indirekt über eine beschriebene Interaktion mit dem *estrogen response element* im Nukleus auf die ER α vermittelten Signale Einfluss nehmen kann.
- Die unterschiedlichen Expressionsmuster der einzelnen Rezeptoren in den peritonealen, ovariellen und rectovaginalen Läsionen lassen sich durch den Einfluss der jeweiligen verschiedenen Mikroumwelten erklären. Ein anderer Erklärungsansatz bietet die These, dass die drei Läsionstypen verschiedene Pathogenesen besitzen, so dass sich zwangsläufig Unterschiede in den Expressionen der EGF Rezeptoren ergeben.
- Statistisch signifikante Zusammenhänge konnten nur zwischen den Expressionsmustern der EGF Rezeptoren und den jeweiligen Lokalisationen der

Läsionen gefunden werden (s. vorherigen Punkt). Es konnten keine Einflüsse auf die Expressionsmuster durch die Therapie, die Zyklusphase, das Stadium, die Proliferation in den Läsionen gefunden werden.

- In den ovariellen Läsionen konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen EGFR und ER α , die eine inverse Tendenz zeigt, festgestellt werden. Dieser Zusammenhang weist darauf hin, dass wie im Mammakarzinom ein *cross talk* zwischen dem EGF Rezeptor System und dem ER System besteht.
- Diese Interaktion zwischen dem EGFR und dem ER α System kann mit der Ausbildung von endokrinen Resistenzen assoziiert werden, wie sie bereits im Mammakarzinom beschrieben wurde. Ein solcher Zusammenhang bietet einen Erklärungsansatz für die hohen Rezidivraten, die auch unter endokriner Therapie auftreten.
- Die im *in vitro*-Modell durchgeführten Versuche zeigen eine direkte endokrine Regulation von EGFR und HER-2, HER-3 und HER-4 werden nur indirekt beeinflusst.
- Der EGFR wird unter Östrogenentzug hochreguliert, so dass die Endometriosezellen das EGF Rezeptor System unter Östrogenmangel als *survival pathway* nutzen können.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die EGF Rezeptoren multifaktoriell an den biologischen Abläufen in den Endometriosezellen beteiligt sind. Sie können mit der Progression, Metastasierung, den hohen Rezidivraten und der Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps der Endometriose assoziiert werden. Zudem kann das EGF Rezeptor System unter Östrogenentzug als *survival pathway* fungieren. Somit weist die Endometriose, die als gutartig gilt, eine weitere Ähnlichkeit zu malignen Tumoren auf.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich aber auch Optionen neue Therapieansätze ableiten, die in der Behandlung der Endometriose dringend benötigt werden. Die Inhibition der EGF Rezeptoren mittels Tyrosinkinaseinhibitoren (Tarceva™) oder monoklonalen Antikörpern (Herceptin™) ist als Monotherapie oder in Kombination mit ER Blockern zur Behandlung verschiedener Tumore Standard. Eine Kombinationstherapie der Endometriose mittels Östrogenentzugs und eines EGFR-Inhibitors könnte sowohl die Progression und somit die Rezidivraten dieser Erkrankung positiv beeinflussen und somit auf lange Sicht zu einem Umdenken in der Endometriosetherapie führen.

6 Literaturverzeichnis

- Barlow DH, Kennedy S Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu Rev Med* 2005;56:345-56.
- Bergqvist A, Borg A, Ljungberg O Protooncogenes in Endometriotic and Endometrial Tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1991;626:276-85.
- Bergqvist A, Melin A, Sparén P Endometriosis and the risk of malignancy especially ovarian cancer. *International Congress Series* 1271 2004;232-5.
- Bhowmick N, Moses H Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:97-101.
- Boyer B, Valles AM, Edme N Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1091-9.
- Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, et al. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96:131-46.
- Brosens IA, Brosens JJ Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease? *Hum Reprod* 2000;15:1-3.
- Carpenter G The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 2000;22:697-707.
- Carpenter G ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 2003;284:66-77.
- Carpenter G, Lembach KJ, Morrison MM, et al. Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem* 1975;250:4297-304.
- Chlouber RO, Olive DL, Pritts EA Investigational drugs for endometriosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2006;15:399-407.
- Ciardello F, De Vita F Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in cancer therapy. *Prog Drug Res* 2005;63:93-114.
- Ciardello F, Tortora G A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7:2958-70.
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003;284:54-65.
- Coleman S, Silberstein GB, Daniel CW Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev Biol* 1988;127:304-15.
- Crosignani PG, Olive D, Bergqvist A, et al. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update* 2006;12:179-89.
- Cunha G, Cooke P, Kurita T Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 2004;67:417-34.
- Damario MA, Rock JA Pain recurrence: a quality of life issue in endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 1995;50 Suppl 1:S27-42.
- Demir AY, Groothuis PG, Nap AW, et al. Menstrual effluent induces epithelial-mesenchymal transitions in mesothelial cells. *Hum Reprod* 2004;19:21-9.
- D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, et al. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med* 2003;21:243-53.
- Di Lieto A, De Rosa G, Albano G, et al. Influence of goserelin depot therapy on epidermal growth factor receptor expression in pelvic endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 1997;11:17-20.
- Di Silvestro P, Gold M, Gould N Malignancies arising in Endometriosis. *Prim Care Update Ob/Gyns* 1999;6:122-4.

- Donnez J, Nisolle M, Smoes P, et al. Peritoneal endometriosis and "endometriotic" nodules of the rectovaginal septum are two different entities. *Fertil Steril* 1996;66:362-8.
- Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, et al. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol* 2006;70:151-62.
- Ebert AD. *Endometriose*. Berlin, New York: Walter de Gruyter Verlag, 2003.
- Fedele L, Berlanda N Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 2004;9:167-77.
- Fischer OM, Hart S, Gschwind A, et al. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1203-8.
- Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H, et al. Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod* 1999;5:742-7.
- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, et al. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 1995;346:1463-4.
- Gazvani R, Templeton A Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002;123:217-26.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-5.
- Giudice L, Kao L Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-99.
- Gladhaug IP, Christoffersen T Rapid constitutive internalization and externalization of epidermal growth factor receptors in isolated rat hepatocytes. Monensin inhibits receptor externalization and reduces the capacity for continued endocytosis of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1988;263:12199-203.
- Grunwald V, Hidalgo M Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:851-67.
- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:361-70.
- Guarino M, Micheli P, Pallotti F, et al. Pathological relevance of epithelial and mesenchymal phenotype plasticity. *Pathol Res Pract* 1999;195:379-89.
- Gullick WJ, Srinivasan R The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:43-53.
- Halis G, Kopf A, Bartley J, et al. Schmerztherapeutische Optionen bei Endometriose. *Deutsches Ärzteblatt* 2006;103:1146-53.
- Hay ED The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233:706-20.
- Heilier JF, Donnez O, Van Kerckhove V, et al. Expression of aromatase (P450 aromatase/CYP19) in peritoneal and ovarian endometriotic tissues and deep endometriotic (adenomyotic) nodules of the rectovaginal septum. *Fertil Steril* 2006;85:1516-8.
- Heldin CH, Ericsson J Signal transduction. RIPping tyrosine kinase receptors apart. *Science* 2001;294:2111-3.
- Holbro T, Hynes NE ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:195-217.
- Huang JC, Yeh J Quantitative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1097-101.
- Hudelist G, Singer CF, Manavi M, et al. Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:353-61.

- Hughes DP, Thomas DG, Giordano TJ, et al. Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and Her-2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma. *Cancer Res* 2004;64:2047-53.
- Hynes NE, Lane HA ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341-54.
- Junttila TT, Sundvall M, Lundin M, et al. Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:1384-93.
- Keckstein, Wiesinger Deep endometriosis, including intestinal involvement - the interdisciplinary approach. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2005;14:160-6.
- Kiemer AK, Takeuchi K, Quinlan MP Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene* 2001;20:6679-88.
- Kim J, Stein R, MJ OH Tumour-Stromal Interactions in Breast Cancer: The role of Stroma in Tumourigenesis. *Tumor Biol* 2005;26:173-85.
- Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, et al. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;83:149-55.
- Knowlden JM, Gee JM, Seery LT, et al. c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene* 1998;17:1949-57.
- Komuro A, Nagai M, Navin N, et al. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem* 2003;278:33334-41.
- Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecol Obstet Invest* 1999;47 Suppl 1:3-9; discussion -10.
- Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid. *Gynecol Obstet Invest* 1999;47 Suppl 1:23-33.
- Lee AV, Cui X, Oesterreich S Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:4429s-35s; discussion 11s-12s.
- Levin ER Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 2001;91:1860-7.
- Levin ER Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005;19:1951-9.
- Leyendecker G, Kunz G, Noe M Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update* 1998;4:752-62.
- Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:802-8.
- Lundholt B, Briand P, Lykkesfeldt Growth inhibition and growth stimulation by estradiol of estrogen receptor transfected human breast cancer cell lines involve different pathways. *Breast Cancer Research and Treatment* 2001;67:199-214.
- Mai KT, Yazdi HM, Perkins DG, et al. Pathogenetic role of the stromal cells in endometriosis and adenomyosis. *Histopathology* 1997;30:430-42.
- Mamot C Anti-EGFR-Immunoliposomen - Liposomen der nächsten Generation. *Schweiz Med Forum* 2003;37:876-79.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:903-13.
- McClelland RA, Barrow D, Madden TA, et al. Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the

- presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology* 2001;142:2776-88.
- Melega C, Balducci M, Bulletti C, et al. Tissue factors influencing growth and maintenance of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1991;622:256-65.
- Meyer R Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sacromatosa. *Zentralbl Gynakol* 1919;36:754.
- Nasu K, Hayata T, Takai N, et al. Immunohistochemical study of c-erb B-2 protein expression in endometriosis. *Hum Reprod* 1995;10:935-7.
- Nezhat FR, Kalir T Comparative immunohistochemical studies of endometriosis lesions and endometriotic cysts. *Fertil Steril* 2002;78:820-4.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, et al. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 2001;294:2179-81.
- Nicholson RI, Gee JM, Knowlden J, et al. The biology of antihormone failure in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80 Suppl 1:S29-34; discussion S5.
- Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, et al. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, estrogen-receptor-positive breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2002;963:104-15.
- Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer* 1993;29A:1018-23.
- Nisolle M, Donnez J Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997;68:585-96.
- Normanno N, Bianco C, De Luca A, et al. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:1-21.
- Normanno N, Maiello MR, De Luca A Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? *J Cell Physiol* 2003;194:13-9.
- Offterdinger M, Schöfer C, Weipoltshammer K, et al. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 2002;157:929-39.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* 2000;19:3159-67.
- Osborne CK, Schiff R Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005;23:1616-22.
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, et al. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res* 2001;7:4338s-42s; discussion 411s-412s.
- Pike LJ, Casey L Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* 2002;41:10315-22.
- Prentice A, Thomas EJ, Weddell A, et al. Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: an immunohistochemical study. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:395-8.
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:11-31.
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.

- Roberts DK, Walker NJ, Lavia LA Ultrastructural evidence of stromal/epithelial interactions in the human endometrial cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:854-61.
- Roepstorff K, Thomsen P, Sandvig K, et al. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem* 2002;277:18954-60.
- Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 2002;161:1881-91.
- Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183-232.
- Sampson J Endometrial carcinoma of the ovary arising in endometrial tissue of that organ. *Arch Surg* 1925;10:1-72.
- Sampson J Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
- Schiff R, Massarweh SA, Shou J, et al. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 2004;10:331S-6S.
- Schneider J, Jimenez E, Rodriguez F, et al. c-myc, c-erb-B2, nm23 and p53 expression in human endometriosis. *Oncol Rep* 1998;5:49-52.
- Schweppe KW Therapie der Endometriose unter Berücksichtigung der Aktivitätsgrade. *Gynäkologie* 2002;35:255-61.
- Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, et al. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2000;6:610-7.
- Simms JS, Chegini N, Williams RS, et al. Identification of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor in surgically induced endometriosis in rats. *Obstet Gynecol* 1991;78:850-7.
- Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, et al. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2006;32:162-70.
- Smith C Cross-Talk between Peptide Growth Factor and Estrogen Receptor Signaling Pathways. *Biol Reprod* 1998;58:627-32.
- Somigliana E, Viganò P, Parazzini F, et al. Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol Oncol* 2006;101:331-41.
- Sorkin A Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling. *Biochem Soc Trans* 2001;29:480-4.
- Srinivasan R, Gillett CE, Barnes DM, et al. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res* 2000;60:1483-7.
- Stern DF ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 2003;284:89-98.
- Swiersz LM Role of endometriosis in cancer and tumor development. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:281-92; discussion 93-5, 396-406.
- Ulukus M, Arici A Immunology of endometriosis. *Minerva Ginecol* 2005;57:237-48.
- Van Gorp T, Amant F, Neven P, et al. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:349-71.
- Vercellini P Endometriosis: what a pain it is. *Semin Reprod Endocrinol* 1997;15:251-61.

- Waller K, Shaw R Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long term follow-up. *Fertil Steril* 1993;59:511-5.
- Watson H, Franks S, Bonney RC Characterization of epidermal growth factor receptor in human endometrial cells in culture. *J Reprod Fertil* 1994;101:415-20.
- Wells A EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:637-43.
- Wells A, Marti U Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:697-702.
- Wiley HS Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 2003;284:78-88.
- Williams CC, Allison JG, Vidal GA, et al. The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol* 2004;167:469-78.
- Yarden RI, Lauber AH, El-Ashry D, et al. Bimodal regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen in breast cancer cells. *Endocrinology* 1996;137:2739-47.
- Yarden RI, Wilson MA, Chrysogelos SA Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: a possible mechanism to modulate growth. *J Cell Biochem Suppl* 2001;Suppl 36:232-46.
- Yarden Y Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001;61 Suppl 2:1-13.
- Yarden Y, Sliwkowski MX Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.
- Zhang R, Wild R, Medders D, et al. Epidermal growth factor receptors in endometriosis. *Am J Gynecol Health* 1993;7:33-7.
- Zhu Y, Sullivan LL, Nair SS, et al. Coregulation of Estrogen Receptor by ERBB4/HER4 Establishes a Growth-Promoting Autocrine Signal in Breast Tumor Cells. *Cancer Res* 2006;66:7991-8.

Danksagungen

Bei Prof. Andreas D. Ebert möchte ich mich für die Bereitstellung meines Promotionsthemas und für sein in mich gesetztes Vertrauen bedanken. Zudem danke ich ihm sehr für seine großzügige Förderung und seine unübertroffene Fähigkeit der Motivation in schwierigen Zeiten.

Besonders herzlich möchte ich bei meinen Kolleginnen, Dr. Sylvia Mechsner, Jessica Schwarz und Dr. Julia Bartley für ihre Freundschaft, ihren Beistand und die hervorragende Teamarbeit bedanken.

Claudia Beutler gilt mein Dank für ihre Assistenz und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Gilbert Schönfelder für seine Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Dr. Andreas Kaufmann danke ich für seine Hilfe, die guten Anregungen und so manche Korrektur.

Dr. Christoph Loddenkemper und Dr. Bernhard Heine aus dem Institut der Pathologie, Charité-CBF, danke ich für die gute Kooperation und die Hilfestellung bei immunhistochemischen Auswertungen.

Mein allgemeiner Dank gilt Prof. Achim Schneider und allen weiteren Mitarbeitern der Klinik für Gynäkologie, Charité-CBF, für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein wärmster Dank gilt meiner Familie und meinem Ehemann Holger, die mich durch die Höhen und Tiefen meiner Promotion begleitet und immer unterstützt haben.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, insbesondere bei Dr. Juliane Platz, Dr. Guido Kruse, Markus Höpfl, Dr. Judith Sendzik, Dr. Alexander Hüther, Daniel Höpfner, Christine Schuhknecht, Andreas Mach, Ines Funke, Dr. Christine Fuhst, Joachim Trapp und Dr. Kristina Leuner, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

LEBENS LAUF

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

Publikationsliste Johanna Herbel, geb. Thode

Originalarbeiten

Johanna Thode, Sylvia Mechsner, Gülden Halis, Julia Bartley, Jessica Schwarz, Islam Magalov, Andreas D. Ebert
Sexulasteroidrezeptoren als Targets nutzen.
Gynäkologie und Geburtshilfe (2006), 2: 28-34

Gülden Halis, Andreas Kopf, Julia Bartley, Sylvia Mechsner, **Johanna Thode**, Achim Schneider und Andreas D. Ebert
Schmerztherapeutische Optionen bei Endometriose.
Deutsches Ärzteblatt (2006), 103 (17): A 1146-53

S. Mechsner, J. Schwarz, J. Bartley, **J. Thode**, C. Loddenkemper, D.S. Salomon and A.D. Ebert A.D
GAP-43 positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels locate close to peritoneal endometriotic lesions. Fertil Steril. 2007 Apr 3; [Epub ahead of print]

Herbel, J., Müller, E., Bartley, J., Heine, H., Mechsner, S., Schwarz, J., Salomon, D.A. and Ebert, A.D.
Expression and function of the epidermal growth factor receptor family in peritoneal and ovarian endometriosis. submitted

S. Mechsner, J. Bartley, C. Loddenkemper, C. Beutler, **J. Herbel**, J. Schwarz and A.D. Ebert
Umbilical endometriosis, Diagnostic and therapy, in prep

S. Mechsner, J. Bartley, C. Loddenkemper, C. Beutler, **J. Herbel**, J. Schwarz and A.D. Ebert
Oxytocin receptor (OTR) and Vasopressin receptor (VPR) expression in adenomyosis uteri. In prep

Abstracts und Poster

2003

Mechsner S, Bartley J, Beutler C, **Thode J**, Halis G, Lange J und A.D. Ebert
Oxytocin-Rezeptor (OTR)-Expression in glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen und Adenomyosis uteri.
Zentralbl Gynakol (2003) 125:297 Abstract

Müller E, Bartley J, Mechsner S, Beutler C, **Thode J**, Halis G und Ebert AD
Endokrine Modulation des EGFR-Systems (HER-3 und HER-4) in Endometrioseläsionen.
Zentralbl Gynakol (2003) 125:298 Abstract

Schwarz J, Mechsner S, Bartley J, Beutler C, Halis G, Lange J, **Thode J**, und Ebert AD

Endometriose und Schmerz – nervale Innervation in vivo und in vitro.
Zentralbl Gynakol (2003) 125:302 Abstract

Mechsner S, Bartley J, Loddenkemper C, Beutler C, **Thode J** und Ebert AD
Oxytocin-Rezeptor (OTR) Expression in glatten Muskelzellen peritonealer
Endometrioseläsionen.

Jahrbuch der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (2003)
S. 392.

Bartley J, Mechsner S, Beutler C, Schwarz J, **Thode J** und Ebert AD
COX-2-Überexpression in extragenitalen Endometrioseläsionen – ein neuer
Therapieansatz?

Jahrbuch der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (2003)
S. 388.

Schwarz J, Mechsner S, Blottner D, Bartley J, Beutler C, , **Thode J** und Ebert AD
Neurotropismus und Endometriose.

Jahrbuch der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (2003)
S. 394.

Müller E, Bartley J, Mechsner S, Beutler C, **Thode J** und Ebert AD
HER-3 und HER-4-Expression in Endometrioseläsionen.

Jahrbuch der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (2003)
S. 393.

2004

Thode J., Müller E., Mechsner S., Bartley J., Halis G., Schwarz J., Ebert A.D.
Expression der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Familie in Endometriose
(EM)-Läsionen.

55. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)
(2004) Arch Gynecol Obstet 1 (270) p.96 (Poster und Abstract)

J. Schwarz, S. Mechsner, D. Blottner, J. Bartley, C. Beutler, **J. Thode**, und A.D.
Ebert

Neurotropism and Endometriosis.

In Proceedings of the 20th Annual Meeting of the European Society of Human
Reproduction & Embryology (2004) Hum Repro 19 (1) p. 82

G. Halis, A.D. Ebert, **J. Thode**, J. Schwarz, A. Arici

Östrogenabhängige Regulierung des MCP-1 und des NF- κ B bei der Endometriose

55. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)
(2004) Arch Gynecol Obstet 1 (270) p.214 (Poster und Abstract)

Schwarz J., Mechsner S., Beutler C., Bartley J., Halis G., **Thode J.**, Ebert A.D.
Neurotrophe Eigenschaften der Endometriose (EM)

55. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)
(2004) Arch Gynecol Obstet 1 (270) p.214 (Poster und Abstract)

2005

J. Schwarz, S. Mechsner, J. Bartley, **J.Thode**, A.D. Ebert
 Neurotrophic activity of endometriotic lesions
 9th World Congress on Endometriosis, Maastricht, 15 - 17 September 2005

Thode, J., Loddenkemper, C., Mechsner, S., Bartley, J., Schwarz, J., Halis, G., Ebert, A.D.
 Expression von Stammzellmarkern in peritonealen Endometrioseläsionen
 6. Deutscher Endometriose-Kongress, 28.9. - 1.10.2005 in Villach (Poster und Vortrag)

Mechsner, S., Loddenkemper, C., Bartley, J., Beutler, C., **Thode, J.**, Schwarz, J. und Ebert, A.D.
 Oxytocin Rezeptor (OTR) und Vasopressin Rezeptor (VPR) expression in Adenomyosis uteri
 6. Deutscher Endometriose-Kongress, 28.9. - 1.10.2005 in Villach (Poster und Vortrag)

Schwarz J , Mechsner S , Bartley J, **Thode J**, Ebert AD
 Untersuchung der neurotrophen Eigenschaften der Endometriose
 6. Deutscher Endometriose-Kongress, 28.9. - 1.10.2005 in Villach (Poster und Vortrag)

2006

Thode J, Mechsner S, Schwarz J, Bartley J, Beutler C, Ebert AD
 Untersuchungen zur endokrinen Regulation der epidermal growth factor receptor (EGFR) Familie im Endometriose in vitro-Modell
 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2006) Geb Fra (66) p 141, (Poster und Abstract), **ausgezeichnet mit dem 3. Posterpreis**

Mechsner S, Loddenkemper C, Beutler C, **Thode J**, Bartley J, Schwarz J, Ebert AD
 Die Rolle des Oxytocin Rezeptors (OTR) und Vassopressin Rezeptors (VPR) in der Pathogenese der Adenomyosis uteri (AM)-assoziierten Dysmenorrhoe
 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2006) Geb Fra (66) p 141 (Poster und Abstract)

West A, Mechsner S, Beutler C, **Thode J**, Bartley J, Ebert AD
 Untersuchungen zur zyklusabhängigen Oxytocin Rezeptor Expression (OTR) im Endometrium und in peritonealen Endometrioseherden
 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2006) Geb Fra (66) p 141 (Poster und Abstract)

J.Thode, S. Mechsner, G. Schoenfelder, J. Schwarz, J. Bartley, A.D. Ebert:
 Estrogen-independent regulation of the epidermal growth factor receptor family in primary cells of endometriosis
 XVIII FIGO 2006, World Congress of Gynecology and Obstetrics, Kuala Lumpur, Malaysia (Poster und Abstract)

Vorträge

2003

Mechsner S, Bartley J, Beutler C, **Thode J**, Halis G, Lange J und A.D. Ebert
Oxytocin-Rezeptor (OTR)-Expression in glatten Muskelzellen peritonealer
Endometrioseläsionen und Adenomyosis uteri

5. Deutscher Endometriose-Kongress, Westerstede, September 2003

Müller E, Bartley J, Mechsner S, Beutler C, **Thode J**, Halis G und Ebert AD
Endokrine Modulation des EGFR-Systems (HER-3 und HER-4) in
Endometrioseläsionen

5. Deutscher Endometriose-Kongress, Westerstede, September 2003

Schwarz J, Mechsner S, Bartley J, Beutler C, Halis G, Lange J, **Thode J** und Ebert
AD

Endometriose und Schmerz – nervale Innervation in vivo und in vitro

5. Deutscher Endometriose-Kongress, Westerstede, September 2003

S. Mechsner, J. Bartley, C. Beutler, C. Loddenkemper, **J. Thode**, G. Halis, J. Lange
und A.D. Ebert

Klinische Relevanz der Expression des Oxytocin-Rezeptors (OTR) in glatten
Muskelzellen peritonealer und ovarieller Endometrioseherde

XVIII. Akademische Tagung deutschsprachender Hochschullehrer in der
Gynäkologie und Geburtshilfe, Potsdam, 5. Oktober 2003

Bartley J, Mechsner S, Beutler C, **Thode J**, Loddenkemper C, Halis G und Ebert AD

Klinische Relevanz der Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in peritonealen,
ovariellen und rectovaginalen Endometrioseherden (EMH) – from bench to bedside?

XVIII. Akademische Tagung deutschsprachender Hochschullehrer in der
Gynäkologie und Geburtshilfe, Potsdam, 5. Oktober 2003

2004

Halis G und **Thode J**

Perspektiven der Endometriosebehandlung

VI. Berliner Endometriose-Symposium, Berlin, 19.11.2004

J. Schwarz, S. Mechsner, D. Blottner, J. Bartley, C. Beutler, **J. Thode** and A.D.
Ebert

Neurotropism and Endometriosis

In Proceedings of the 20th Annual Meeting of the European Society of Human
Reproduction & Embryology (2004) Hum Repro 19 (1) p. 82

2005

J. Thode, E. Müller, J. Bartley, S. Mechsner, J. Schwarz, B. Heine, G. Halis, A.D.
Ebert

Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR)-family in peritoneal, ovarian
and rectovaginal endometriosis

9th World Congress on Endometriosis, Maastricht, 15 - 17 September 2005

S. Mechsner, J. Bartley, C. Beutler, C. Loddenkemper, **J. Thode**, J. Schwarz, G.
Halis, A.D. Ebert

Oxytocin Receptor (OTR) and Vasopressin Receptor (VPR) expression in adenomyosis uteri
9th World Congress on Endometriosis, Maastricht, 15 - 17 September 2005

G. Halis, S. Taskiran, S. Mechsner, **J. Thode**, A. Ebert, A. Arici
Estrogen regulates the level of activated NF-kB differently in women with endometriosis
9th World Congress on Endometriosis, Maastricht, 15 - 17 September 2005

Thode, J., Loddenkemper, C., Mechsner, S., Bartley, J., Schwarz, J., Halis, G., Ebert, A.D.
Expression von Stammzellmarkern in peritonealen Endometrioseläsionen
6. Deutscher Endometriose-Kongress, 28.9. - 1.10.2005 in Villach (Poster und Vortrag)

Mechsner, S., Loddenkemper, C., Bartley, J., Beutler, C., **Thode, J.**, Schwarz, J. und Ebert, A.D.
Oxytocin Rezeptor (OTR) und Vasopressin Rezeptor (VPR) Expression in Adenomyosis uteri
6. Deutscher Endometriose-Kongress, 28.9. - 1.10.2005 in Villach (Poster und Vortrag)

Schwarz J , Mechsner S , Bartley J, **Thode J**, Ebert AD
Untersuchung der neurotrophen Eigenschaften der Endometriose
6. Deutscher Endometriose-Kongress, 28.9. - 1.10.2005 in Villach (Poster und Vortrag), **ausgezeichnet mit dem 1. Posterpreis**

J.Thode
(Neue) Therapieoptionen der Endometriose
VII. Berliner Endometriose-Symposium, Berlin, 27.11.2005

J. Thode
Untersuchungen zum EGFR-System in Endometriosegewebe und einem möglichen 'cross-link' zum ERS
Themen der Forschungsförderung, Gynäkologie Fortbildung, Berlin 20.12.2005

2006

J. Thode, S. Mechsner, J. Bartley, C. Beutler, J. Schwarz, B. Heine, A.D. Ebert:
Expression of epidermal growth factor receptors (HER-1 to -4) in deep infiltrating endometriosis.
The World Meeting on Gynecological Pelvic Pain and Endometriosis, Milano, 10-13.05.2006

S. Mechsner, J. Schwarz, J. Bartley, **J. Thode**, C. Loddenkemper and A. D. Ebert:
Close topographical relationship between sensory nerve fibers and peritoneal endometriotic lesions.
The World Meeting on Gynecological Pelvic Pain and Endometriosis, Milano, 10-13.05.2006

Schwarz J, Mechsner S, Bartley J, **Thode J**, Ebert AD: Interaktion zwischen Endometriose- und Nervenzellen.
56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2006)
Geb Fra (66) p 15

Erklärung

„Ich, Johanna Herbel, geb. Thode, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur Expression und endokrinen Regulation der epidermal growth factor receptor Familie in endometriotischen Läsionen“ 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