

Aus der Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Bedeutung der epithelialen  
mesenchymalen Transition und Angiogenese in der  
Pathogenese der Endometriose**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Jülicher

aus Kempen

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. A. Schneider  
                          2. Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. A. D. Ebert  
                          3. Prof. Dr. med. T. Strowitzki

**Datum der Promotion: 30.11.2012**

---

## Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Endometriose .....	1
1.1.1 Definition der Endometriose .....	1
1.1.2 Häufigkeit .....	1
1.1.3 Symptomatik.....	2
1.1.4 Mikro- und makroskopisches Bild .....	2
1.1.5 Einteilungen und Klassifikationen .....	3
1.1.6 Pathogenese .....	5
1.1.7 Diagnostik.....	7
1.1.8 Therapie .....	7
1.1.8.1 medikamentöse Therapie .....	8
1.1.8.2 operative Therapie .....	11
1.2 COX-2 und VEGF in der Angiogenese.....	12
1.2.1 Einführung in die Angiogenese.....	12
1.2.2 Cyclooxygenase-2 (COX-2).....	13
1.2.2.1 Enzymcharakterisierung .....	13
1.2.2.2 COX-2 und Neoangiogenese, Invasivität und Proliferation .....	15
1.2.2.3 COX-2 in der Endometriose .....	16
1.2.2 vascular endothelial growth factor (VEGF).....	17
1.2.2.1 VEGF-Familie .....	17
1.2.2.2 VEGF-A .....	17
1.2.2.3 VEGF-Rezeptoren .....	17
1.2.2.4 Einblick in die Regulation der VEGF-Genexpression.....	18
1.2.2.5 Wirkung von VEGF auf die Endothelzellen .....	19
1.2.2.6 VEGF und Tumorgenese .....	20
1.2.2.7 VEGF und Endometriose .....	21
1.2.3 Zusammenspiel von VEGF und COX-2 in der Angiogenese.....	22
1.3 Epitheliale mesenchymale Transition (EMT) und invasives Wachstum.....	23
1.3.1 Definition der EMT .....	23
1.3.2 Zelladhäsion und EMT.....	24
1.3.3 Zelladhäsionsmoleküle und deren Rolle in der Pathogenese der Endometriose .....	25

---

1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	26
1.5	Fragestellungen.....	28
2.	Methodik.....	29
2.1	Patientinnen .....	29
2.3	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten .....	30
2.3.1	Probengewinnung.....	30
2.3.2	Herstellung von Gewebeschnitten .....	30
2.3.3	Entparaffinierung .....	30
2.3.4	Antigen-Demaskierungsverfahren an Gewebeschnitten.....	31
2.3.5	Immunhistochemie .....	32
2.3.5.1	Cyclooxygenase-2 (COX-2) .....	32
2.3.5.2	VEGF (vascular endothel growth factor) .....	33
2.3.5.3	Twist .....	33
2.3.5.4	N-cadherin .....	33
2.3.5.5	KI-67 .....	34
2.3.5.6	E-cadherin.....	34
2.3.5.7	Snail.....	34
2.3.5.8	Slug.....	35
2.3.5.9	Beurteilung der immunhistochemischen Färbung .....	35
2.3.6	Immunfluoreszenz .....	35
2.3.6.1	VEGF und COX-2 .....	35
2.3.6.2	smooth muscle actin (SMA), von Willebrandt Faktor (vWF).....	36
2.4	Zellkultur.....	37
2.4.1	Zelllinien .....	37
2.4.2	Gewinnung und Kultivierung von primären Endometriomzellkulturen.....	37
2.4.3	Passagierung .....	37
2.5	Western Blot.....	38
2.5.1	Zellyse für Western Blot.....	38
2.5.2	Proteinbestimmung.....	38
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	39
2.5.4	Western Blot.....	39
2.6	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	40
2.6.1	Gewinnung der RNA aus Primärzellen und Patientengewebe .....	40

---

2.6.2 Reverse Transkription .....	40
2.6.3 Semiquantitative PCR .....	41
2.7 Statistische Analyse .....	43
3. Ergebnisse .....	44
3.1 Ergebnisse der Western Blot-Analyse von COX-2 .....	44
3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Angiogenese- mechanismen der Endometriose .....	45
3.2.1 Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 72) .....	45
3.2.2 VEGF-A-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 80).....	47
3.2.3 Ki-67-Expression in Endometriose (n= 67).....	50
3.2.4 Korrelation der COX-2-Expression und dem Proliferationsmarker Ki-67 ..	52
3.2.5 Korrelation der VEGF-Expression und dem Proliferationsmarker Ki-67 ...	52
3.2.6 Korrelation zwischen VEGF- und COX-2-Expression (n= 70) .....	52
3.2.7 Korrelation zwischen VEGF und COX-2 mit der Aktivität der peritonealen Herde.....	54
3.2.8 Korrelation der Expression von COX-2 und VEGF mit der Zyklusphase der Patientin .....	54
3.2.9 Korrelation der Expression von COX-2 und VEGF mit den Stadien nach rARSM-Kassifikation .....	55
3.2.10 Korrelation der Expression von COX-2 und VEGF mit der hormonellen Therapie der Patientinnen .....	57
3.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen .....	57
3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der EMT der Endometriose.....	59
3.4.1 Twist-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 27) und im Endometrium (n= 13) .....	59
3.4.2 Snail-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 23).....	60
3.4.3 Slug-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 20).....	60

---

3.4.4 N-cadherin-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 27) und im Endometrium (n= 13) .....	60
3.4.5 E-cadherin-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 25) und im Endometrium (n= 12) .....	61
3.4.6 Unterschiede in der Expression der untersuchten Faktoren zwischen Endometrium (n= 13) und Endometrioseläsionen (n= 27 ).....	62
3.4.7 Unterschiede in der Expression der untersuchten Faktoren zwischen Endometrium von Patientinnen mit (n= 7) und ohne (n= 6) Endometriose .....	64
3.4.8 Unterschiede in der Expression der untersuchten Faktoren bei peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Läsionen .....	66
3.4.9 Korrelation der Expression der untersuchten EMT-Faktoren mit der Zyklusphase .....	66
3.4.10 Korrelation der Expression der untersuchten EMT-Faktoren mit den Stadien nach der rASRM-Klassifikation.....	66
3.4.11 Korrelation der Expression der untersuchten EMT-Faktoren mit der hormonellen Behandlung der Patientinnen.....	66
3.4.12 Korrelation der getesteten Antigene untereinander .....	66
3.5 Ergebnisse der RT-PCR.....	69
3.5.1 Ergebnisse der RT-PCR von Endometrioseprimärzelllinien .....	69
3.5.2 Ergebnisse der RT-PCR von Endometriosegewebe und Endometrium ...	70
4. Diskussion .....	73
5. Zusammenfassung .....	87
6. Literaturverzeichnis .....	90
7. Anhang .....	103
8. Erklärung .....	118
9. Lebenslauf.....	119

**Abkürzungsverzeichnis:**

APAAP	=	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
ATCC	=	American Type Culture Collection
bHLH	=	basic helix-loop-helix
BSA	=	bovines Serumalbumin
CAM	=	zelluläres Adhäsionsmolekül
cDNA	=	komplementäre (,complementary') Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	=	Kohlendioxid
COX	=	Cyclooxygenase
DAPI	=	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	=	doppelt destilliertes Wasser
dest.	=	destilliert
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle Medium
dNTP	=	2'-Desoxy-Nukleosid-5'Triphosphat
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	=	epidermal growth factor
EGFR	=	epidermal growth factor receptor
EMT	=	Epitheliale mesenchymale Transition
FGF-1	=	fibroblast growth factor
FKS	=	fötales Kälberserum
FSH	=	Follikel stimulierendes Hormon
GIFT	=	gamete intrafallopian transfer
GnRH	=	Gonadotropin Releasing Hormon
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
HER	=	human epidermal growth factor receptor
HGF	=	hepatocyte growth factor
HIF	=	Hypoxie-induzierter Faktor
HSD	=	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ICSI	=	intrazytoplasmatischen Spermieninjektion
IGF	=	insulin like growth factor
IL	=	Interleukine
IUI	=	intrauterine Insemination
IVF	=	in-vitro-Fertilisation

kD	=	Kilodalton
KI-67	=	Proliferationsmarker
LH	=	Luteinisierendes Hormon
LEF/TCF	=	lymphoid enhancer binding factor/ T-cell specific factor
MAP	=	mitogen-activated protein
M-MLV	=	moloney murine leukemia virus
mRNA	=	Boten-(,messenger'-)Ribonukleinsäure
NFDM	=	nonfat dried milk
NO	=	Stickstoffoxid
NRP	=	Neuropilin
NSAID	=	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
NSAR	=	nichtsteroidaler Antirheumatika
P/S	=	Penicillin/Streptomycin
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	polymerase chain reaction
PG	=	Prostaglandine
PGHS	=	Prostaglandin H <sub>2</sub> -Synthase
PIGF	=	placental growth factor
rASRM	=	verbesserte (revised) Stadieneinteilung der American Society for Reproductive Medicine
RT	=	Raumtemperatur
RT-PCR	=	reverse transkriptase polymerase chain reaction
SMA	=	smooth muscle actin
TBS	=	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TGF	=	transforming growth factor
TNF- $\alpha$	=	tumor necrosis factor $\alpha$
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA <sub>2</sub>	=	Thromboxan A <sub>2</sub>
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
VEGFR	=	vascular endothelial growth factor receptor
vHL	=	von Hippel Lindau
VPF	=	vascular permeability factor
vWF	=	von-Willebrandt-Faktor



# 1. Einleitung

Frauen leiden vermutlich schon immer an den Folgen einer Erkrankung, die schon von *Rokitansky* im Jahr 1860 beschrieben wurde. Endometriose ist mit einer derzeit geschätzten Prävalenz von 7-15% eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen. Diese Erkrankung wird oft verkannt und unterschätzt, da Symptome wie Dysmenorrhoe und Unterbauchbeschwerden zu häufig als „normale“ Menstruationsbeschwerden beurteilt werden. Sicher ist, dass die Endometriose eine Erkrankung ist, die erhebliche soziale, persönliche und ökonomische Auswirkungen hat. Mögliche Faktoren, die zu einem geringen Interesse in den letzten Jahrzehnten an der Endometriose führten, sind unter Umständen die fehlenden pathognomischen Symptome, die unklare Pathogenese und die schwere Diagnosestellung aufgrund eines sehr variablen Ausprägungsbildes. Die Pathogenese ist noch weitestgehend unerforscht, dies nicht zuletzt begründet durch die fehlende Lobby.

Diese experimentelle Arbeit beschäftigt sich mit den Grundlagen der Entstehung und Progredienz dieser Erkrankung. Endometriose gilt zwar als benigne Krankheit, teilt aber einige Charakteristika mit malignen Prozessen. In dieser Arbeit wurde die Angiogenese, sowie das invasive Wachstumsverhalten der Endometriose untersucht.

## 1.1 Endometriose

### 1.1.1 Definition der Endometriose

Endometriose ist definiert als Vorkommen von endometrialen Stroma- und Drüsenzellen außerhalb der Gebärmutterhöhle [1]. Sie ist eine benigne chronisch-entzündliche Erkrankung mit hoher Rezidivneigung bei Frauen in der reproduktiven Lebensphase. Bei der Endometriose handelt es sich um eine hormonabhängige Erkrankung.

### 1.1.2 Häufigkeit

Die Prävalenz wird auf 7-15 % der Frauen im fertilen Alter geschätzt. In Deutschland erkranken jährlich 40.000 Frauen an Endometriose. Es liegt eine Inzidenz von 1,3-1,6 Erkrankungen pro 1000 Frauen in der reproduktiven Lebensphase vor [2].

### **1.1.3 Symptomatik**

Die Symptomatik der Erkrankung ist sowohl in der Erscheinung als auch in der Ausprägung sehr unterschiedlich. Es zeigen sich asymptomatische Verläufe bis hin zu Verläufen mit starker Beeinträchtigung der Lebensqualität.

Das Leitsymptom der Endometriose ist die Dysmenorrhoe. Blutungsstörungen wie Hypermenorrhö kommen ebenfalls häufig vor. Weitere Hauptsymptome sind chronisch und/oder zyklisch rezidivierende Unterbauchschmerzen, aber auch Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (Dyspareunie). Abhängig vom Befall der Nachbarorgane Darm und Blase kann es zu Schmerzen beim Stuhlgang (Dyschezie) und der Miktion (Dysurie) kommen. Viele Patientinnen klagen über unerfüllten Kinderwunsch. Die Fruchtbarkeit bei Endometriosepatientinnen ist reduziert; ca. 30-50 % aller Frauen mit Endometriose leiden unter Infertilität und 20-48 % aller Kinderwunschpatientinnen haben eine Endometriose [1]. Als Ursachen werden der veränderte Eitransport infolge von Tubenadhäsionen und Tubenmotilitätsstörungen, der gestörte Spermientransport durch eine Dysperistaltik des Uterus [46], die behinderte Befruchtung des Eis durch ein verändertes peritoneales Milieu [47, 48] sowie eine Implantationsstörung auf Grund von Endometriumveränderungen diskutiert.

Das Ausmaß des intraoperativen Befundes korreliert nicht immer mit der Ausprägung der Schmerzen, so kann ein leichter Befund bereits schwere Symptomatiken hervorrufen sowie eine ausgeprägte Endometriose asymptomatisch sein [3, 4]. Das Stadium der Erkrankung korreliert also nicht unbedingt mit dem Schmerz, allerdings mit dem unerfüllten Kinderwunsch.

Die häufig sehr schweren Symptome haben erhebliche Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patientinnen, insbesondere auf Partnerschaft, Sexualität, Alltags- und Berufsleben.

### **1.1.4 Mikro- und makroskopisches Bild**

Mikroskopisch weisen die Endometrioseläsionen Stroma- und Epithelzellen sowie pigmentbeladene Makrophagen (Hämosiderophagen) auf, mindestens zwei Merkmale müssen zur Diagnosestellung vorhanden sein [1]. Häufig lassen sich glatte Muskelzellen in der Umgebung der Endometrioseläsionen feststellen [5, 157].

Makroskopisch können Endometrioseherde in unterschiedliche Aktivitätsgrade eingeteilt werden:

Aufgrund ihrer starken Vaskularisation, dem entzündlichen Infiltrat sowie dem Gewebsödem erscheinen die aktiven Herde weißbläsig oder rot. Die älteren Herde erscheinen weiß-narbig bzw. schwarz und besitzen eine geringere Aktivität [6].

Es kann in sehr seltenen Fällen (ca. 1 %) zur malignen Entartung der Endometriose kommen, v.a. betroffen ist das Ovar [7, 8].

### **1.1.5 Einteilungen und Klassifikationen**

Endometrioseherde können sich an verschiedenen Lokalisationen manifestieren. Am häufigsten kommen die so genannten Schokoladen- oder Teerzysten am Ovar und die Läsionen am Peritoneum vor. Oft befinden sich diese im Douglasraum, können aber das gesamte Peritoneum bis hin zum Zwerchfell und dem Oberbauch befallen. Weitere Lokalisationen können ligamentäre Strukturen, wie das Lig. sacrouterinum, die Fossa ovarica, das Blasendach und die Ovaroberfläche sein. Es kann zum Befall der angrenzenden Organe wie Blase, Vagina und Darmwand kommen, aber auch von Lymphknoten und Narbengewebe.

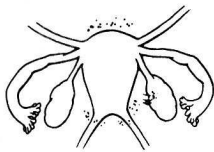
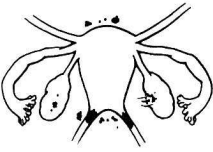
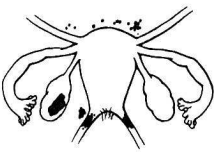
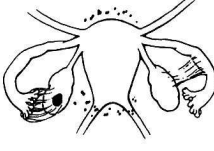
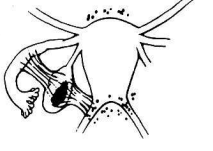
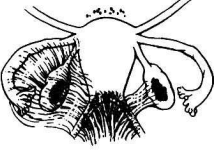
Anhand der Lokalisation der Läsionen unterscheidet man drei Formen der Endometriose. Am häufigsten ist die Endometriosis genitalis externa, bei der Endometrioseherde außerhalb des inneren Genitalorgans z. B. am Ovar oder am Peritoneum auftreten.

Bei der Endometriosis genitalis interna, auch als Adenomyosis uteri bezeichnet, treten Läsionen innerhalb des Myometriums des Uterus auf. Oft wird die Prävalenz der Adenomyosis uteri unterschätzt, da diese schwierig zu verifizieren ist.

Die Endometriosis extragenitalis beschreibt das Vorliegen von Läsionen in anderen Organen. Hier ist die rektovaginale Endometriose am häufigsten, gefolgt von der Blasenendometriose. Vereinzelt wurde Endometriose außerhalb des kleinen Beckens in Fallberichten beschrieben, z.B. in Lunge [9] und im Gehirn [10].

Klassifiziert wird die Ausbreitung der Endometriose genitalis externa durch die Stadien nach der *revidierten Version der American Society of Reproductive Medicine (rASRM)*.

Man unterscheidet den Schweregrad der Erkrankung mittels Stadien von I-IV (I= gering, II= mäßig, III= schwer, IV= ausgedehnt). Diese Klassifikation ist in Abbildung 1 (Abb.1) dargestellt. Weiterhin sollte der Aktivitätsgrad der Endometrioseherde in die Klassifikation mit aufgeführt werden [11], diese spielen aber für das Stadium keine Rolle.

Stage I (Minimal)	Stage II (Mild)	Stage III (Moderate)
		
Peritoneum Superficial Endo 1-3 2	Peritoneum Deep Endo >3cm 6	Peritoneum Deep Endo >3cm 6
R. Ovary Superficial Endo <1cm 1 Filmy Adhesions <1/3 1 <b>Total Points 4</b>	R. Ovary Superficial Endo <1cm 1 Filmy Adhesions <1/3 1 L. Ovary Superficial Endo <1cm 1 <b>Total Points 9</b>	Cul-de-Sac Partial Obliteration 4 L. Ovary Deep Endo 1-3cm 16 <b>Total Points 26</b>
Stage III (Moderate)	Stage IV (Severe)	Stage IV (Severe)
		
Peritoneum Superficial Endo >3cm 4 R. Tube Filmy Adhesions <1/3 1 R. Ovary Filmy Adhesions <1/3 1 L. Tube Dense Adhesions <1/3 16* L. Ovary Deep Endo <1cm 4 Dense Adhesions <1/3 4 <b>Total Points 30</b>	Peritoneum Superficial Endo >3cm 4 L. Ovary Deep Endo 1-3cm 32** Dense Adhesions <1/3 8** <b>Total Points 52</b>	Peritoneum Deep Endo >3cm 6 Cul-de-Sac Complete Obliteration 40 R. Ovary Deep Endo 1-3cm 16 Dense Adhesions <1/3 4 L. Tube Dense Adhesions >2/3 16 L. Ovary Deep Endo 1-3cm 16 Dense Adhesions >2/3 16 <b>Total Points 114</b>

\*Point assignment changed to 16  
\*\*Point assignment doubled

Abb. 1: rASRM-Stadieneinteilung der Endometriose (revised American Society of Reproductive Medicine) [11]

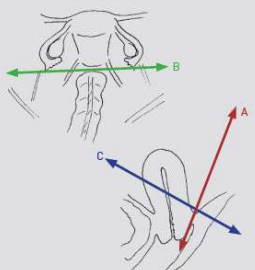
ENZIAN Score		rev ENZIAN				
		Raum-achse	A	B	C	
		Stadium	Septum rectovaginale Scheide	Ligg. Sacrouterinae Beckenwand	Rektum/Sigma	
<b>3 Raumachsen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>A Douglas - Septum rectovaginale - Scheide</li> <li>B Ligg sacrouterina - Beckenwand</li> <li>C Organüberschreitung zum Rektum</li> </ul>		1	RevE1A	RevE1B	RevE1C	
		<1 cm	<1 cm	<1 cm	<1 cm	
		2	RevE2A	RevE2B	RevE2C	
		1-3 cm	<1-3 cm	<1-3 cm	<1-3 cm	
		3	RevE3A	RevE3B	RevE3C	
		>3 cm	>3 cm	>3 cm	>3 cm	
rev ENZIAN / Extragenitale Erweiterung						
		FA / Adenomyse Uterus	FB / Blase	FU / Ureter instrinsisch	FI / Intestium Sigma, Coecum, term. Ileum	andere Lokalisationen Diaphragma,...

Abb. 2: Enzian-Klassifikation [51]

Zusätzlich zu der rASRM-Klassifikation gibt es die *Enzian*-Einteilung. In der *Enzian*-Klassifikation wird die tiefe, extraperitoneale Endometriose erfasst [52] (Abb. 2).

### 1.1.6 Pathogenese

Es gibt verschiedene Theorien zur Entstehung der Endometriose, die endgültigen Pathomechanismen sind aber noch nicht geklärt:

*J.A. Sampson* formulierte schon Anfang des 20. Jahrhunderts die Transplantationstheorie: er ging davon aus, dass vitale Endometriumzellen durch retrograde Menstruation in den Bauchraum gelangen, sich dort absiedeln, implantieren und sich zu Endometrioseläsionen entwickeln [13]. Für diese Theorie sprechen Beobachtungen bei Frauen mit obstruktiven Hindernissen in der Vagina wie z.B. ein verschlossenes Hymen. Die Menstrualblutabflussbehinderung verstärkt die retrograde Menstruation. Diese Frauen wiesen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Endometriose im Vergleich zur Normalbevölkerung auf [14]. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Entfernung des Endometriums und der Basalis ein Wiederauftreten der Läsionen verhindert werden konnte [15].

Dies bietet jedoch keine hinreichende Erklärung dafür, dass zwar bei den meisten der menstruierenden Frauen eine retrograde Menstruation als physiologisches Phänomen stattfindet, allerdings nur wenige dieser Frauen eine Endometriose ausbilden [14, 16].

*R. Meyer* formulierte die Metaplasietheorie: undifferenziertes Zölomepithel soll sich unter dem Einfluss bestimmter Umgebungsfaktoren wie Hormonen, Entzündungsmediatoren, Wachstumsfaktoren und mechanischen Reizen in endometriumähnliches Gewebe differenzieren [17]. Dies würde auch retroperitoneale und extragenitale Läsionslokalisationen erklären.

*Ph. Koninckx* geht in seiner „*Endometriotic Disease Theory*“ von einem genetisch veränderten Endometriumgewebe aus, welches aggressivere Eigenschaften wie invasive und angiogenetische Potenz sowie ein verändertes Ansprechen auf Hormone besitzt. Durch retrograde Menstruation gelangt dieses in ein verändertes Milieu im Bauchraum; durch geringere Präsenz von natürlichen Killerzellen, veränderte Zytokin-, Hormon- und Wachstumsfaktorkonzentrationen wird eine Implantation von endometrialem Gewebe gefördert [18].

Im aktuellen *Archimeta-Konzept* von *Gerhard Leyendecker* wird davon ausgegangen, dass sich durch eine Hyperperistaltik des Uterus Zellen aus den tiefen Schichten des Endometriums, der Basalis, aus ihrem Verband lösen, in den Bauchraum sowie in die Uteruswand befördert werden [19] und sich dort implantieren können. Diese Zellen besitzen Stammzellcharakter und können sich in Stroma-, Epithel- und Muskelzellen differenzieren [20, 21]. Diese beobachtete Hyperperistaltik der Uterus führt zu

Mikroläsionen zwischen Endometrium und Myometrium. Bei der Wundheilung kommt es zur verstärkten Östrogenproduktion, die wiederum verantwortlich ist für eine gesteigerte Uterusperistaltik („Tissue Injury and Repair Concept (TIAR)“) [50].

In der Peritonealflüssigkeit bei Endometriosepatientinnen zeigt sich eine veränderte humorale und zelluläre Immunabwehr, die eine Implantation der Endometriumfragmente im Bauchraum begünstigt [158]. Auch die Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF aus Endometriosezellen und assoziierten Makrophagen bilden Grundlagen für den Fortbestand und die Progredienz der Endometriose. VEGF ist in peritonealer Flüssigkeit bei Patientinnen mit Endometriose erhöht [106]. Die Potenz der Endometriose zur Regulation der Angiogenese ist entscheidend für die Pathogenese der Erkrankung. In malignen Tumoren zeigen sich Hinweise, dass die Cyclooxygenase-2, ein Schrittmacherenzym der Prostaglandinsynthese, die Angiogenese mitreguliert. Dies soll in dieser Studie auch für die Endometriose untersucht werden. Neben der angiogenetischen Potenz zeigt die Endometriose auch invasives und metastastisches Potential. So konnten Lymphgefäßen in tief infiltrierender rektovaginaler Endometriose und Endometrioseläsionen und -zellen in pelvinen Sentinel-Lymphknoten nachgewiesen werden [147, 159]. Das Lymphgefäßsystem bietet damit einen möglichen Verbreitungsweg für die Endometriosezellen und erklärt damit auch das Auftreten von Endometriose außerhalb der Bauchhöhle. In der Tumorgenese zeigen sich Hinweise, dass die epitheliale mesenchymale Transition (EMT), ein Mechanismus aus der Embryogenese, für die Invasivität und Progredienz maligner Tumore mit verantwortlich ist. Dieser Vorgang ermöglicht, dass Zellen sich aus ihrem Verband lösen und invasiv wachsen sowie Metastasen über Lymph- bzw. Blutgefäße bilden können. Der Mechanismus der Invasivität bei Endometriose ist noch weitestgehend unerforscht, die Induktion der EMT ist möglicherweise ein Vorgang, welche auch in der Endometriose das invasive Verhalten erklärt und in dieser Studie untersucht werden soll. Keiner dieser Erklärungsansätze konnte eigenständig als gültig bewiesen werden, so dass es sich möglicherweise bei der Genese der Endometriose um ein Zusammenspiel dieser Faktoren handelt.

### **1.1.7 Diagnostik**

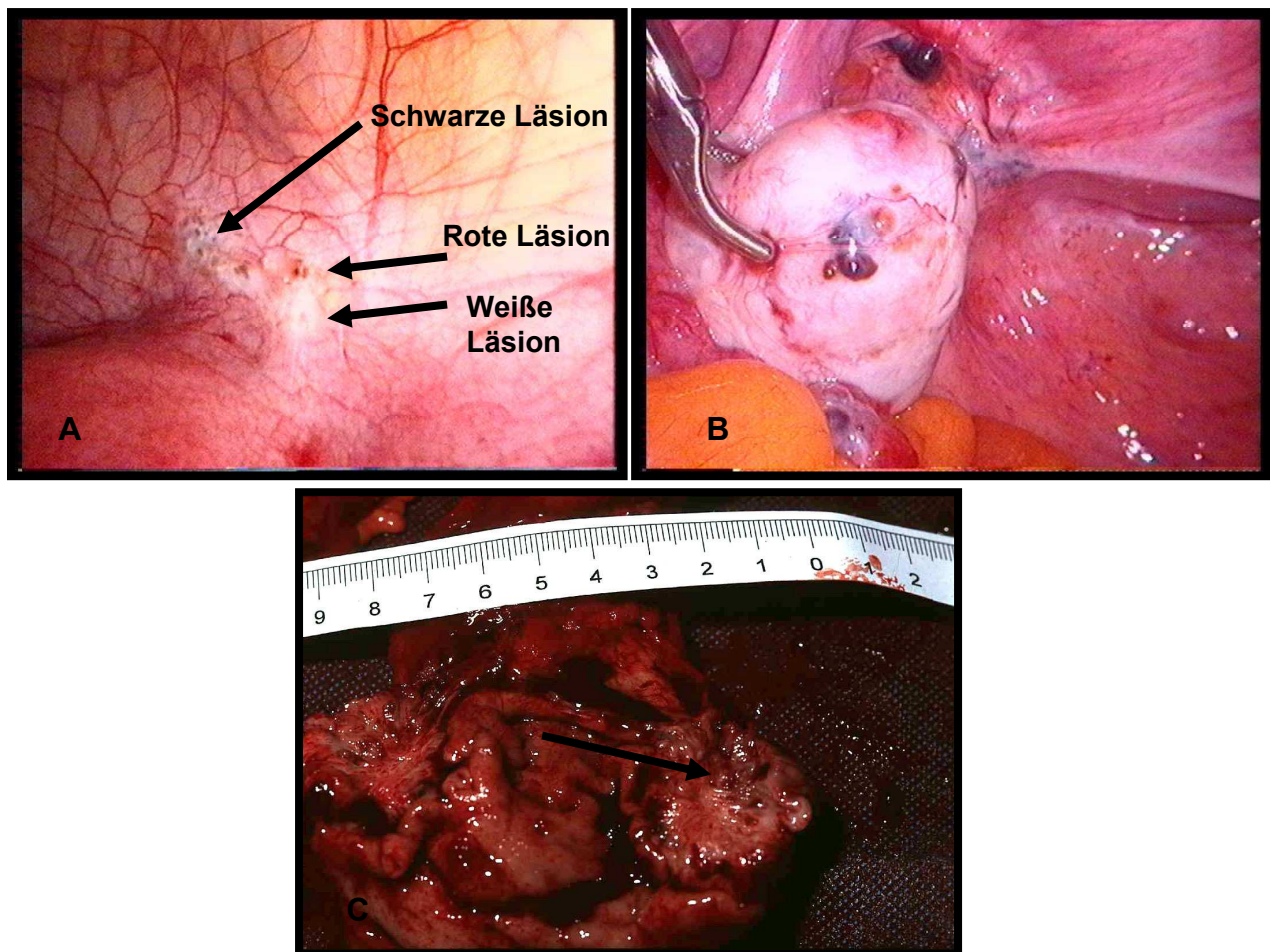
Eine sorgfältige gynäkologische Anamnese sowie die Schmerzanamnese und die nachfolgende gynäkologische Untersuchung, welche den rektovaginalen Tastbefund mit einbezieht, bilden die Basis der Diagnostik. Allerdings ist die Untersuchung für die Diagnosestellung der Endometriose nicht beweisend. Weiterhin sollte eine vaginale Sonographie erfolgen, in der ovarielle Zysten und Adenomyose dargestellt werden können. Goldstandard zur Diagnosesicherung bildet die Laparoskopie mit anschließender histologischen Befundung.

Bei Verdacht auf eine rektovaginale Endometriose sollte eine rektale Endosonographie zur Diagnostik und Therapieplanung der rektovaginalen Endometriose durchgeführt werden. Hierdurch kann die Infiltrationstiefe der Endometriose in die Darmwand sowie die Pararektalräume beurteilt werden. Zusätzlich kann die Rektosigmoidoskopie bei rektovaginaler Endometriose mit Infiltration bis zur Rektummukosa als diagnostisches Mittel genutzt werden. Als Bildgebung kann des Weiteren bei spezieller Fragestellung (Adenomyosis uteri) die Magnetresonanztomografie (MRT) des kleinen Beckens zur Diagnostik herangezogen werden.

Es gibt bis heute keine sicheren laborchemischen Untersuchungsmethoden, um eine Endometriose zu diagnostizieren. Der Tumormarker CA-125 ist in fortgeschrittenen Stadien der Endometriose im Blut erhöht. Er ist allerdings nicht spezifisch für Endometriose und ist in Stadium I und II der Endometriose oft im Normbereich, so dass dieser nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt [22, 23].

### **1.1.8 Therapie**

Die Endometriose kann chirurgisch und medikamentös behandelt werden. Bei der Behandlung des Schmerzes ist sowohl die medikamentöse als auch die operative Therapie wirksam [24-31]. Die Fertilität kann jedoch nur durch die operative Entfernung verbessert werden [22, 31, 32]. Die Kombination aus medikamentösen und operativen Therapie kann eine Steigerung des Effekts bezüglich der Schmerzlinderung bewirken [33, 34]. Dennoch sind die Rezidivraten der Endometriose Stadium III-IV mit 80 % innerhalb der folgenden 3-5 Jahre sehr hoch [6].



**Abb. 3:** laparoskopisches Bild einer peritonealen Endometriose mit schwarzer, roter und weißer Läsion (A) und einer ovariellen Endometriosezyste (B), sowie ein Sigmaresektat mit infiltrativer rektovaginaler Endometriose (C) [1]

#### 1.1.8.1 medikamentöse Therapie

Die Tatsache, dass Endometriose eine hormonabhängige Erkrankung ist, wurde schon früh therapeutisch genutzt. Zu den derzeit verwendeten hormonellen Therapeutika zählen GnRH-Agonisten, die kombinierte Pille und Gestagenmonopräparate. Sie alle führen direkt oder indirekt zu einem Östrogenentzug und damit zum „Austrocknen“ der Endometrioseherde. Entscheidend für die Wahl der Therapie sind die Schwere der Erkrankung, der Kontrazeptionswunsch und das Nebenwirkungsprofil der Medikamente. Zur Schmerztherapie werden nichtsteroidale Antiphlogistika (z.B. Diclofenac, Ibuprofen, Paracetamol) oder auch schwache Opioiden (z.B. Tilidin, Tramadol) sowie unterstützend auch Neuroleptika und trizyklische Antidepressiva bei Endometriosepatientinnen angewendet [1].



Auf Grund der Erkenntnis, dass Entwicklung und Fortbestand einer Endometriose nur unter dem Einfluss von Östrogen stattfindet, ist die Senkung des Östrogenspiegels grundlegendes Prinzip aller eingesetzten Substanzen.

Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRH-Analoga) sind zurzeit die effektivste medikamentöse Therapie der Endometriose [1]. Ihre Wirksamkeit wurde in mehreren Studien nachgewiesen [24, 26, 33]. GnRH-Analoga unterbrechen die hypothalamisch-hypophysär-gonale Achse. Sie führen durch die Dauerstimulation zu einer Entleerung der Hypophyse von LH und FSH. Dies führt zwar initial kurzfristig zu einer Erhöhung der Östrogenkonzentration, doch durch die andauernde Einwirkung von GnRH-Analoga wird aber letztendlich die Anzahl der GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse herunterreguliert, was eine verminderte Sekretion von FSH und LH zur Folge hat. Daraus resultiert ein hypogonadotroper Hypogonadismus, die Östrogenkonzentration entspricht der einer menopausalen Frau. Dies erklärt auch die Nebenwirkungen dieser Therapieform: Hitzewallungen, Amenorrhoe, Haut- und Schleimhauttrockenheit mit Elastizitätsverlust, Libidoverlust, Schlafstörungen, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Depressionen. Eine schwerwiegende unerwünschte Wirkung ist bei längerer Therapiedauer die abnehmende Knochendichte und infolge dessen das steigende Osteoporoserisiko. Deshalb sollte die Therapie mit GnRH-Analoga stets von einer add-back Hormonersatztherapie in niedriger Dosierung begleitet werden. Dies kann die oben genannten Nebenwirkungen reduzieren ohne die therapeutische Wirksamkeit zu vermindern [35-37].

Durch den Östrogenentzug werden das Endometrium und die Endometrioseherde atrophisch. Es kommt zur Amenorrhoe und zu einer deutlichen Regression der Endometrioseläsionen [38]. Daneben scheint es möglicherweise noch andere Wirkungsmechanismen zu geben – so konnte zum Beispiel ein Effekt auf Plasminogenaktivatoren und Matrix-Metalloproteinasen in der Peritonealflüssigkeit nachgewiesen werden [39].

Die mit kombinierten oralen Kontrazeptiva zugeführten Steroide (Gestagen + Östrogen) hemmen über eine negative Rückkopplung die Freisetzung von FSH und LH aus der Hypophyse und hemmen dadurch die Östrogenproduktion in den Ovarien. Die Pille kann zyklisch oder im non-stop-Modus eingenommen werden. Möglicherweise profitieren Endometriosepatientinnen von einer non-stop-Einnahme der Pille. Durch die

Amenorrhoe vermeidet man blutungsabhängige Beschwerden und reduziert evtl. sogar auch die Rezidivrate.

Unter den oralen Gestagenmonopräparaten ist Desogestrel (z.B. Cerazette®) wegen seiner guten ovariellen Suppression das Medikament der Wahl. Seit einiger Zeit ist Dienogest (Visanne®) als Monopräparat zur Endometriosetherapie in Deutschland zugelassen, die ovarielle Suppression scheint jedoch schlechter als die von Desogestrel. Auch Gestagen-Depotpräparate sind für die Therapie der Endometriose geeignet. Die Levonorgestrel-haltige Spirale Mirena® findet Anwendung in der Therapie, v.a. bei der Behandlung der Dysmenorrhoe durch Adenomyosis uteri. Problem der Gestagenmonopräparate sind die relativ häufig auftretenden Durchbruchblutungen, die nicht selten zum Abbruch der Therapie führen.

Zu den neuen Therapieansätzen zählen die GnRH-Antagonisten, Antigestagene, Aromatase-Inhibitoren und COX-2-Inhibitoren, welche sich zum Teil bereits in der klinischen Erprobungsphase befinden.

GnRH-Antagonisten besetzen kompetitiv die GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse und führen zur sofortigen Suppression der gonadotropen Zellen. Dies führt zur Hemmung der Östrogenproduktion in den Ovarien. In Tierversuche zeigten die GnRH-Antagonisten gute Wirksamkeit gegen Endometriose, die Wirkung scheint schneller und verstärkt einzutreten als bei den GnRH-Analoga [38, 40]. Für die Dauertherapie sind diese Medikamente aber noch zu teuer.

Das Antigestagen Mifepristone (RU 486), ein selektiver Progesteron Rezeptor Modulator (SPRM), ist ein Anti-Progesteron und Anti-Glykokortikoid. Es hemmt den Eisprung und verhindert die Nidation durch Veränderung des Endometriums. Es konnten in keiner Studie eine Regression der Endometrioseherde gezeigt werden, allerdings stellte sich eine Schmerzreduktion unter der Therapie dar [38, 41].

Das Enzym Aromatase wandelt die frei zirkulierenden C19-Steroide in Östrogen um.

Die Stromazellen der Endometriose sind im Gegensatz zum normalen Endometrium in der Lage Aromatase zu bilden, was lokal zur erhöhten Östrogenproduktion führen kann, die damit das Fortschreiten der Endometriose fördern. Aromatase-Inhibitoren hemmen diesen Vorgang [42-44], indem sie die lokale Östrogenproduktion unterbinden. Allerdings sind diese nur in Kombination mit zentral hemmenden Hormontherapien anzuwenden.

Die COX-2 ist ein mögliches Ziel neuer Behandlungsstrategien mit spezifischen COX-2-Hemmern [45]. COX-2 ist in Endometriose überexprimiert. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Expression von COX-2 in Endometriosezellen unter Einfluss von Östrogenen. COX-2 fördert über Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese die Bildung von Aromatase. Aromatase führt wie oben bereits erwähnt zu einer Erhöhung von Östrogen und damit zur Aufrechterhaltung der Endometriose.

### **1.1.8.2 operative Therapie**

Ziel der operativen Therapie ist die komplette Entfernung der sichtbaren Endometrioseherde und Adhäsionen sowie die Wiederherstellung der Anatomie des kleinen Beckens. Dabei können die Herde reseziert oder destruiert werden. Die Ovarienendometriose in Form des Endometrioms erfordert die Extirpation der Zyste. Von der Qualität der Primäroperation hängt der weitere Krankheitsverlauf bzw. Therapieerfolg ab [1]. Eine absolute Operationsindikation besteht in seltenen Fällen von sekundären Organschäden z.B. bei Darm- und Harnleiterstenosen. Da die Endometriose eine gutartige Erkrankung ist, sollte die operative Radikalität und der therapeutische Nutzen sinnvoll abgewogen werden. Bei den oft jungen Patientinnen, bei denen die Familienplanung noch nicht abgeschlossen ist, wird ein Organerhalt angestrebt. Meist können die operativen Ziele mit der Laparoskopie erreicht werden, der Erfolg hängt maßgeblich von dem Können sowie der Erfahrung des Operateurs ab. Therapie der Wahl bei Endometriosepatientinnen mit unerfülltem Kinderwunsch ist die chirurgische Entfernung der Endometriose. Prospektive randomisierte Studien konnten zeigen, dass bei Endometriose rASRM-Stadium I und II die operative Entfernung zu einer Verbesserung der Fertilität führt [49]. In fortgeschritteneren Stadien sprechen Beobachtungsstudien ebenso für eine Verbesserung der Fruchtbarkeit durch die operative Entfernung.

Als letzte Therapieoption der endometriosebedingten Schmerzen steht die Hysterektomie ohne Adnexentfernung, die jedoch nur im Falle der beendeten Familienplanung in Betracht gezogen werden kann. Diese bietet v.a. eine Möglichkeit zur Behandlung der Adenomyosis uteri [1]. Alternativ besteht die Möglichkeit der Laparatomie, die allerdings mit einer verlängerten Krankenhausverweildauer und einer erhöhten Morbidität der Patientinnen einhergeht.

Zentral für die Diagnosesicherung ist die Probenentnahme und histologische Begutachtung.

## 1.2 COX-2 und VEGF in der Angiogenese

Für die Entstehung und Progredienz der Endometriose erscheint die Angiogenese entscheidend. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen VEGF, einem wichtigen Wachstumsfaktor für Gefäße, und COX-2, einem Enzym der Prostaglandinsynthese, untersucht. Hinweise zum Zusammenspiel zeigen sich in der Untersuchung von Tumoren. Im Folgenden werden diese beiden Faktoren genauer dargestellt.

### 1.2.1 Einführung in die Angiogenese

Die Ausbildung eines Gefäßsystems ist Voraussetzung für Wachstum und den Erhalt eines Gewebs- und Organsystems.

Bei der Neovaskularisation unterscheidet man zwei unterschiedliche Begriffe:

Zum einen beschreibt die Vaskulogenese die Entwicklung des Gefäßsystems während der Embryogenese aus endothelialen Vorstufen, sogenannten Angioblasten [83]. Die Angiogenese hingegen beschreibt den Prozess der Neubildung von Gefäßästen bei bereits vorbestehenden Gefäßen. Der Prozess der Angiogenese ist gut untersucht und wird in mehrere Schritte unterteilt: Zunächst kommt es zur Degeneration der Basalmembran der Endothelzellen, im weiteren Verlauf erfolgt die Proliferation und Aussprossung der Endothelzellen in Richtung eines angiogenen Stimulus. Die Degradation der Extrazellulärmatrix erfolgt durch die Expression von Proteasen, so dass es zur Einsprossung in das umliegende Gewebe kommt und sich neue Gefäßlumina bilden. Dieser Prozess wird durch das komplexe Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Zellmatrix- sowie Adhäsionsmolekülen gesteuert [84]. Die Angiogenese ist Voraussetzung für physiologische Prozesse wie Wachstum, Wundheilung und Organregeneration und ebenfalls Bestandteil im reproduktiven System während der Ovulation, Menstruation und der Entwicklung der Plazenta [85, 86].

Die deregulierte Angiogenese ist nachgewiesener Bestandteil der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, Psoriasis, diabetischer Retinopathie und v.a. auch beteiligt am Wachstum und Progression von Tumoren [86]. Die Angiogenese wird reguliert durch proangiogenetische und antiangiogenetische Faktoren, welche die physiologische Balance zwischen Inhibition und Stimulation des Gefäßwachstums herstellen. Einer der wichtigsten proangiogenetischen Faktoren ist

der vascular endothelial growth factor, VEGF. Andere Faktoren, welche ebenfalls neue Gefäße generieren können, sind z. B. fibroblast growth factor FGF-1 und -2, hepatocyte growth factor HGF, Angiopoitin 1 und 2, transforming growth factor TGF- $\alpha$  und - $\beta$ , IL-8 und Prostaglandine [87]. Auch das Enzym COX-2 ist durch die Synthese von Prostaglandinen an der Induktion der VEGF- Expression und damit an der Angiogenese in Tumorgewebe beteiligt [110-112].

## **1.2.2 Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

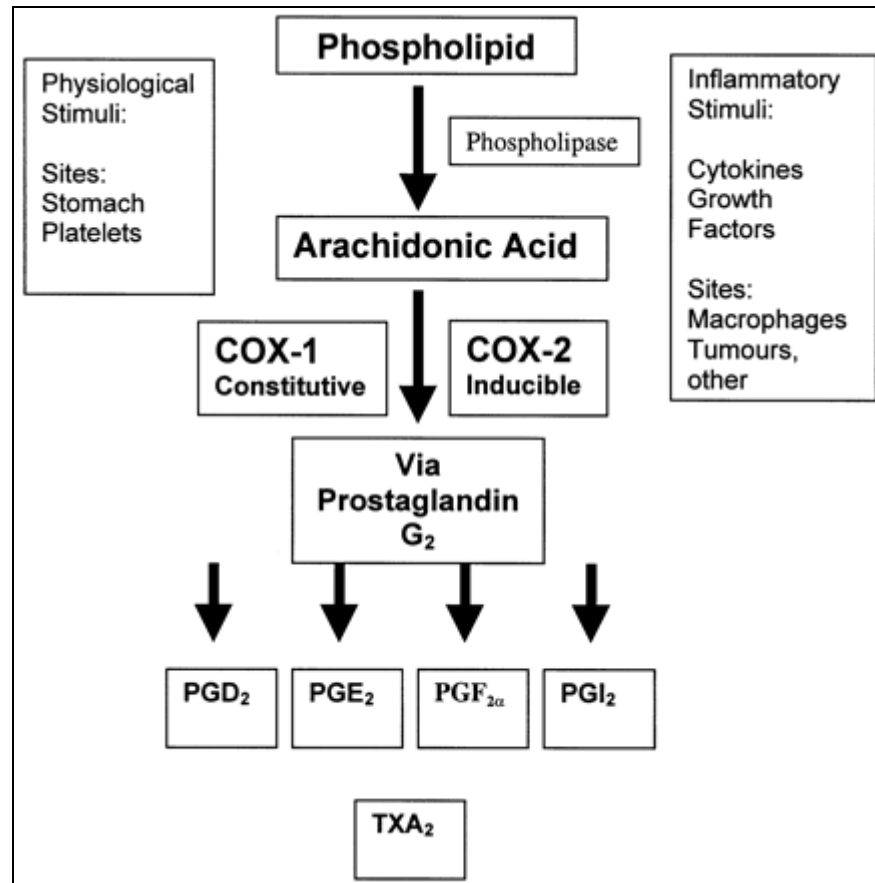
### **1.2.2.1 Enzymcharakterisierung**

Cyclooxygenase (COX) oder Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase (PGHS) ist ein Schrittmacherenzym der PG-Synthese. Es katalysiert die ersten beiden Schritte in der Biosynthese der Prostaglandine aus der Arachidonsäure. Die Cyclooxygenase (COX) konvertiert als intrazelluläre Prostaglandinsynthase in der Biosynthese der Prostaglandine Arachidonsäure in Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). Mittels spezifischer Isomerase werden aus dem instabilen PGG<sub>2</sub> über PGH<sub>2</sub> zellspezifisch Eicosanoide gebildet: die Prostaglandine PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>, Prostazyklin PGI<sub>2</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) [53].

Es existieren zwei gut charakterisierte Isoformen der Cyclooxygenase: Cyclooxygenase-1 (COX-1) [54] und Cyclooxygenase-2 (COX-2) [55]. Inzwischen wurden weitere Isoformen, COX-3 und partielle Proteine der COX-1, entdeckt, welche vor allem zerebral und im Herzen vorkommen, deren genaue Funktion jedoch noch nicht bekannt ist [66]. COX-1 und COX-2 sind in unterschiedlichen Genen auf verschiedenen Chromosomen kodiert. Das COX-1-Gen ist auf Chromosom 9 lokalisiert und das Gen für COX-2 befindet sich auf Chromosom 1 [67, 68].

COX-1 wird in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert [53]. Sie spielt als „housekeeping enzym“ eine wichtige Rolle in der Vermittlung von physiologischen Funktionen über die Bildung von zellspezifischen Prostaglandinen. Sie sind beteiligt an der Durchblutung und Funktion der Niere [56], der Kontraktion der glatten Muskeln des Gastrointestinaltraktes und des Uterus, der Zytoprotektion des Magens und der Blutgerinnung [57, 58]. Ebenfalls spielen sie eine Rolle in der Entstehung von Schmerz und Fieber.

COX-2 hingegen wird in entzündlichen und neoplastischen Geweben durch Onkogene, inflammatorische Zytokine (IL-1, EGF, TNF- $\alpha$ ), Wachstumsfaktoren und Mitogene induziert [59].



**Abb. 4:** Synthese der Prostaglandine [69]

COX: Cyclooxygenase

PG: Prostaglandine

TXA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>

In wenigen Organen wird die COX-2 konstitutiv exprimiert, so z. B. in Niere, Gehirn und Rückenmark. Ein Ausdruck für die physiologische Bedeutung von COX-2 ist die Tatsache, dass COX-2-knock-out-Mäuse schwere Nephropathien entwickeln und nicht lebensfähig sind [60]. Weiterhin ist COX-2 an der Entwicklung des Thymus, der T-Zelldifferenzierung [63], dem neonatalen Verschluss des Ductus arteriosus Botalli [64] und der Regulation des Renin-Angiotensin-Systems und der glomerulären Hämodynamik [65] beteiligt.

Ebenfalls scheinen Fertilität, Ovulation, Implantation und Aufbau der Plazenta von einer funktionsfähigen Cyclooxygenase-2 abhängig zu sein [56, 61, 62]. COX-2 wird konstitutiv in Endometrium, im Tubenepithel und in den Granulosazellen des Ovars exprimiert. Im Endometrium konnte ein zyklisches Muster der COX-2-Expression mit einer Hochregulation im sekretorischen Endometrium nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass COX-2 in der Regulation der Implantation und Ovulation eine Rolle spielt.

#### **1.2.2.2 COX-2 und Neoangiogenese, Invasivität und Proliferation**

COX-2-Expression konnte bereits in vielen Karzinomen, unter anderem im Mamma- und Kolonkarzinom, nachgewiesen werden [70, 71]. Bei Mammakarzinomen ließ sich eine Korrelation zwischen der Expression von COX-2 und der Überexpression von HER2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor) feststellen [70].

Die Konsequenz einer COX-2-Überexpression ist die erhöhte Produktion von Prostaglandinen und in vielen Tumoren konnte eine hohe Konzentration von Prostaglandinen (PG) festgestellt werden. Prostaglandine können als Mitogene wirken. So stimulieren PGE<sub>1</sub> und PGE<sub>2</sub> z.B. die Proliferation von Epithelzellen der Mamma. Jedoch haben sie auch antiproliferativen Effekt auf das Immunsystem: so inhibiert PGE<sub>2</sub> die T- und B-Zellproliferation und Zytokinsynthese. Diese prostaglandinvermittelte Immunsuppression unterstützt wiederum indirekt die Tumorgenese, indem das Immunsystem das Wachstum des Tumors nicht limitiert.

COX-2-Überexpression ist assoziiert mit Entzündung und verschiedenen Zellfunktionsänderungen in Karzinomen wie Apoptoseinhibition, Proliferation, erhöhte metastatische Potenz und Neoangiogenese in z.B. Mammakarzinomen [69]. Tumore, welche COX-2 exprimieren, zeigen klinisch eine stärkere Wachstums- und Angiogenesepotenz, als Tumoren ohne COX-2-Überexpression [72].

Daraus ergibt sich eine stärkere Tumoraggressivität und einer schlechteren Prognose für die Patienten [73].

Die Aktivität der Cyclooxygenase kann mittels nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR) bzw. NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) wie Aspirin, Ibuprofen, Diclofenac und Indometacin, welche häufig zur Therapie von Schmerzen und Entzündungsprozessen eingesetzt werden, inhibiert werden. Diese Substanzen sind nichtselektive Inhibitoren der COX-1 und -2 und können zu chemisch-toxischen Gastritiden führen. Dieses Nebenwirkungsprofil gab Anlass zur weiteren Forschung

nach selektiven COX-2-Inhibitoren wie Celecoxib, welche eine wesentlich geringere ulzerogene Potenz als die klassischen NSAIDs, jedoch ähnlich gute tumorpräventive Wirkung aufweisen [74, 75]. Es wurden einige Medikamente dieser Klasse vom Markt genommen oder Anwendungsbeschränkungen ergänzt, da es in mehreren großen Studien mit selektiven COX-2-Inhibitoren zu schweren kardiovaskulären Komplikationen kam [76, 77].

Passend zu den o.g. Beobachtungen zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Inzidenz von Kolonkarzinomen und der regelmäßigen Einnahme von NSAIDs [70]. Das konnte mittlerweile auch für selektive COX-2-Inhibitoren nachgewiesen werden. Bei Mammakarzinomen zeigt sich eine ähnliche Korrelation. Ebenfalls ließ sich bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) unter Einnahme von NSAIDs und selektiven COX-2-Inhibitoren ein Rückgang der Größe, sowie der Anzahl der intestinalen Polypen feststellen [70]. Dies alles deutet auf einen Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression und der Tumorgenese hin.

### **1.2.2.3 COX-2 in der Endometriose**

Prostaglandine, welche mit Hilfe der Cyclooxygenase lokal produziert werden und in Entzündungs- und Schmerzprozesse involviert sind, sind wichtig in der Pathogenese der Endometriose.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  werden in Endometrioseherden verstärkt gebildet.  $\text{PGE}_2$  induziert direkt Schmerz, wohingegen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  über Vasokonstriktion und Uteruskontraktionen das Symptom der Dysmenorrhoe erklärt [78]. Es lassen sich höhere Mengen von Prostaglandinen in der Douglasflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose nachweisen [79]. Die COX bietet einen Angriffspunkt für nichtselektive COX-Inhibitoren, welche den Unterbauchschmerz bei Endometriose mildern können.

*Ota et al.* konnte erstmals eine Überexpression von COX-2 in ovarieller Endometriose im Vergleich mit eutopen Endometrium beobachten [80]. Dies konnte mittels RT-PCR bestätigt werden [81]. *Fagotti et al.* konnte eine Überexpression von COX-2 in ovariellen Endometrioseherden im Vergleich mit rektovaginalen und peritonealen Herden darstellen [82].

Ebenfalls zeigte sich eine erhöhte Expression von COX-2 im Endometrium von Endometriosepatientinnen, zusätzlich jedoch auch eine verminderte Apoptoserate [80].  $\text{PGE}_2$ , welches durch die Expression von COX-2 vermehrt gebildet wird, induziert die Bildung von Aromatase [43]. Diese ist in Endometriose hoch exprimiert und zentraler Baustein der lokalen Östrogenproduktion in den Endometrioseläsionen. Somit fördert



COX-2 die Entwicklung und den Fortbestand der Endometriose und bildet damit nicht nur einen Ansatz für Schmerztherapeutika, sondern eventuell sogar für eine kausalen Rezidivprophylaxe und Progressionshemmung der Endometriose. Aber wie genau COX-2 die Zellfunktion in Endometriose ändert ist noch nicht geklärt. Möglicherweise ist COX-2 ähnlich wie in Tumoren an der Fähigkeit der Zellen zum invasiven Wachstum, zur Proliferation und Angiogenese beteiligt.

### **1.2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

#### **1.2.3.1 VEGF-Familie**

Die VEGF-Familie besitzt sechs Glycoproteinmitglieder, welche entscheidend mit an der Angiogenese und Lymphangiogenese beteiligt sind: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und die Plazentawachstumsfaktoren PlGF-1 und -2 [88]. VEGF-A wurde am intensivsten untersucht und besitzt außerordentliche Wichtigkeit für die Angiogenese. VEGF-A wurde erstmal 1983 von *Senger et al.* als gefäßpermeabilitätsregulierender Faktor identifiziert und unter dem Namen vascular permeability factor (VPF) publiziert [89]. 1989 konnte ein endothelialer Wachstumsfaktor durch *Ferrera et al.* isoliert werden und erhielt dann den jetzt gebräuchlichen Namen VEGF [90]. Molekulargenetische Untersuchungen zeigten, dass VEGF und VPF das gleiche Protein darstellen.

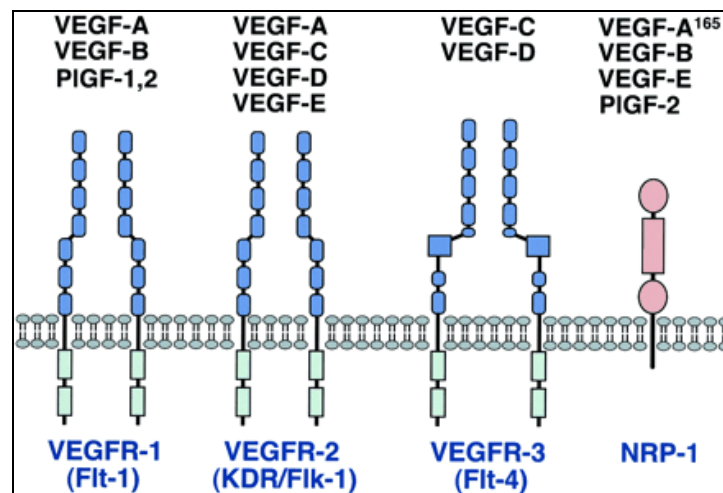
#### **1.2.3.2 VEGF-A**

VEGF-A ist ein heparinbindendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kD [90]. VEGF-A lässt sich auf Grund unterschiedlicher Splicingvorgänge in verschiedene Isoformen unterteilen, von denen VEGF-A<sub>165</sub> die Hauptisoform darstellt. Diese Isoformen unterscheiden sich in der molekularen Größe und in ihrer Fähigkeit an Heparan-Sulfat-Proteoglykanen auf der Zelloberfläche zu binden [91]. VEGF-A wird auf dem kleinen Arm des Chromosom 6 kodiert [92].

#### **1.2.3.3 VEGF-Rezeptoren**

VEGF-A vermittelt seinen angiogenetischen Effekt über verschiedene Rezeptoren. Zwei spezifische Rezeptorsysteme wurden auf der Oberfläche der Endothelzellen identifiziert und als Tyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 charakterisiert [93]. Ebenfalls gibt es einen VEGF-Rezeptor-3, der primär mit der Lymphangiogenese assoziiert ist [94]. Die Mitglieder der VEGF-Familie haben unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen Rezeptoren; so binden die VEGF-A-Isoformen an VEGFR-1 und -2,

während PlGF-1 und -2, sowie VEGF-B nur spezifisch an den Rezeptor VEGFR-1 binden. VEGF<sub>165</sub> interagiert weiterhin mit selektiven Corezeptoren, Neuropilin-1 und -2 (NRP) [88], welche von den Endothelzellen exprimiert werden (Abb.4).



**Abb. 5:** Bindungsspezifität der verschiedenen VEGF-Familienmitglieder und deren Rezeptoren [92]

#### 1.2.3.4 Einblick in die Regulation der VEGF-Genexpression

Verschiedene Mechanismen über die die VEGF-Genexpression reguliert wird sind bekannt. Hypoxie reguliert die Expression von VEGF durch Optimierung der mRNA-Transkription und -Stabilität. Dies wird vermittelt durch den durch Hypoxie induzierten Transkriptionsfaktor HIF-1. Ebenfalls fördert Gewebshypoxie die Hochregulation der Rezeptoren VEGFR-1 und -2 [92].

Auch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine sind an der Expression des VEGF-Gen beteiligt. Dazu zählen EGF (epidermal growth factor), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor), Keratinozytenwachstumsfaktor, IGF-1 und Zytokine wie IL-1 und IL-6 [95].

Auch einige Prostaglandine sind beteiligt an der Angiogenese in Tumoren durch die Hochregulation von VEGF [96]. So zeigte sich eine Assoziation der an der Entstehung der Prostaglandine beteiligten Cyclooxygenase-2-Expression und der Progression sowie Angiogenese bei verschiedenen malignen Tumoren wie Kolon- [72] und Mammakarzinomen [97].

Einige Onkogene wie src und ras und Tumorsuppressorgene wie p53, p73 sowie das von Hippel Lindau (vHL)-Gen sind in die Regulation von VEGF involviert. So verhindern

p53 und p73 die Transkription von VEGF und nehmen dadurch eine regulatorische Funktion in der Angiogenese ein. Das Tumorsuppressorgen vHL fördert die Proteolyse bestimmter Faktoren, unter Anderem auch von HIF-1, so zeigt sich bei Fehlen des vHL-Gen bei klarzelligem Nierenkarzinomen, dass es trotz normooxygeniertem Zustand des Gewebes zu einer Hochregulation von HIF-1 und damit zu einer Expressionsverstärkung von VEGF kommt [92].

Eine hohe VEGF-Expression zeigt sich gehäuft in verschiedenen endokrinen Organen (Leydigzellen, Nebennierenrinde, Corpus luteum) oder Organen, die unter hormoneller Regulation stehen (Ovarien, Uterus). So konnte gezeigt werden, dass die VEGF-Expression und -Konzentration im Blut positiv mit der Östrogenrezeptorpositivität bei Mammakarzinomen korreliert [92].

#### **1.2.3.5 Wirkung von VEGF auf die Endothelzellen**

Die Wirkung von VEGF auf die Endothelzellen zeigt sich in folgenden Punkten:

##### *Permeabilität der Gefäße*

Wie oben erwähnt wurde VEGF, noch bezeichnet als VPF (vascular permeability factor), im Zusammenhang mit seiner Potenz der Permeabilitätssteigerung von Gefäßen entdeckt. VEGF ist der potenteste bekannte Induktor vaskulärer Permeabilität und seine Potenz übersteigt um ein Vielfaches die von Histamin [92].

##### *Aktivierung von Endothelzellen*

Die Wirkung von VEGF zeigt sich in der Veränderung der Zellmorphologie und Zytoskelettstruktur, sowie in der Stimulation der Migration und des Wachstums der Endothelzellen. Weiterhin vermittelt VEGF eine Vasodilatation über Stickstoffoxid (NO) und Prostaglandine. Dies konnte nach Injektion von VEGF in Ratten gezeigt werden: es kam zu Tachykardien, Hypotension und zu einer verminderten Auswurfleistung des Herzen [88].

##### *Proliferation*

VEGF wirkt über die Stimulation von VEGF-2-Rezeptoren proliferationsfördernd auf die Endothelzellen [93]. VEGF stellt damit ein hochspezifisches Mitogen der Endothelzellen dar.

### *Hemmung der Apoptose*

In unterschiedlichen Endothelzellen in vivo und in vitro konnte gezeigt werden, dass VEGF die Apoptose durch die Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen wie z.B. bcl-2 hemmt. Bei Fehlen von VEGF zeigte sich im embryonalen Mausmodell eine exzessive Apoptose in den retinalen Gefäßen, exogen zugeführtes VEGF hingegen schützte die Gefäße in der Embryoretina vor Apoptose [93].

### *Invasion und Migration*

Der Abbau der Basalmembran ist Voraussetzung für die endotheliale Zellmigration und Invasion und ein wichtiger früher Schritt in der Angiogeneseinduktion. VEGF induziert einige Enzyme und Proteine, die wichtig sind zur Invasion und Migration der Endothelzellen. Dazu zählen die Matrixmetalloproteinasen und Plasminogenaktivatoren, welche zu einer Degeneration der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran führen, sodass die Endothelzellen in das umliegende Gewebe einsprossen und sich zu neuen Gefäßen formieren können [84, 93].

### **1.2.3.6. VEGF und Tumorgenese**

Die Angiogenese ist Voraussetzung für die Tumorzellproliferation und -invasion sowie die Metastasierung. Sie sichert die Ernährung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie den Abtransport von Abfallprodukten. Viele Tumoren exprimieren daher Angiogenesefaktoren. Zum einen kommt es in der Peripherie des Tumors zu einer erhöhten Hypoxie-unabhängigen VEGF-Expression durch aktivierte Onkogene, die Teil der ras/MAP-Kinase-Signalkette sind und durch die Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie p53. Es können zusätzlich Hormone und Wachstumsfaktoren beteiligt sein. Im Tumor selbst entstehen durch das stetige Wachstum hypoxische Regionen, in denen hohe VEGF-A-Mengen nahe der nekrotischen Areale exprimiert werden [98]. Die VEGF-A-Expression korreliert mit einer schlechten Prognose verschiedener maligner Erkrankungen, so unter anderem bei Mamma-, Kolon-, Ovar- und Zervixkarzinomen. Die Expression von VEGF-A-mRNA steht im Zusammenhang mit der Dichte der Gefäße in einigen Tumoren, z.B. in Zervix- und Mammakarzinomen [92]. Auch Tumormetastasen exprimieren VEGF und zeigen sogar oft eine höhere Expression als der Primärtumor [92, 99]. Ebenfalls lassen sich erhöhte Serum-VEGF-Spiegel bei Patienten in fortgeschrittenen, metastasierten Tumorstadien feststellen. Dies kann allerdings nicht als Screeningmethode herangezogen werden, da die VEGF-

Konzentration ebenfalls vom Gerinnungssystem abhängig ist und damit die Festlegung auf Normwerte erschwert wird [92].

Das alles zeigt, dass die Menge der von dem Tumor exprimierten VEGF-A im Zusammenhang mit dem klinischen Outcome steht. Derzeit ist eine Quantifizierung von VEGF in Tumoren noch keine Routine und es ist unsicher, ob eine solche klinisch wertvoll und kosteneffektiv die Entwicklung und Prognose der Tumorerkrankung individuell voraussagen kann [92].

Das Verständnis von VEGF-A als Schlüsselregulator der Angiogenese ist von besonderem Interesse gerade in Hinblick auf das Potential für die Therapie in der Onkologie. Es verwundert nicht, dass viele der antiangiogenetischen Behandlungen präklinisch und klinisch ihren Fokus auf die Inhibition der VEGF-Kaskade legen. Verschiedene Anti-VEGF-Strategien wurden untersucht: neutralisierende Antikörper gegen VEGF oder VEGF-Rezeptoren, Thyrosin-Kinase-Inhibitoren oder auch lösliche VEGFR/VEGFR-Hybride [100, 101]. Weiterhin kann die Inhibition von verschiedenen Regulatoren der VEGF-Expression und Produktion wie z. B. EGFR, HER-2, COX-2 oder HIF-1 $\alpha$  als Strategie zur indirekten VEGF-Regulation und damit zur Antiangiogenese herangezogen werden [93].

Bei Inhibition der Signalübertragung durch VEGF konnte die Tumorangio-genese sowie das Wachstum des Tumors gestoppt werden [100], somit konnte gezeigt werden, dass VEGF sowie die Rezeptoren vielversprechende Ansatzpunkte für eine antiangiogenetische Therapie und damit für die Therapie von malignen Erkrankungen liefern. Die Antiangiogenese ist eine neue Alternative und Zusatz zur konventionellen Krebstherapie [102]. Bereits für die Krebstherapie zugelassen ist der Angiogeneseinhibitor Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>).

#### **1.2.3.7 VEGF und Endometriose**

Die Angiogenese ist in die Pathogenese der Endometriose involviert. Die Etablierung eines versorgenden neuen Gefäßnetzes ist für das Überleben der Endometriosezellen entscheidend. Jedes proliferative Gewebe ist jenseits einer Größe von 0,15-0,25 mm auf die Neubildung von Gefäßen angewiesen [103]. 1997 postulierten *Nisolle und Donnez* ein Modell der Endometriosehistogenese, welches auf der Transplantationstheorie basiert. Die in die Peritonealhöhle gelangten Endometriumfragmente exprimieren erhöht VEGF-A bei Frauen mit Endometriose, dies sorgt für eine vermehrte Vaskularisation der anwachsenden Endometriumfragmente

[104]. Es kommt zusätzlich zu einer Aktivierung der Makrophagen, die ihrerseits Angiogenesefaktoren sezernieren [105]. Ebenfalls kommt es zu einer erhöhten Sekretion von Matrixmetalloproteinasen, welche die Invasivität der Endometriose erleichtern und eine Voraussetzung für die Neoangiogenese darstellen [84]. Bei Endometriosepatientinnen weist das Douglassekret ein erhöhtes angiogenetisches Potential auf. Insbesondere in der Proliferationsphase zeigten sich erhöhte VEGF-Spiegel in der Peritonealflüssigkeit [106]. *Donnez et al.* stellte eine erhöhte VEGF-Expression im eutropen Endometrium bei Endometriosepatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen fest [107].

#### **1.2.3.8 Zusammenspiel von VEGF-A und COX-2 in der Angiogenese**

Es gibt Hinweise aus der Tumorforschung, dass COX-2 die Angiogenese mitreguliert. In menschlichen Endothelzellen wird die Expression des COX-2-Gens u.a. durch Hypoxie reguliert [108, 109], welche ebenfalls VEGF induziert [98]. Das Expressionsmuster von VEGF und COX-2 stellte sich in Experimenten sehr ähnlich dar. Bei COX-2-knock-out-Mäusen zeigte sich im Kolonkarzinom eine verminderte Expression von VEGF-mRNA und eine verminderte Gefäßdichte [110]. Prostaglandine können die VEGF-Expression regulieren. Dabei steigern sie die Expression von IL-6, welches die Expression von VEGF hochreguliert. PGE<sub>2</sub> ist direkt mit der Expression und Regulation von VEGF assoziiert [111]. Prostacyclin ist Schlüsselregulator der VEGF induzierten Gefäßpermeabilität [112]. Dies deutet alles auf einen wichtigen Zusammenhang zwischen der COX-2-Aktivität und VEGF in der Tumorangiogenesestimulation hin [110].

## 1.3 Epitheliale mesenchymale Transition (EMT) und invasives Wachstum

Endometriose kann invasiv und destruierend wachsen, diese Fähigkeit teilt sie mit malignen Zellen. Die EMT konnte als Mechanismus für die Invasivität und Metastasierung von Karzinomzellen nachgewiesen werden, möglicherweise spielt die EMT auch in Endometriosezellen eine Rolle und bietet Erklärung für das Wachstumsverhalten. Im Folgenden wird die EMT dargestellt.

### 1.3.1 Definition der EMT

Die epitheliale mesenchymale Transition spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und der Metastasierung sowie dem invasiven Wachstum von Primärtumoren [113]. Die EMT ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre Polarität und den Zell-Zell-Kontakt verlieren, es kommt zu starken Veränderungen des Zytoskeletts [114]. Gleichzeitig werden mesenchymale Komponenten exprimiert, die es den Zellen möglich machen, sich aus ihrem Zellverband zu lösen, invasiv zu wachsen („invasion“), in den Kreislauf zu gelangen („intravasation“) und sich an anderen Orten anzusiedeln („extravasation“), dort zu proliferieren und Metastasen zu bilden („metastatic growth“) [115, 116]. Es kommt zu einer morphologischen Umgestaltung der Zellen, sie bekommen mesenchymalen Charakter und exprimieren vermehrt N-cadherin, Fibronectin, smooth muscle actin (SMA) und Vimentin. Epitheliale Zellmarker wie E-cadherin,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Catenin werden hingegen herunterreguliert [113].

Der Verlust der Expression des Adhäsionsmoleküls E-cadherin war einer der ersten und charakteristischen Veränderungen, die bei der EMT beschrieben wurden. E-cadherin ist verantwortlich für die Formation der Epithelien im Embryo, für die epitheliale Zellhomöostase und ist ein zentraler Faktor für die stabile Zell-Zell-Adhäsion. Dieser Verlust geht mit einer Erhöhung der Tumorinvasivität in vitro sowie der Entstehung von Karzinomen aus Adenomen im Tiermodell einher [114]. Die Expression korreliert invers mit dem Tumorstadium.

Snail, Slug und Twist sind Transkriptionsfaktoren, die einen repressiven Effekt auf die Expression von E-cadherin haben und damit maßgeblich an der Induktion der EMT beteiligt sind. Sie binden an E-box-Elemente im E-cadherin-Promoter und unterdrücken die Transkription des E-cadherin-Gens. Snail, ein 'zinc-finger' transkriptionaler Repressor, wurde als erster Transkriptionsfaktor, welcher an die E-box bindet,

identifiziert. Twist, ein Mitglied der `basic helix-loop-helix` (bHLH)-Transkriptionsfaktorfamilie, konnte bereits in mehreren Karzinomen nachgewiesen werden, u.a. im Endometriumkarzinom [117]. Hier korrelierte eine starke Expression von Twist mit einer schlechten Prognose für die Patientinnen. Die Arbeitsgruppe um Prof. Weinberg konnte Twist ebenfalls in invasiv-lobulären Mammakarzinomen nachweisen und mittels Suppression von Twist im Tierversuch einen Rückgang der Metastasierung in die Lunge darstellen [116]. Dies macht noch einmal deutlich, welchen Stellenwert Twist und die anderen Transkriptionsfaktoren Snail und Slug möglicherweise in der Induktion der EMT und damit bei der invasiven und metastatischen Potenz von Karzinomen haben, welche ausschlaggebend für die Prognose ist.

### **1.3.2 Zelladhäsion und EMT**

Die Familie der zellulären Adhäsionsmolekül (CAM) wird in 4 Hauptgruppen unterteilt: Cadherine, Selektine, Mitglieder der Immunglobulinfamilie und Integrine. Bei den Cadherinen lassen sich E-cadherin, P-cadherin und N-cadherin von einander unterscheiden [118]. Cadherine sind  $Ca^{2+}$ -abhängige, transmembrane Proteine, welche zwischen Nachbarzellen adhärenente Verbindungen herstellen [119]. E-cadherin ist das wichtigste epitheliale Cadherin und verantwortlich für die stabile Verbindung zwischen Zellen, es zählt zu den Typ-1-Cadherinen: Es stellt Interaktionen zwischen Zellen mittels Adhäsionsbindungen zwischen einem oder mehreren Immunglobulindomänen in ihrer extrazellulären Region her und verbinden die Aktinfilamente des Zytoskeletts indirekt über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma der Zellen. Die Adhäsionsverbindungen zwischen Zellen besteht also aus einem transmembranen Protein, E-cadherin, intrazellulären Aktinfilament-bindenden Proteinen, die Catenine, und Aktinfilamenten [120].

Die EMT zeigt sich durch eine reduzierte Expression von E-cadherin und einer gleichzeitigen erhöhten Expression von N-cadherin. N-cadherin stellt ein schwaches interzelluläres Adhäsionsmolekül dar, welches gehäuft in Karzinomen hochreguliert wird [114]. Der Switch von E-cadherin zu N-cadherin bedeutet folglich einen Verlust von starken zugunsten von schwachen Zell-Zell-Verbindungen. N-cadherin wird normalerweise in nervalen Gewebe und Myokard exprimiert und funktioniert dort als Adhäsionsmolekül. N-cadherin-Expression in epithelialen Zellen kann unabhängig von der Expression von E-cadherin die EMT einleiten und stimuliert die Zellmigration. Die



aberante Expression von N-cadherin in verschiedenen Karzinomen wie dem Mammakarzinom geht mit einer erhöhten Invasivität, metastatischen Potenz und damit schlechteren Prognose einher [121]. Twist induziert in einigen Karzinomen die Expression von N-cadherin [122].

### **1.3.3 Zelladhäsionsmoleküle und deren Rolle in der Pathogenese der Endometriose**

*Gaetje et al.* (1997) demonstrierte in einer Studie, dass E-cadherin in Endometrium bei Frauen mit Endometriose herunterreguliert ist, sowie einen Verlust von E-cadherin in den Endometrioseherden [123]. Ebenfalls konnte in dieser Studie in vitro die Invasivität der Endometriosezellen in einem Kollagen-Gel-Invasions-Assay und deren Vergleichbarkeit mit Karzinomzellen darstellen. Bei diesen benignen epithelialen Zellen fehlte E-cadherin, welches als Suppressor der Invasion in Karzinomen agiert [124]. Viele Studien konnten zuvor zeigen, dass die metastatische Potenz von Karzinomzellen mit der Abwesenheit, Mutation oder Dysfunktion des Adhäsionsmoleküls E-cadherin einhergeht. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in einer weiteren Studie bestätigt [125]. Weiterhin ließ sich eine Reduktion des gesamten Adhäsionskomplexes (E-cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin) in Endometrioseläsionen nachweisen [126]. *Fujimoto et al.* konnten zeigen, dass die mRNA-Expression von E-cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin in Endometriomen im Vergleich zu normalem Endometrium reduziert ist [127].

Hingegen konnte in anderen Studien keine Suppression der Expression von E-cadherin in peritonealen Endometrioseherden gezeigt werden [128, 129].

In Epithelzellen der Adenomyosis uteri konnte eine reduzierte E-cadherin-Expression sowie eine verstärkte Expression des mesenchymalen Markers Vimentin im Vergleich zu eutopen Endometrium nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Beteiligung der EMT in der Adenomyosis uteri hin. Es zeigte sich eine negative Korrelation der E-cadherin-Expression mit der gemessenen  $17\beta$ -Östradiol (E2)-Konzentration im Serum bei Adenomyosis-Patientinnen [160].

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Endometriose ist eine benigne Erkrankung, teilt jedoch einige Charakteristika mit malignen Tumoren, wie ein potentiell invasives Wachstum und eine metastatische Potenz. Voraussetzung für das Wachstum von Endometrioseherden ist - wie bei Tumoren - die Angiogenese. In verschiedenen soliden humanen Tumoren konnte eine COX-2-Überexpression mit einer Apoptosehemmung, einer erhöhten proliferativen Aktivität und metastatischen Potenz sowie Neoangiogenese assoziiert werden [69]. Die Ergebnisse aus der Tumorforschung lassen vermuten, dass auch in der Endometriose COX-2 ein wichtiger Regulator für die Angiogenese ist. Interessanterweise konnte eine Hochregulation des VEGF-A durch COX-2-abhängige Prostaglandine in verschiedenen Zellen, u.a. auch in Endothelzellen nachgewiesen werden. Aber auch eine umgekehrte COX-2-Induktion durch VEGF wurde in Endothelzellen nachgewiesen, die über Protein-Tyrosin-Kinasen vermittelt zu sein scheint [130].

Diese interessante gegenseitige Hochregulation von VEGF-A und COX-2 in Tumoren könnte möglicherweise auch in der Angiogenese in Endometrioseherden von Bedeutung sein.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der COX-2 in Endometriosegewebe und deren mögliche Bedeutung für die Angiogenese in Endometrioseherden.

Der Zusammenhang von COX-2-Expression und Angiogenese wurde bis jetzt in den verschiedenen Formen der Endometriose noch nicht untersucht. Deshalb soll in dieser Studie die Korrelation der COX-2-Expression mit der Expression von VEGF-A näher betrachtet werden, um zu sehen, ob COX-2 eine angiogenetische Funktion in der Endometriose übernimmt. Dies wurde mittels Immunhistochemie an peritonealen, rektovaginalen und ovariellen Herden der Endometriose untersucht. In den peritonealen Läsionen wurde zwischen so genannten „aktiven“ rötlichen und „inaktiven“ schwarzen bis weißlichen Herden unterschieden. In den aktiven Herden lässt sich eine höhere Gefäßdichte nachweisen als in inaktiven Herden. Passend dazu konnte in aktiven Herden ein höherer Anteil an unausgereiften Gefäßen mittels CD34 und  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) nachgewiesen werden [131]. Dies spricht für eine größere angiogenetische Aktivität in den aktiven peritonealen Herden im Vergleich zu den inaktiven peritonealen Herden. Die COX-2-Expression soll mit VEGF-A korreliert werden unter der Annahme, dass eine gesteigerte COX-2-Expression in peritonealen aktiven Herden mit hoher Gefäßdichte im Gegensatz zu inaktiven Herden

nachzuweisen ist. In unsere Untersuchung wurden ebenfalls das Stadium, die Therapie sowie die Zyklusphase mit einbezogen. Zur genaueren Darstellung und Beurteilung der Gefäße in der Umgebung der Endometrioseherde wurden exemplarisch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen auf smooth muscle actin (SMA) und von-Willebrandt-Faktor (vWF) angefertigt. vWF wird von Endothelzellen gebildet und ist an dem Prozess der Blutstillung beteiligt. Er dient als Marker zur Identifizierung von Endothelzellen. SMA hingegen ist ein Marker für Myofibroblasten, die nur in reifen Gefäßen vorkommen. Bei der Neoangiogenese ließen sich dann unreife Gefäße, d.h. ohne bereits bestehenden glatten Muskelzellschicht, angezeigt durch SMA-Expression, nachweisen.

Wie oben erwähnt teilt die Endometriose weitere Merkmale mit malignen Vorgängen: die Invasivität und metastatische Potenz. Die EMT beschreibt einen Prozess, indem polarisierte Epithelzellen sich zu motilen mesenchymalen Zellen entwickeln. Dies ist eine Voraussetzung für invasives Wachstum und Metastasierung. Es konnte bereits in mehreren malignen Tumoren die Beteiligung der EMT an der Invasivität und Metastasierung nachgewiesen werden, dies soll nun in der Endometriose untersucht werden. Der Nachweis der an der EMT beteiligten Faktoren wie die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug sowie die veränderte Expression von den Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin würde eine mögliche Erklärung für die Adhäsion der durch retrograde Menstruation in die Bauchhöhle gelangenden Endometriumfragmente an das Peritoneum, die Invasivität und die metastatische Potenz der Endometriose bieten. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen sowie RT-PCRs zum Nachweis der Faktoren in Endometrioseherden angefertigt. Weiterhin wurden als Kontrollgruppe Endometriumproben sowohl von Endometriosepatientinnen, als auch von Patientinnen ohne Endometriose, die auf Grund eines Uterus myomatosus therapiert wurden, auf die EMT-Faktoren mittels Immunhistochemie und RT-PCR untersucht. Die Faktoren wurden miteinander korreliert, in der Vermutung, dass die Transkriptionsfaktoren in der Endometriose ähnlich wie bei malignen Prozessen exprimiert werden und zu einer reduzierte Expression von E-cadherin sowie einer erhöhten Expression von dem mesenchymalen Marker N-cadherin führen. Weiterhin soll ebenfalls das Stadium, die Therapie sowie die Zyklusphase mit einbezogen werden.

## 1.5 Fragestellungen

1. Wird COX-2 in peritonealer, rektovaginaler und ovarieller Endometriose exprimiert?
2. Wird VEGF-A in peritonealer, rektovaginaler und ovarieller Endometriose exprimiert?
3. Korreliert die Expression von VEGF-A und COX-2 in Endometriose miteinander und bietet damit einen Hinweis auf den Einfluss von COX-2 auf die Angiogenese?
4. Steht die Expression von VEGF-A bzw. COX-2 im Zusammenhang mit den erhobenen klinischen Parametern: Stadium der Erkrankung, hormonellen Therapie und Zyklusphase?
5. Welche proliferative Aktivität ermittelt anhand der Expression von Ki-67 zeigt die Endometriose?
6. Korreliert die Expression von VEGF-A bzw. COX-2 mit der Proliferationsrate der Endometriosezellen dargestellt durch KI-67-Anfärbung ?
7. Korreliert die Expression von VEGF-A bzw. COX-2 mit dem Aktivitätsgrad der Endometriose?
8. Zeigen sich neugebildete Gefäße in der Umgebung der Endometrioseherde mit erhöhter COX-2-Expression?
9. Lassen sich die EMT-Faktoren Twist, Snail, Slug, E- und N-cadherin in der Endometriose nachweisen und bietet der Nachweis der Beteiligung der EMT eine mögliche Erklärung für das invasive Wachstum und die metastatische Potenz der Endometriose?
10. Stehen diese EMT-Faktoren in der Endometriose miteinander in Zusammenhang?
11. Lassen sich die EMT-Faktoren Twist, E- und N-cadherin in Endometrium nachweisen?
12. Zeigen sich Unterschiede der Expression der EMT-Faktoren in Endometriose und Endometrium?
13. Wie unterscheidet sich die Expression der EMT-Faktoren im Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose?
14. Zeigen sich Korrelationen zwischen den Faktoren der EMT und den erhobenen klinischen Parametern: Stadium, hormonelle Therapie und Zyklusphase?

## 2. Methodik

### 2.1 Patientinnen

Die Patientinnen wurden aufgrund einer bestehenden Symptomatik wie Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Dyschezie oder Infertilität in der Klinik für Gynäkologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin laparaskopiert oder laparotomiert. Alle Patientinnen waren prämenopausal. Die Zyklusphase wurde durch Korrelation des angegebenen letzten Menstruationsdatums sowie der histologischen Begutachtung des entnommenen Endometriums ermittelt. Die Phasen wurden eingeteilt in eine menstruelle (1.-4.Tag), proliferatorische (5.-14. Tag) und sekretorische (14.-31. Tag) Zyklusphase. Die Stadieneinteilung der Endometriose erfolgte mittels der Klassifikation der *American Society of Reproductive Medicine* (rASRM). Die Angaben zu klinischen Daten sind in Tabellen im Anhang (Anhang 1-5) zusammengefasst. Die Endometriumproben wurden durch Kürettagen bzw. Hysterektomien gewonnen, diese Proben stammen sowohl von Patientinnen mit Endometriose, als auch von Patientinnen, die auf Grund eines Uterus myomatosus in der Klinik für Gynäkologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin therapiert wurden.

Für die immunhistochemische Untersuchung zur Angiogenese wurden 82 Proben von 82 Patientinnen eingeschlossen, dabei handelt es sich um 40 peritoneale, 22 ovarielle und 20 rektovaginale Endometrioseläsionen. Bei 47 Proben haben die Patientinnen keine hormonelle Therapie erhalten, 30 hingegen wurden hormonell behandelt; bei 18 Proben nahmen die Patientinnen orale kombinierte Kontrazeptive ein, bei 7 Proben Gestagenmonopräparate und bei 5 Proben GnRH-Analoga.

Zur Immunhistochemie zur EMT wurden 40 Proben von 40 Patientinnen einbezogen; 9 peritoneale, 9 ovarielle, 9 rektovaginale Endometrioseproben, sowie 7 Endometriumproben von Frauen mit Endometriose und 6 Endometriumproben von Frauen ohne Endometriose. Dabei lag bei 24 Proben keine hormonelle Therapie der Patientinnen vor, bei 16 Proben lag eine hormonelle Behandlung vor (GnRH-Analoga: n=1, orale kombinierte Kontrazeptiva/Gestagen: n=15).

Zur Untersuchung der EMT-Faktoren mit RT-PCR wurden 15 Endometrioseproben von 14 Patientinnen verwendet; 3 peritoneale, 6 ovarielle, 5 rektovaginale, sowie 1 Adenomyosis-Gewebeprobe. 8 Patientinnen erhielten keine hormonelle Behandlung, 5

Patientinnen nahmen hormonelle Medikamente ein (GnRH-Analoga: n=1, orale kombinierte Kontrazeptiva/Gestagen: n=1, Gestagenmonopräparate: n= 2, Aromataseinhibitoren: n=1).

Zur Untersuchung der EMT-Faktoren in Endometrium mittels RT-PCR wurden 7 Proben von 7 Patientinnen ohne hormonelle Therapie verwendet.

Für die Western Blot-Analyse wurden Primärzellen von 2 ovariellen, 4 rektovaginalen und 1 peritonealen Endometrioseläsion verwendet, alle Proben wurden während der proliferativen Zyklusphase entnommen.

## **2.3 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten**

### **2.3.1 Probengewinnung**

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden peritoneale Endometrioseläsionen, Endometriosezysten des Ovars und rektovaginale Endometrioseherde sowie Endometriumproben einbezogen, in 4 %iger Formalinlösung für 12 Stunden fixiert und in Paraffin eingebettet. Die weitere Untersuchung der Gewebeproben wurde von der Ethikkommission der Charité vorab genehmigt und unter folgender Nummer registriert: EA4/026/06. Die Patientinnen waren mit der Untersuchung der Proben einverstanden.

### **2.3.2 Herstellung von Gewebeschnitten**

Für die Untersuchungen zur Lokalisation von Antigenen im Endometriosegewebe wurden Paraffinschnitte verwendet. Das Gewebe wurde dazu in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom HM 400R (MICROM International GmbH, Walldorf) 2-5 µm dicke Stufenschnitte angefertigt und auf Objektträger SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht werden. Diese Schnitte wurden über Nacht bei 37° C getrocknet und dann bei Bedarf mehrere Wochen bei 4 ° C gelagert oder sofort für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendet.

### **2.3.3 Entparaffinierung**

*COX-2, VEGF, Twist, N-cadherin:*

Nach vollständigem Trocknen und Koagulation des Eiweißes im Trockenschrank (Ehret, Emmendingen) bei 60°C für 120 Minuten wurden die Paraffinschnitte zum Herauslösen

des Paraffins 2 mal 5 Minuten in Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland) gestellt. Danach wurden sie jeweils 10 Minuten in Aceton (J.T. Baker, Deventer, Holland), in Aceton-Tris Puffer Gemisch (1:1) und schließlich in Tris-Puffer rehydriert (Tab. 1).

Komponente	Inkubationsgänge/-dauer
Xylol	2x5min
Aceton	1x10min
Tris-Aceton	1x10min
Tris	1x10min

**Tab. 1:** Entparaffinierung

*E-cadherin, Snail, Slug:*

Die getrockneten Paraffinschnitte wurden entparaffiniert mit Xylol und in absteigender Alkoholreihe und Aqua dest. rehydriert (siehe Tab. 2).

Komponente	Inkubationsgänge/-dauer
Xylol	3x5min
Absoluter Alkohol	2x7min
96 % Alkohol	1x5min
70 % Alkohol	1x5min
Aqua dest.	-

**Tab. 2:** Entparaffinierung durch absteigende Alkoholreihe

### 2.3.4 Antigen-Demaskierungsverfahren an Gewebeschnitten

Zur Antigen-Demaskierung wurde eine Vorbehandlung der Schnitte im Dampfgerar durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurden die Schnitte auf den Objektträgern SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) in 0,1 M Citratpuffer, pH 6,0 gestellt und für 40 Minuten gekocht. Für die Anfärbung von Twist und N-Cadherin wurden die Schnitte in „Target retrieval solution“, pH 9.0 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) gekocht. Für die Anfärbung von E-Cadherin, Snail und Slug wurden die Schnitte in 0,01 % EDTA-Lösung, pH 8,0, für 5 min bei 800 W dann für 6 min bei 200 W in der Mikrowelle gekocht. Danach wurden die Gewebeschnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur im Citratpuffer, bzw. in „Target retrieval solution“, bzw. in 0,01 % EDTA-

Lösung belassen, bevor dann mit der immunhistochemischen oder der Immunfluoreszenzfärbung fortgefahren werden konnte.

### **2.3.5 Immunhistochemie**

Das Prinzip der Immunhistologie beruht auf der Anfärbung der als Antigen agierenden Strukturen durch Kopplung mit Antikörper-Farbkomplexen. Die Anfärbung wird mikroskopisch beurteilt und als Korrelat zur Expression der untersuchten Faktoren gewertet.

#### **2.3.5.1 Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

Endogenes Biotin wurde mittels einer Inkubation mit Avidin und Biotin (Avidin-Biotin-Blocking-System: DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) geblockt und anschließend wurden die Schnitte mit TBS gewaschen. Weiterhin wurden die Gewebeschnitte mit fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin) für 30 Minuten vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Das überschüssige FKS wurde abgetropft und der primäre Antikörper, ein monoklonaler Maus-anti-COX-2-Antikörper (Cayman Chemical, USA), wurde in einer Verdünnung von 1:500 in „Dako® Antibody Diluent with Background Reducing Agent“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Spülen der Schnitte mit TBS wurde der sekundäre biotinylierte Kanninchen-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:400 für 40 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgebracht. Nach Spülen mit TBS wurden die Schnitte mit Streptavidin-AP-Konjugate (1:400) für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit TBS wurde die Antigenbindung mit dem Fuchsin Substrate-Chromogen System (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) visualisiert. Abschließend wurde mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 30 Sekunden gegengefärbt und die Schnitte in Kaisers Glyceringelantine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Bei den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch TBS ersetzt. Als Positivkontrolle dienten Gewebeschnitte von menstruiendem Endometrium. Die Auswertung der Färbung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern mit einem



Axiophot Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) vorgenommen und mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert.

#### **2.3.5.2 VEGF (vascular endothel growth factor)**

Die Behandlung der Schnitte gleicht der immunhistochemischen Färbung von COX-2. Als primäre Antikörper wurde rabbit-anti-VEGF (Neo Markers, England) in einer Verdünnung von 1:100 in „Dako® Antibody Diluent with Background Reducing Agent,“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) auf die Paraffinschnitte aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Maus-anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland), 1:400 für 40 Minuten, verwendet. Als Positivkontrolle wurde ein Hämangiom bzw. ein Kardiakarzinom verwendet.

#### **2.3.5.3 Twist**

Die Behandlung der Schnitte gleicht der immunhistochemischen Färbung von COX-2. In einer Verdünnung von 1:500 in „Dako® Antibody Diluent with Background Reducing Agent“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper Kaninchen-anti-Twist (Santa Cruz Biotechnology) über Nacht bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Maus-anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland), 1:400 für 40 Minuten, verwendet. Als Positivkontrolle wurde Endometriumkarzinomgewebe verwendet.

#### **2.3.5.4 N-cadherin**

Die Behandlung der Schnitte gleicht der immunhistochemischen Färbung von COX-2. Der Primärantikörper Ziege-anti-N-cadherin (Santa Cruz Biotechnology) wurde in einer Konzentration von 1:300 in „Dako® Antibody Diluent with Background Reducing Agent“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:400 für 40 Minuten, verwendet.

### **2.3.5.5 KI-67**

Der monoklonale Primärantikörper gegen Ki-67 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde in einer Konzentration von 1:2000 auf die Schnitte aufgetragen und anschließend mit der APAAP (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase)-Detektiermethode (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) sichtbar gemacht.

Diese immunhistochemische Färbung sowie die Beurteilung der Schnitte wurden von der Abteilung für Pathologie, Charité, Campus Benjamin Franklin freundlicherweise zu Verfügung gestellt.

### **2.3.5.6 E-cadherin**

Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 1 % hydrogenen Peroxidase in Aqua dest. für 25 min geblockt. Danach wurden die Schnitte mit Aqua dest. und schließlich für 5min in PBS und 0,1% Tween gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurden die Schnitte mit Power Block (BioGenex, San Ramon, Kanada) für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper Kanninchen-anti-E-cadherin (Santa Cruz Biotechnology) in einer Konzentration von 1:100 in PBS für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mittels PBS-Tween folgte die Inkubation der Schnitte mit biotinyliertem Ziege-anti-Kanninchen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology), 1:200, für 30 min bei 37°C. Nach erneutem Waschen mit PBS-Tween wurde ein peroxidasekonjugierter Avidin-Biotin Komplex (KPL, Gaithersburg, MD) für 30 min bei 37°C aufgetragen. Zur Visualisierung der Antigenbindung wurde nach dem Spülen mit TBS 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma, Deutschland) genutzt. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 30 Sekunden. Es folgte die Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol bevor die Schnitte mittels RotiHisto-Kitt (ROTH) eingedeckelt wurden. Bei den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch TBS ersetzt.

### **2.3.5.7 Snail**

Die Methodik gleicht der immunhistochemischen Anfärbung von E-cadherin (2.3.5.6). Die Konzentration des primären Antikörpers Kanninchen-anti-Snail betrug 1:50 in PBS für 30 min bei 37°C. Der sekundäre Ziege-anti-Kanninchen-Antikörper, 1:200, wurde für ebenfalls für 30 min bei 37° auf die Schnitte aufgetragen.

### **2.3.5.8 Slug**

Die Behandlung gleicht dem Vorgehen bei der Anfärbung des E-cadherins (2.3.5.6). Die Schnitte wurden mit dem Ziege-anti-Slug Antikörper, 1:50 in PBS, für 30 min bei 37°C inkubiert und nach dem Waschen mit PBS-Tween mit dem sekundäre Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, 1:200 für 30 min bei 37°C weiterbehandelt.

### **2.3.5.9 Beurteilung der immunhistochemischen Färbung**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mindestens zweimal zu verschiedenen Zeitpunkten sowie von unabhängigen Gutachtern beurteilt und mittels eines Scores eingeteilt; 0: keine Anfärbung, 1+: schwache Anfärbung, 2+: moderate Anfärbung, 3+: starke Anfärbung.

Bei der Auswertung wurden nur Schnitte berücksichtigt, die sowohl Drüsen- als auch Stromazellen enthielten und damit den gängigen pathologischen Kriterien für die Endometriose entsprachen.

Dabei wurden die Membran, die Kerne und das Zytoplasma der Epithelzellen und Stromazellen getrennt voneinander beurteilt.

Die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 erfolgte in %-Angaben der gefärbten Zellen.

### **2.3.6 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist ein Verfahren zur Lokalisierung von Proteinen. Dabei werden spezifische, gegen ein bestimmtes Protein gerichtete Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Wenn der Antikörper an das passende Antigen gebunden hat, kann dessen Lokalisierung durch Nachweis des Fluoreszenzlichts ermittelt werden. Je nach Vorbehandlung des Probenmaterials lassen sich sowohl intrazelluläre als auch auf Zelloberfläche gebundene Proteine mit dieser Methode erfassen. Neben der Untersuchung von Gewebsschnitten können auch lebende Zellen analysiert werden.

#### **2.3.6.1 VEGF und COX-2**

Die Gewebsschnitte wurden nach der Entparaffinierung (siehe Methode bei COX-2-Immunhistochemiefärbung, 2.3.5.1) und der Antigen-Demaskierung 30 min in „DAKO Serum free blocking“ (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) vorinkubiert, um

unspezifische Bindungen abzublocken. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS erfolgt die Inkubation mit einem Gemisch der primären Antikörper gegen COX-2 und VEGF mit 1,5 % FKS über Nacht bei 4°C. Der primäre COX-2-Antikörper (Cayman chemicals, USA) wurde in einer Konzentration von 1:500, der VEGF-Antikörper (Neo Markers, England) in einer Verdünnung von 1:100 in „Antibody-diluent“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) auf die Proben aufgetragen.

Anschließend wurde 3x mit TBS gewaschen, bevor dann die Zellen für 1 h mit dem Gemisch der beiden Sekundärantikörper Cy<sup>TM</sup>-2-konjugierten-Fab'2 Fragment Ziege-anti-Maus (Dianova, Hamburg, Deutschland) und Rhodamine Red<sup>TM</sup>-X-konjugiertes IgG Esel-anti-Kaninchen (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

### **2.3.6.2 smooth muscle actin (SMA) und von-Willebrandt-Faktor (vWF)**

Nach der Entparaffinierung (siehe Methode der COX-2-Färbung, 2.3.3) folgte die Inkubation mit Proteinase K ready to use (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 3 min gefolgt von der Antigen-Demaskierung für 30 min in „DAKO Serum free blocking“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). Danach erfolgte zuerst der Auftrag des primären Antikörpers gegen SMA mit 1,5 % FKS für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dem Spülen mit Tris wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper gegen vWF mit 1,5 % FKS über Nacht bei 4°C inkubiert. Der SMA-Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) wurde in einer Konzentration von 1:50, der vWF-Antikörper (SIGMA, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 in „Antibody-diluent“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) auf die Proben aufgetragen.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS, wurden die Schnitte mit dem Gemisch aus Cy<sup>TM</sup>-2-konjugierten-F-(ab)2 Fragment Ziege-anti-Maus (Dianova, Hamburg, Deutschland) und Rhodamine Red<sup>TM</sup>-X-konjugiertes IgG Esel-anti-Kaninchen (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 für 1 Stunde inkubiert.

#### Weiters Vorgehen bei beiden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen:

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI (Sigma, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 für 10 min angefärbt, erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit Fluoromount-G eingedeckelt.

Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer 40-100fachen Vergrößerung.

## **2.4 Zellkultur**

### **2.4.1 Zelllinien**

Für die Untersuchungen wurde die Endometriosezelllinie 12Z verwendet, die uns von Frau Prof. Anna Starzinski-Powitz, Johann-Wolfgang von Goethe-Universität, Frankfurt a.M., freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zelllinie wurde in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin), unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) (Biochrom, Berlin) und 1 % L-Glutamin (Biochrom, Berlin), bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert.

### **2.4.2 Gewinnung und Kultivierung von primären Endometriosezellkulturen**

Direkt nach der operativen Entnahme wurde das Endometriosegewebe unter sterilen Bedingungen in Kulturmedium, bestehend aus Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) und 1 % Glutamin, gegeben. Zur Primärkulturherstellung wurden das Endometriosegewebe zunächst mit phosphategepufferter Salzlösung (PBS) (pH 7,4) gewaschen, dann zerkleinert und die Gewebesuspension mit 20ml Enzymmix, bestehend aus 1,5 U/l Dispase (Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) und 0,25 % Collagenase A (Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) in PBS, versetzt. Das Gewebe wurde bei Raumtemperatur für 6 Stunden verdaut. Im Anschluss wurde der Gewebeansatz mit 20ml Kulturmedium verdünnt und für 10 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Danach wurden die vereinzelter Zellen in Kulturmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wiederholte sich noch zweimal. Die Primärzellen wurden in DMEM mit 4,5g/l Glukose (Biochrom, Berlin), 10 % FKS (Biochrom, Berlin), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung ausgesät und kultiviert.

### **2.4.3 Passagierung**

Nachdem ein Konfluenzgrad von ca. 80-90 % erreicht war, wurden die Zelllinie 12Z mit PBS gespült und mit je 2 mL Trypsin/EDTA (0,05 %/ 0,02 %) Lösung pro Kulturflasche

(75 cm<sup>2</sup>) bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Enzymreaktion gestoppt. Die Zellen wurden mit einer Pipette mechanisch abgelöst, vereinzelt und resuspendiert. Die 12Z wurden in Flaschen mit Kulturmedium ausgesät (Gesamtvolumen 15 mL). Die Passagierung erfolgte jeweils von einer auf vier Kulturflaschen.

Die Endometrioseprimärzellen wurden nicht passagiert, da sie sonst ihre Östrogenrezeptoren verlieren. Sie konnten maximal 7 Tage in Kultur gehalten werden. Danach verdrängen die Stromazellen die Epithelzellen und der Mischkulturcharakter geht verloren.

## **2.5 Western Blot**

Das Western-Blot-Verfahren beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen. Grundlegend dafür ist die aus der Proteingröße resultierende unterschiedliche elektrische Ladung der Moleküle. Die Proteine können anschließend durch die Ankopplung von markierten spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Damit kann das Vorkommen bestimmter Proteine bekannter Größe in Zellkulturen untersucht werden.

### **2.5.1 Zellyse für Western Blot**

Die Endometriose-Primärzellkulturen wurden zunächst 3x mit PBS gespült und anschließend mit Lysepuffer für 20 min unter leichtem Schütteln behandelt. Hierbei wurde für die Primärzellen der „Mammalian Protein Extraction Buffer“ (300µl) (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Danach wurden die Proben mit einem Zellschaber von der Kulturflasche abgekratzt und durch Aufsaugen und Ablassen mit einer 1mL-Eppendorf Pipette mechanisch homogenisiert. Durch anschließendes Zentrifugieren (15000 Umdrehungen / min) bei 8 °C für 15 min kam es zur Abtrennung der löslichen Proteinfraction von Zelltrümmern und Abbauresten (Pellet). Das Lysat konnte nun bei – 80 °C gelagert werden.

### **2.5.2 Proteinbestimmung**

Alle Proben müssen auf die gleiche Gesamtproteinkonzentration eingestellt werden, um die Bandenstärke im Western Blot vergleichen zu können.

Daher wurde eine 3-malige Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit dem BCA Protein Assay Reagentkit (Pierce, Rockford, IL, USA) vorgenommen, dabei diente BSA als Referenzstandard.

### **2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Abhängig vom Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins wurden für COX-2 ein gebrauchsfertiges 10 % Bis-Tris-Gel von Invitrogen verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200V für 50 min. mit Aqua dest. verdünntem Laufpuffer (NuPage® MOPS SDS Running Buffer (20x), Invitrogen). Der „Full Range Rainbow™ Molecular Weight“ Marker (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) und das „Biotinylated Protein Ladder Detection Pack“ (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA) wurden als molekularer Massenstandard angewendet.

### **2.5.4 Western Blot**

Zur Immunodetektion wurden die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine nun auf Nitrozellulosemembranen (Protan®, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurde das Gel in Transferpuffer erst auf Filterpapier übertragen um Austrocknung und Luftblasenbildung zu vermeiden, dann mit der Membran überdeckt und als „Sandwich“ in die Transfereinheit eingebracht. Die Proteinübertragung auf die Membran erfolgte in Transferpuffer bei 30 V für 55 min unter Wasserkühlung.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen über Nacht bei 4-8 °C in 10 % fettfreier Trockenmilch (nonfat dried milk, NFDM; Bio-Rad, München) gelegt und im Anschluss mit dem Primärantikörper, für 1 h bei RT inkubiert. 10µl des Primärantikörpers wurden verdünnt mit 10 ml 5 %iger fettfreier Trockenmilch, das bedeutet eine Konzentration von 1:1000. Zur Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers wurden die Membranen erst 3x kurz mit Aqua dest. und dann 3x 10 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 um einen Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland), die im Verhältnis 1:5000 in 5 % fettfreier Trockenmilch verdünnt wurden. Es erfolgte ein abschließendes 3-5 x 10 min Waschen in PBS mit 0,5 % Tween 20. Danach wurde die Blotmembran für 1 min mit Elektrochromolumineszenz „ECL™ Western Blotting Detection Reagent Kit“ (Amersham, Braunschweig) inkubiert. Anschließend wird die

Membran in Zellophanfolie gewickelt, um die Membran feucht zu halten. Die mit dem zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase setzt das enthaltene Substrat um, dabei entsteht Energie in Form von Chromolumineszenz (Photonen). Die freiwerdenden Photonen schwärzten den aufgelegten Röntgenfilm Hyperfilm™ ECL (Amersham, Braunschweig), auf dem dann nach der Entwicklung die einzelnen Banden sichtbar wurden.

## **2.6 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)**

Die RT-PCR ist eine Methode zum Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene. Zuerst muss die RNA durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, dann wird mittels PCR die zuvor erzeugte DNA als Vorlage verwendet, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Die Produkte der RT-PCR lassen sich mittels Gelelektrophorese untersuchen.

### **2.6.1 Gewinnung der RNA aus Primärzellen und Patientengewebe**

Die totale RNA der Zelllinien wurde mittels eines Rneasy mini Kit 50 (Qiagen) nach Herstelleranleitung extrahiert.

Zur Extraktion der Endometrioseherde aus dem intraoperativ entnommenen Gewebe wurde eine Makrodissektion am Kryostat durchgeführt, die durch HE-Färbungen kontrolliert wurde. Die Endometrioseherde sowie die Endometriumproben wurden 20my dick geschnitten (Gesamtfläche ca. 800mm<sup>2</sup>). Das Gewebe wurde mit RLT-Puffer (Qiagen) vermischt und homogenisiert. Anschließend wurde Mercaptoethanol hinzugegeben und die RNA mit Hilfe des Rneasy mini Kit 50 (Qiagen) isoliert.

Zur Sicherstellung, dass keine DNA mehr in den Proben vorhanden ist, wurden diese einer Behandlung mit DNase (RNase-free DNase Set 50, Quiagen) unterzogen.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ein BioPhotometer (Eppendorf Scientific, Hamburg, Deutschland) benutzt.

### **2.6.2 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription beschreibt den Vorgang, bei der die zu untersuchende RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in cDNA umgeschrieben wird, die dann in der folgenden Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe 2.6.3) unter Zugabe von Taq DNA Polymerase amplifiziert werden kann.



Hierzu wurde das Enzym „moloney murine leucemia virus (M-MLV)-Reverse Transkriptase“ (Promega, Mannheim, Germany) verwendet.

**Tab. 3:** Reaktionsansatz für Reverse Transkriptase

Komponente	Volumen
DNA freie RNA	2 µg Endkonzentration
Oligo (dt) oligonukleotide	1 µl
dNTP (Sigma- Aldrich, Seelze, Deutschland)	1 µl
DMPC-Wasser	Ad. 18 µl

Zur Denaturierung der RNA wurde der Ansatz (Tab. 3) für 5 min auf 65°C erwärmt. Nach anschließender schneller Abkühlung auf Eis, wurde ein Mix aus Reaktion-Puffer und RNAsin hinzugegeben und erneut auf 37°C für 2 min erwärmt. Anschließend wurde unter Rühren M-MLV-Reverse Transkriptase hinzugefügt (Tab. 4) und für eine Stunde bei 37°C sowie danach für 15min auf 70°C erwärmt. Die cDNA konnte nun bei -20°C gelagert werden.

**Tab. 4:** Master Mix zur Herstellung der cDNA

Komponente	Volumen
5x Reaktions- Puffer	5 µl
RNAsin	1 µl
M- MLV	1 µl

### 2.6.3 Semiquantitative PCR

Zur Quantifizierung der spezifischen mRNA- Expression (DNA-Äquivalent) wurde die semiquantitative PCR verwendet. Neben der Amplifikation des zu untersuchenden Gens wurde zusätzlich das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin amplifiziert.  $\beta$ -Actin ist in jeder Zelle in gleichem Maße vorhanden und kann daher als interner Standard hinzugezogen wurde.

Zur Durchführung der PCR wurde die cDNA mit einem „Ready-Mix Taq PCR Reaction Mix“ (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland), ddH<sub>2</sub>O sowie folgenden Primern (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) gemischt (Tab. 5):

<u>Twist (527bp):</u>	sense: 5'-GGG AGT CCG CAG TCT TAC-3' antisense: 5'-CCT GTC TCG CTT TCT CTT T-3'
<u>Snail (557bp):</u>	sense: 5'-CAG ACC CAC TCA GAT GTC AA-3' antisense: 5'-CAT AGT TAG TCA CAC CTC GT-3'
<u>Slug (533bp):</u>	sense: 5'-GGT CAA GAA GCA TTT CAA C-3' antisense: 5'-GGT AAT GTG TGG GTC CGA-3'
<u>E-cadherin (420bp):</u>	sense: 5'-ATT CTG ATT CTG CTG CTC TTG-3' antisense: 5'-AGT AGT CAT AGT CCT GGT CTT-3'
<u>N-Cadherin (403bp):</u>	sense: 5'-GAT GTT GAG GTA CAG AAT CGT-3' antisense: 5'-GGT CGG TCT GGA TGG CGA-3'
<u>β-Actin (335bp):</u>	sense: 5'-TTC CTG GGC ATG GAG TCC TGT GG-3' antisense: 5'-CGC CTA GAA GCA TTT GCG GTG G-3'

**Tab. 5:** PCR-Ansatz

Komponente	Volumen
Ready-Mix Taq PCR Reaction Mix	12,5 µl
cDNA	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	9 µl
Primer Mix	1 µl

Es wurde die Heißstartmethode (“hot start”) zur Optimierung der Effektivität und Spezifität der Amplifizierung und Verhinderung der unspezifischen Primeranlagerungen angewandt. Die PCR-Abschnitte beinhalten die Denaturierung der Matrize, die Hybridisierung der Primer mit der Einzelstrangmatritze (“Annealing”) und die Verlängerung (“Elongation”) der Primer mit der Taq-Polymerase (“Extension”).

Die Primerannealing-Temperatur sowie die Zykluszahl variiert in Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Gen. Der Rest des PCR-Ablaufs unterliegt einem festen Schema:

**Tab. 6:** Verlaufsschema der PCR für Twist, Snail, Slug, E- und N-cadherin

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	3min	95°	1
Zyklische Denaturierung	1min	95°	35
Primerannealing	1min	<b>58°</b>	<b>35</b>
Primerextension	2min	72°	35
Finale Elongation	10min	72°	1

Das PCR-Produkt und ein 1kD DNA-Molekulargewichtsmarker (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese bei 80V für 30min durchgeführt. Visualisiert wurden die Banden mittels ultraviolettem Licht. Als Positivkontrolle wurde die Endometriumkarzinomzelllinie Kle (ATCC CRL 1622) verwendet [117]. Für die Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA Aqua dest. verwendet.

## 2.7 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden mittels SPSS (Statistical Program for the Social Sciences) 14.0 für Windows analysiert. Die statistische Beratung erfolgte durch Frau Dr. Gericke, Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie, Charité, Berlin. Für die deskriptive Statistik wurden Kreuztabellen angefertigt und der Chi-Quadrat-Test nach Pearson bzw. der exakte Fisher-Test zur Ermittlung des Signifikanzniveaus genutzt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  kann von einer statistischen Signifikanz gesprochen werden.

Ki-67 wurde in Prozentzahlen angegeben. Es wurde der Mittelwert bestimmt. Die Ki-67-Prozentwerte wurden in einen Score von 0-4 eingeteilt und dann mittels oben genanntem Verfahren auf einen Zusammenhang mit den anderen untersuchten Faktoren untersucht.

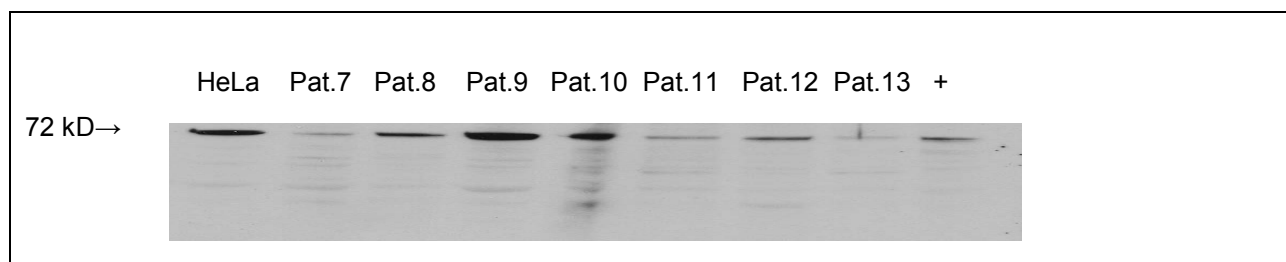
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Western Blot-Analyse von COX-2

Die Western Blot-Analyse ist ein semiquantitatives Verfahren zur Proteinbestimmung, sodass sich nicht uneingeschränkt aus der Bandenstärke auf den Proteingehalt der Probe schließen lässt. Deshalb wurde bei der Auswertung des Western Blots lediglich die Tendenz der die COX-2-Expression widerspiegelnden Bandenstärken beschrieben.

Die COX-2-Expression in Primärzellen von 2 ovariellen, 4 rektovaginalen und 1 peritonealen Endometrioseläsion wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 30µg. Keratinozyten dienten als Positivkontrolle [132]. COX-2 kann anhand seines molekularen Gewichts von 72 kD identifiziert werden.

In allen Proben wurde die Expression von COX-2 nachgewiesen, wenngleich sich eine hohe Variation in der Expressionsstärke darstellte (Abb. 6).



**Abb. 6:** COX-2-Western Blot-Analyse von Endometrioseprimärzellen

#### Legende:

HeLa: HeLa-Zellen: Zervixkarzinom-Zelllinie

Pat.7: ovarielle Endometriose

Pat.11: rektovaginal Endometriose

Pat.8: rektovaginale Endometriose

Pat.12: rektovaginal Endometriose

Pat.9: ovarielle Endometriose

Pat.13: rektovaginal Endometriose

Pat.10: peritoneale Endometriose

+: Positivkontrolle: Keratinozyten

---

## **3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Angiogenesemechanismen der Endometriose**

Zur Untersuchung der Mechanismen der Angiogenese in Endometriose wurden peritoneale, ovarielle und rektovaginale Endometrioseherde immunhistochemisch auf die Expression von COX-2 und VEGF-A untersucht. Zudem wurden in den Schnitte die Proliferationsrate mittels eines gegen Ki-67 gerichteten Antikörpers bestimmt. Ki-67 wird im Nukleus der Zellen exprimiert. COX-2 wird im Zytoplasma der Epithel- und Stromazellen exprimiert. VEGF wird sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär in Epithel- und Stromazellen exprimiert.

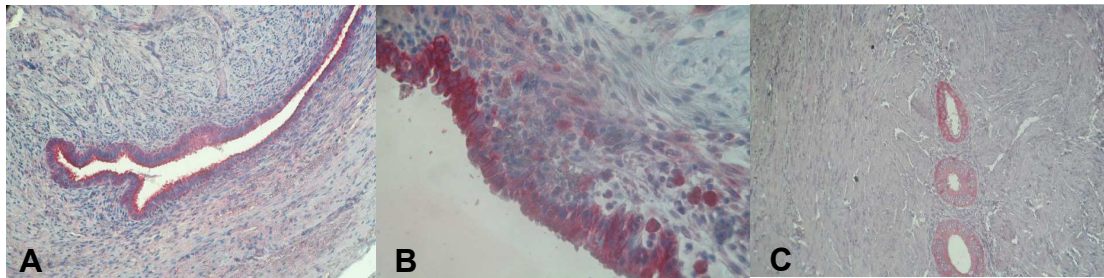
### **3.2.1 Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 72)**

34 peritoneale, 21 ovarielle sowie 17 rektovaginale Endometrioseherde wurden mittels Immunhistochemie auf die Anwesenheit von COX-2 untersucht.

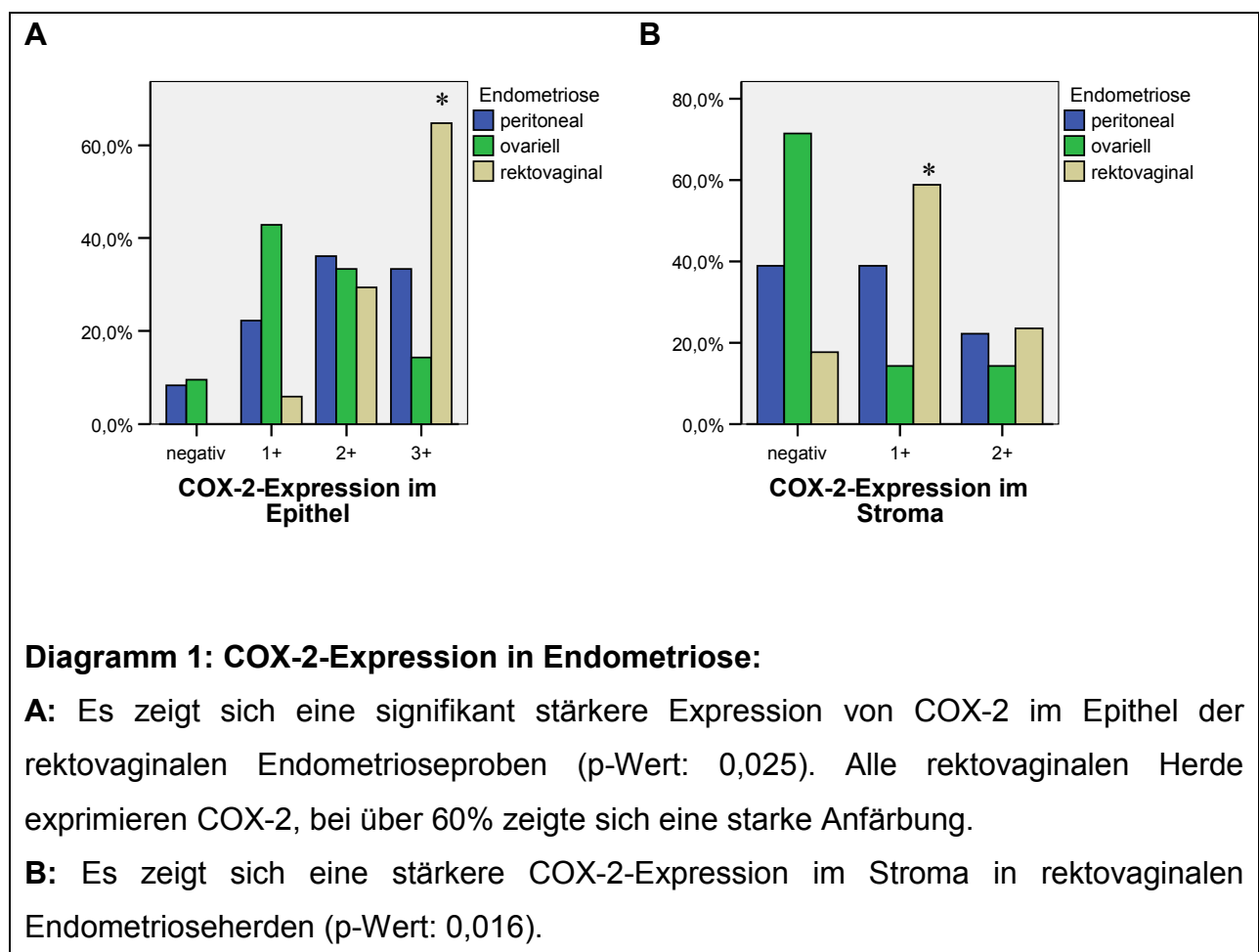
Von den untersuchten 72 Läsionen zeigten 67 (93 %) Proben eine COX-2-Expression in den Epithelzellen, 68 % wiesen eine moderate bis starke Färbung auf.

Im Stroma konnte COX-2 in 55,5 % (40 von 72 Proben) nachgewiesen werden, wobei die Stärke von schwach (34,7 %) bis moderat (20,8 %) variierte.

Die COX-2-Expression in Epithel- und Stromazellen aller untersuchten Proben korreliert signifikant (p-Wert: 0,000), dies bedeutet, dass sich bei erhöhter Expression im Epithel auch eine verstärkte Expression im Stroma zeigte. Dies zeigte sich v.a. in den untersuchten 34 peritonealen Endometrioseherden (p-Wert: 0,043). Beim Vergleich der verschiedenen Endometrioseformen zeigte sich, dass die COX-2-Expression in den rektovaginalen Proben sowohl im Epithel (p-Wert: 0,025) als auch im Stroma (p-Wert: 0,016) signifikant höher war, als in den untersuchten ovariellen und peritonealen Proben. So zeigten alle rektovaginalen Läsionen eine Expression von COX-2, 16 von 17 Schnitten sogar eine moderate bis starke Anfärbung. Bei den ovariellen Proben waren 90,5 % positiv und bei den peritonealen 91,2 % positiv für COX-2 im Epithel. 67,6 % der peritonealen Herde und 47,6 % der ovariellen Herde zeigten eine moderate bis starke Expression in den Epithelien von COX-2. Im Stroma zeigten 58,8 % der peritonealen Proben, 28,6 % der ovariellen Proben und 82,3 % der rektovaginalen Proben eine Expression von COX-2 in einer Ausprägung von schwach bis moderat.



**Abb. 7:** COX-2-Immunhistochemie von peritonealer (A, 20x), ovarieller (B, 40x) und rektovaginaler (C, 20x) Endometriose



### **3.2.2 VEGF-A-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden (n= 80)**

Die VEGF-A-Expression wurde an 38 peritonealen, 22 ovariellen und 20 rektovaginalen Endometrioseproben mittels Immunhistochemie untersucht.

In den Epithelzellen zeigte sich in 77 Proben (96,3 %) eine zytoplasmatische VEGF-A-Anfärbung. 65 Proben wiesen eine moderate bis starke Anfärbung auf. Die Kerne der Epithelzellen ließen sich in 52,6 % (42 von 80 Proben) anfärben und in schwach (n= 11), moderat (n= 11) und stark (n= 20) einteilen.

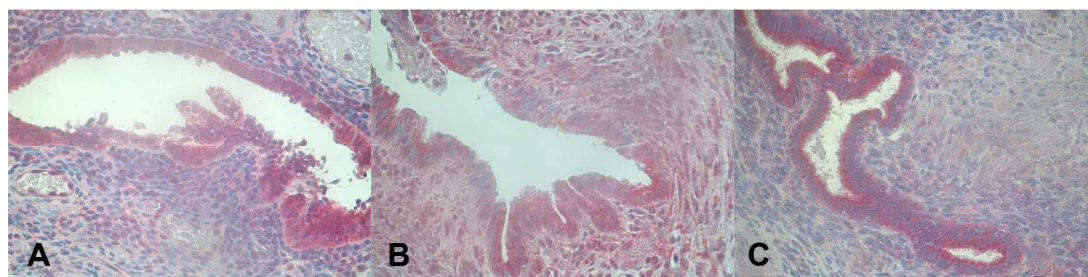
In den Stromazellen zeigte sich in 68 Proben (85,1 %) eine positive VEGF-A-Expression im Zytoplasma, die Intensität der Anfärbung ließ sich in schwach (26,3 %), moderat (38,8 %) und stark (20 %) einteilen. Eine VEGF-A-Expression in den Kernen des Stromas stellte sich in 35 von 80 Proben (43,8 %) dar, in 37,5 % ließ sich eine moderate bis starke Anfärbung nachweisen.

Es zeigte sich, dass in keiner rektovaginalen Probe VEGF-A in den Kernen exprimiert wurde, weder im Epithel (p-Wert: 0,000) noch im Stroma (p-Wert: 0,000), hingegen aber alle rektovaginalen Proben im Zytoplasma des Epithels positiv für VEGF-A waren. In ovariellen Herden zeigte sich eine sehr starke VEGF-A-Expression, in 95,5 % lag eine moderate bis starke Expression im epithelialen Zytoplasma vor und ebenfalls in 90,9 % im Zytoplasma des Stromas (p-Wert: 0,005).

Es bestand eine starke positive Korrelation zwischen der Expression von VEGF-A in Zytoplasma der Epithel- und Stromazellen (p-Wert: 0,000). Dies stellt sich besonders bei den peritonealen (p-Wert: 0,001) und den rektovaginalen (p-Wert: 0,000) Proben dar. Weiterhin war eine starke Expression von VEGF-A in den Kernen der Epithelien mit einer hohen Expression in den Kernen des Stromas assoziiert (p-Wert: 0,000). Dies zeigte sich signifikant in den peritonealen (p-Wert: 0,000) und ovariellen (p-Wert: 0,002) Endometrioseherden.

Es zeigte sich darüber hinaus, dass die Expression von VEGF-A in Epithelkernen positiv mit der Expression im stromalen Zytoplasma assoziiert ist (p-Wert: 0,001).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die VEGF-A-Expression im Zytoplasma der Epithelzellen mit der Expression in stromalen Kernen (p-Wert: 0,038) korreliert.



**Abb. 8:** VEGF-A-Immunhistochemie einer peritonealen (A, 40x), ovariellen (B, 40x) und rektovaginalen (C, 40x) Endometriose

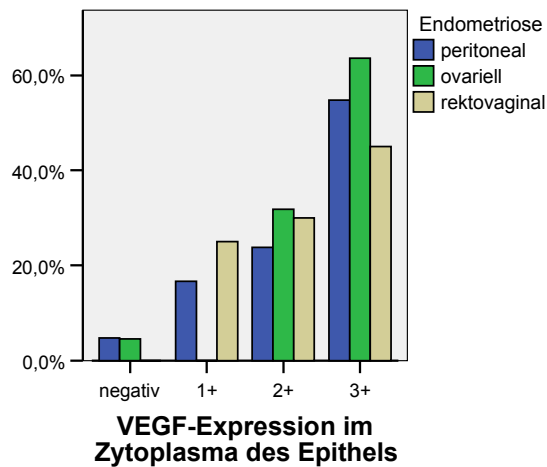
**Tab. 7:** COX-2- und VEGF-A-Expression in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseläsionen

Getestetes Antigen	Gewebe	Epithel	Reaktion	Intensität			Stroma	Reaktion	Intensität		
				1+	2+	3+			1+	2+	3+
COX-2	Endometriose		67/72 (93%)	18	25	24		40/72 (55.5%)	25	15	-
	peritoneal		31/34	8	13	10		20/34	12	8	-
	ovarial		19/21	9	7	3		6/21	3	3	-
	rektovaginal		17/17	1	5	11		14/17	10	4	-
VEGF	Endometriose	Zytoplasma	77/80 (96.3%)	12	20	45	Zytoplasma	68/80 (85.1%)	21	31	16
	peritoneal		36/38	7	7	22		31/38	12	9	10
	ovarial		21/22	-	7	14		22/22	2	15	5
	rektovaginal		20/20	5	6	9		15/20	7	7	1
	Endometriose	Kern	42/80 (52.6%)	11	11	20	Kern	35/80 (43.8%)	5	18	12
	peritoneal		25/38	6	4	15		18/38	2	9	7
	ovarial		17/22	5	7	5		17/22	3	9	5
	rektovaginal		0/20	-	-	-		0/20	0	0	0

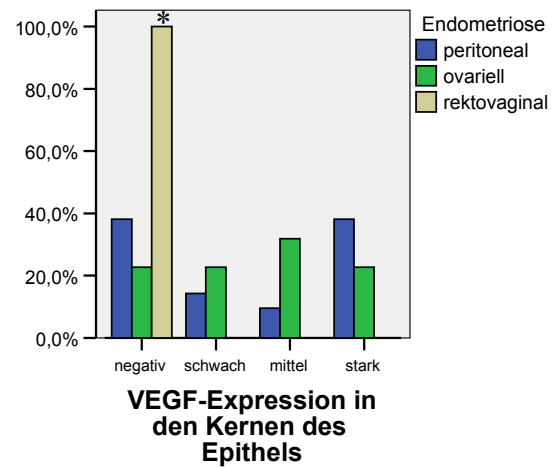


## Epithelzellen

A

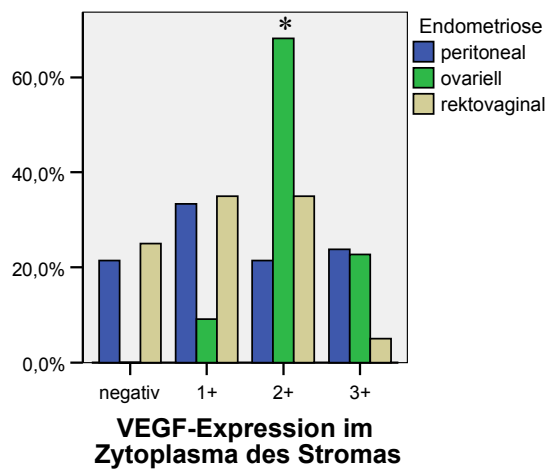


B

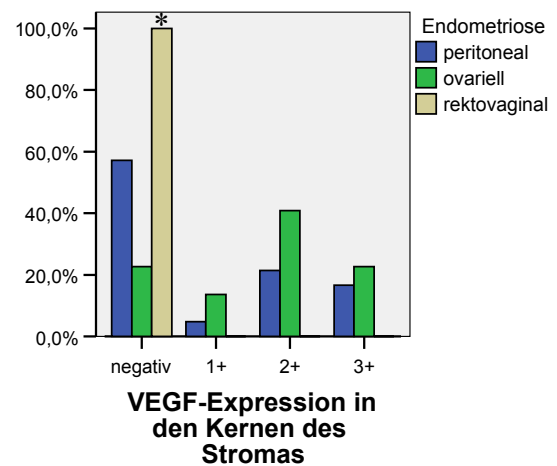


## Stromazellen

C



D



## Diagramm 2: VEGF-A-Expression in Endometriose:

**A:** Alle rektovaginalen Proben waren positiv für VEGF-A im Zytoplasma des Epithels. Hingegen zeigte keine rektovaginale Probe eine Expression von VEGF in den Kernen der Epithelzellen (**B**) und der Stromazellen (**D**). Ovarielle Endometriose zeigte eine stärkere Expression von VEGF-A sowohl im Zytoplasma des Epithels (**A**) als auch des Stromas (**C**) mit einem p-Wert von 0,005.

### 3.2.3 Ki-67-Expression in Endometriose (n= 67)

Der Mittelwert der in den Epithelzellen ermittelten Ki-67-Expression lag bei 17,61 % und in den Stromazellen bei 6,4 %. Der Median lag in den Epithelzellen bei 10 % und in den Stromazellen bei 5 %. In der folgenden Tabelle (Tab. 8) werden die Ki-67-Expressionsraten in den verschiedenen Formen der Endometriose in einen zweiten Score von 0-4 (0= 0 %, 1= 1-25 %, 2= 26-50 %, 3= 51-75 %, 4= 76 -100 %) und einen Score von I-II, der sich nach dem Mittelwert richtet eingeteilt:

**Tab. 8:** Ki-67-Expression in peritonealer, ovarieller und rektovaginaler Endometriose eingeteilt in einen Score von 0-4, sowie in einen Score von I-II, der sich nach dem Mittelwert richtet

<b>Ki-67-Expression</b>	peritoneal (n= 27 )	ovariell (n= 20 )	rektovaginal (n= 20 )
<b>Ki-67 Epithel</b>	85,2 % (23)	100 % (20)	100 % (20)
0 (0%)	14,8 % (4)	0 % (0)	0 % (0)
1 (1-25 %)	66,7% (19)	70 % (14)	70 % (14)
2 (26-50 %)	14,8 % (4)	25 % (5)	25 % (5)
3 (51-75 %)	0 % (0)	0 % (0)	5 % (1)
4 (76-100 %)	3,7 % (1)	5 % (1)	0 % (0)
<i>I (&lt;18%)</i>	<i>66,7 % (18)</i>	<i>60 % (12)</i>	<i>65 % (13)</i>
<i>II (&gt;18%)</i>	<i>33,3 % (9)</i>	<i>40 % (8)</i>	<i>35% (7)</i>
Mittelwert	15,3	20,45	18,4
<b>Ki-67 Stroma</b>	77,8 % (21)	95 % (19)	95 % (19)
0 (0%)	22,2 % (6)	5 % (1)	5 % (1)
1 (1-25 %)	77,8 % (21)	90 % (18)	95 % (19)
2 (26-50 %)	0 % (0)	5 % (1)	0 % (0)
3 (51-75 %)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
4 (76-100 %)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
<i>I (&lt;6 %)</i>	<i>74,1 % (20)</i>	<i>55 % (11)</i>	<i>80 % (16)</i>
<i>II (&gt;6 %)</i>	<i>25,9 % (7)</i>	<i>45 % (9)</i>	<i>20 % (4)</i>
Mittelwert	4,6	10,3	4,95

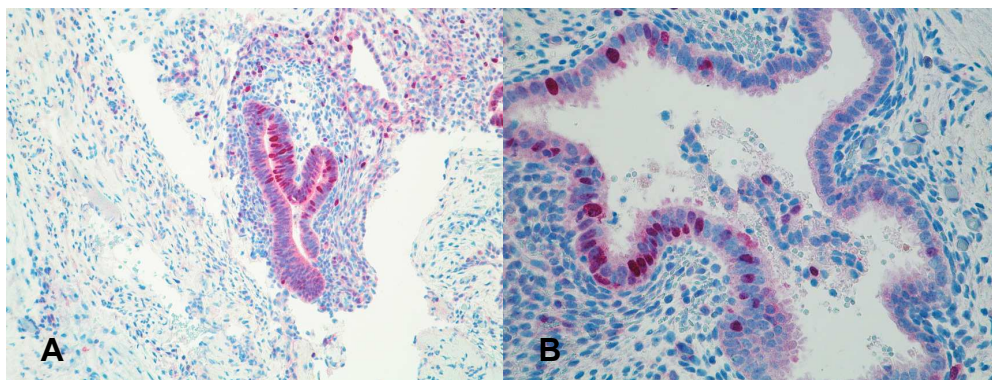
Der Mittelwert wurde benutzt um einen Score zu erstellen:

Epithel: I <18 %, II >18 %

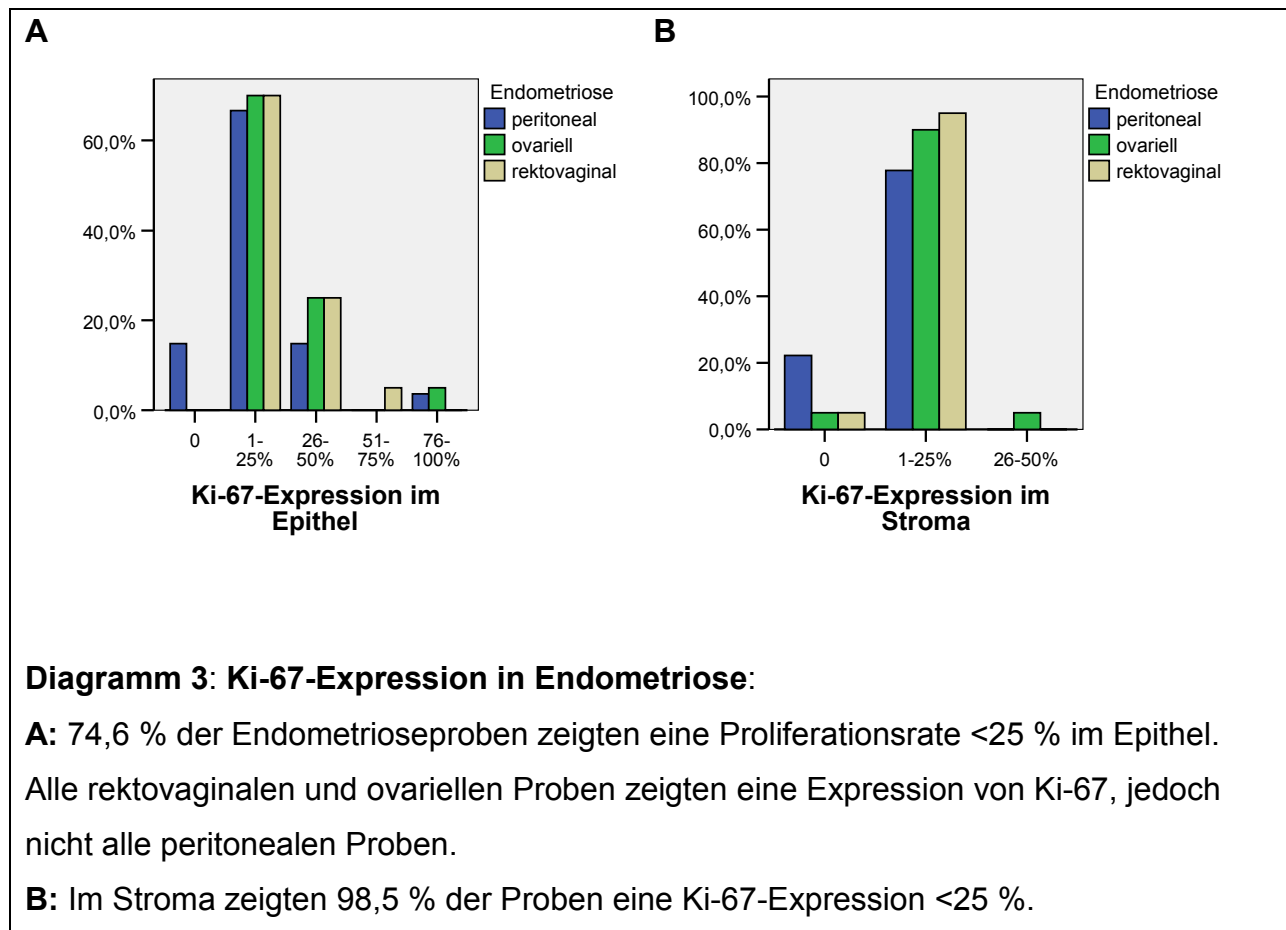
Stroma: I <6 %, II >6 %

Es zeigte sich, dass 43 von 67 untersuchten Proben (64,2 %) eine Ki-67-Expression im Epithel von <18 % (I) zeigten, 24 Proben (35,8 %) zeigten eine Expression von >18 % (II). Im Stroma zeigten 47 Proben (70,1 %) eine Expression <6 % (I) und 20 (29,9 %) eine Proliferationsrate >6 % (II).

Insgesamt zeigten 74,6 %, also 50 von 67 Proben, eine Proliferationsrate <25% im Epithel. Nur 4,5 % (3 von 67) zeigten eine Ki-67-Expression >50 %. Im Stroma lag die Proliferationsrate bei 66 Proben (98,5 %) <25 %. Es zeigt sich eine schwächere Expression im Stroma als im Epithel der Endometriose.



**Abb. 9:** Ki-67-Immunhistochemiefärbung von peritonealen Endometrioseherden  
(**A:** 20x , **B:** 40x)



### 3.2.4 Korrelation der COX-2-Expression und dem Proliferationsmarker Ki-67

Es konnte keine Korrelation zwischen der Expression von COX-2 und Ki-67 festgestellt werden.

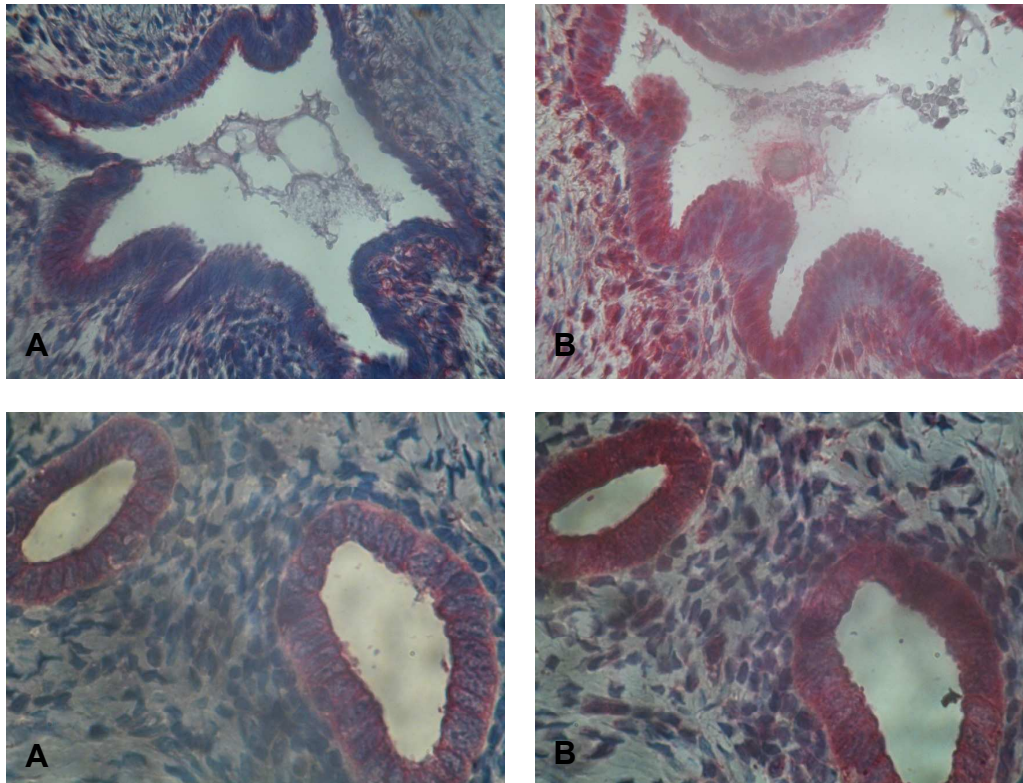
### 3.2.5 Korrelation der VEGF-A-Expression und dem Proliferationsmarker Ki-67

Es stellte sich keine Korrelation zwischen der VEGF-A-Expression und der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 dar.

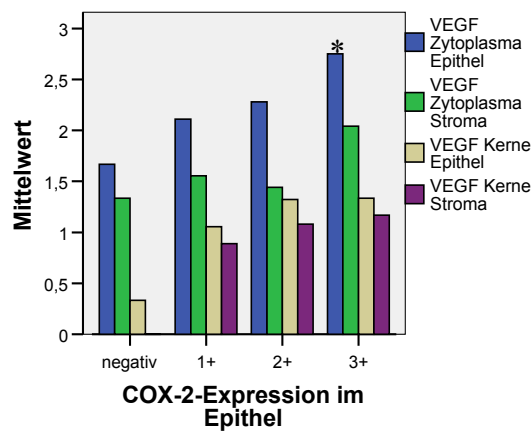
### 3.2.6 Korrelation zwischen VEGF-A- und COX-2-Expression (n= 70)

In den Epithelzellen konnte ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der COX-2 und VEGF-A Expression im Zytoplasma nachgewiesen werden (p-Wert: 0,008) (Tab. 9).

Von den 24 Proben mit einer starken COX-2-Expression im Epithel zeigten 19 (79,2 %) ebenfalls eine starke VEGF-A-Expression im epithelialen Zytoplasma.



**Abb. 10:** Immunhistochemie von COX-2 (A, 40x) und VEGF-A (B, 40x) an zwei peritonealen Endometrioseläsionen



**Diagramm 4: VEGF-A- und COX-2-Expression:** Es zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen VEGF und COX-2 im Zytoplasma des Epithels mit  $p=0,008$ .

**Tab. 9:** Kreuztabelle zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen COX-2- und VEGF-A-Expression in Endometrioseepithelzellen (p-Wert: 0,008)

**Kreuztabelle**

			COX-2 Epithel				Gesamt
			negativ	schwach	mittel	stark	
VEGF Zytoplasma Epithel	negativ	Anzahl % von VEGF Zytoplasma Epithel	1 33,3%	1 33,3%	1 33,3%	0 .0%	3 100,0%
	schwach	Anzahl % von VEGF Zytoplasma Epithel	0 .0%	2 22,2%	6 66,7%	1 11,1%	9 100,0%
	mittel	Anzahl % von VEGF Zytoplasma Epithel	1 5,9%	9 52,9%	3 17,6%	4 23,5%	17 100,0%
	stark	Anzahl % von VEGF Zytoplasma Epithel	1 2,4%	6 14,6%	15 36,6%	19 46,3%	41 100,0%
Gesamt		Anzahl % von VEGF Zytoplasma Epithel	3 4,3%	18 25,7%	25 35,7%	24 34,3%	70 100,0%

### 3.2.7 Korrelation zwischen VEGF-A und COX-2 mit der Aktivität der peritonealen Herde

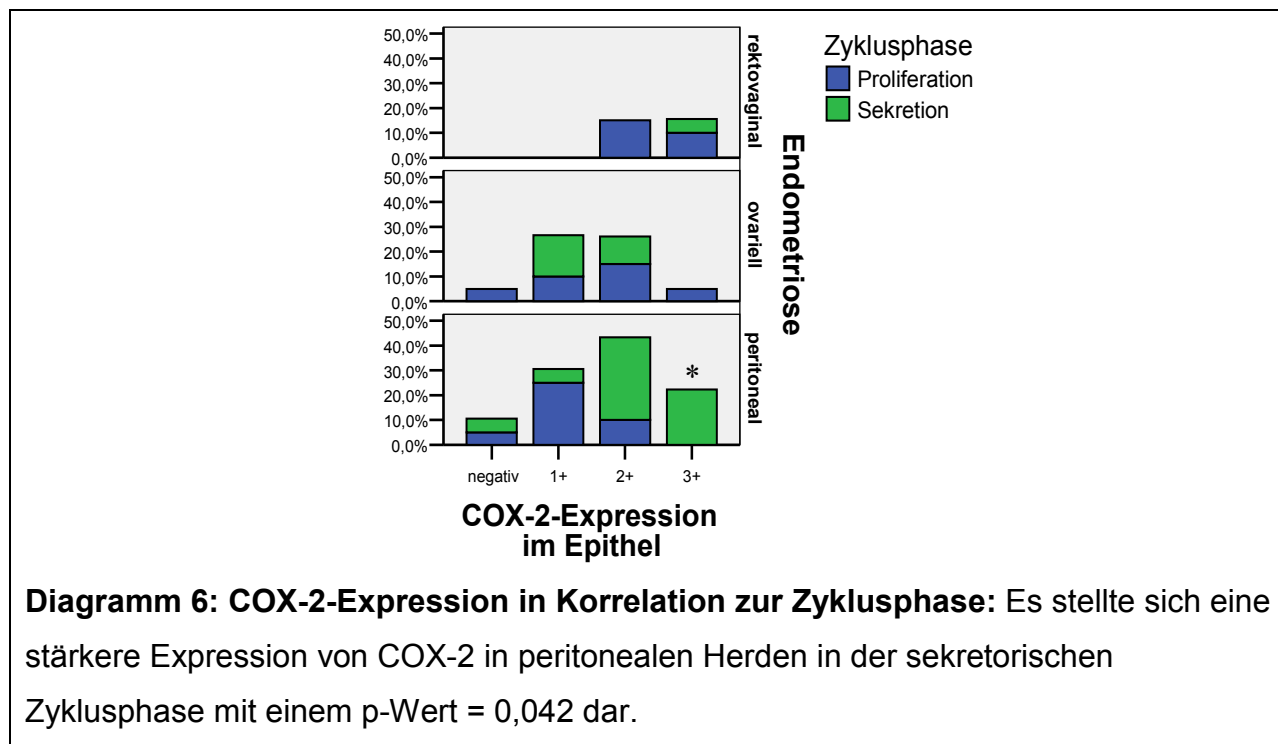
Es konnte keine Korrelation zwischen der Expression von VEGF-A bzw. COX-2 und den Aktivitätsgraden der untersuchten peritonealen Endometrioseherde festgestellt werden. Ebenfalls zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Proliferationsrate der Endometriose.

### 3.2.8 Korrelation der Expression von COX-2 und VEGF-A mit der Zyklusphase der Patientin

Die Zyklusphasen wurden mittels Angaben der Patientinnen zum ersten Tage der letzten Regel und/oder nach Kürettage durch pathologische Begutachtung des Endometriums ermittelt.

#### *COX-2-Expression:*

Bei den 20 peritonealen Proben zeigte sich eine deutlich erhöhte COX-2 Expression in der sekretorischen Phase (p-Wert: 0,042). 12 Patientinnen befanden sich in der sekretorischen Phase und 8 in der proliferativen Phase. In der Proliferationsphase zeigte sich lediglich eine schwache bis moderate, jedoch keine starke Anfärbung von COX-2. Bei den ovariellen und rektovaginalen Proben zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression von COX-2 und der Zyklusphase.



**Diagramm 6: COX-2-Expression in Korrelation zur Zyklusphase:** Es stellte sich eine stärkere Expression von COX-2 in peritonealen Herden in der sekretorischen Zyklusphase mit einem p-Wert = 0,042 dar.

#### *VEGF-A- Expression:*

Es wurden 42 Fälle in die Auswertung mit einbezogen. Es ließ sich keine Korrelation zwischen der VEGF-A-Expression und der Zyklusphase feststellen.

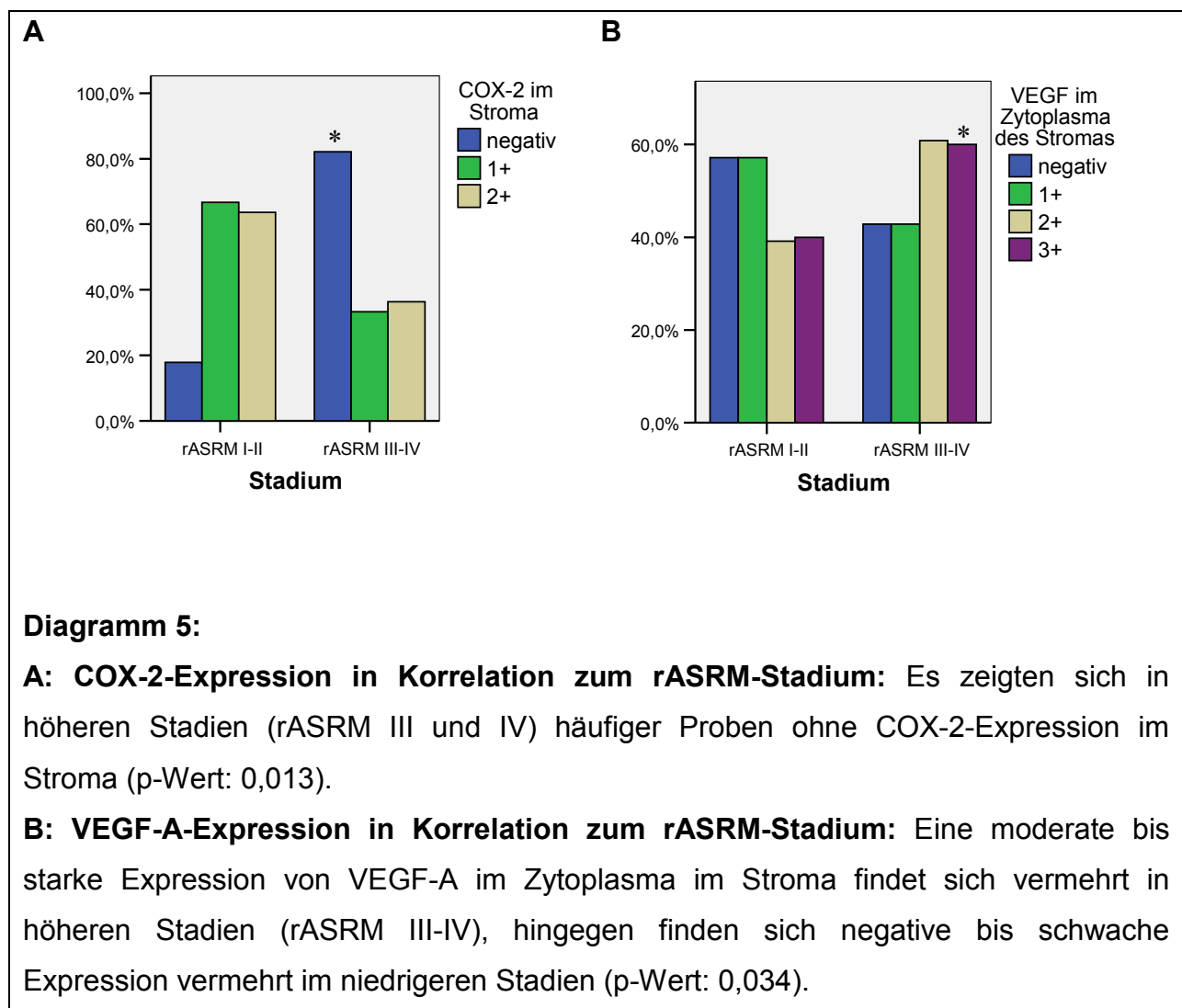
### **3.2.9 Korrelation der Expression von COX-2 und VEGF-A mit den Stadien nach rARSM-Kassifikation**

#### *COX-2-Expression:*

Es war keine Korrelation der Expression von COX-2 in Epithelzellen und dem Stadium nachweisbar. Allerdings ließ sich eine negative Korrelation für die COX-2-Expression in Stromazellen und dem Stadium feststellen, es zeigte sich eine schwächere Expression in höheren Stadien (p-Wert: 0,002). Von 28 negativen Proben wurden 16 (57,1 %) in das Stadium IV nach rARSM eingeteilt. Bei den untersuchten peritonealen Proben zeigte sich die negative Korrelation, auch hier wurde eine signifikant geringere Anfärbung von COX-2 in den Stromazellen der Endometriose in höheren Stadien (rARSM III-IV) beobachtet (exakter Fisher-Test: p-Wert: 0,013).

**VEGF-A-Expression:**

Es war keine Korrelation der Expression von VEGF-A in Epithelzellen und dem Stadium nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Expression von VEGF-A im Zytoplasma des Stromas mit der Stadieneinteilung der Endometriose signifikant in Zusammenhang steht (p-Wert: 0,034). Bei 60,6 % der Schnitte mit moderater bis starker Anfärbung des Stromazytoplasmas befanden sich die Patientinnen im Stadium III oder IV. Bei 57,2 % der Schnitte mit negativer bis schwacher Expression von VEGF-A im Zytoplasma des Stromas ließen sich die Patientinnen in die Stadien I und II einteilen.





### 3.2.10 Korrelation der Expression von COX-2 und VEGF-A mit der hormonellen Therapie der Patientinnen

#### *COX-2-Expression:*

Angaben zur hormonellen Therapie lagen in 68 Fällen vor, 42 Patientinnen (61,8 %) hatten keine hormonelle Medikation, 16 Patientinnen (23,5 %) nahmen kombinierte orale Kontrazeptiva ein und jeweils 5 Patientinnen (7,4 %) GnRH-Analoga bzw. Gestagenmonopräparate.

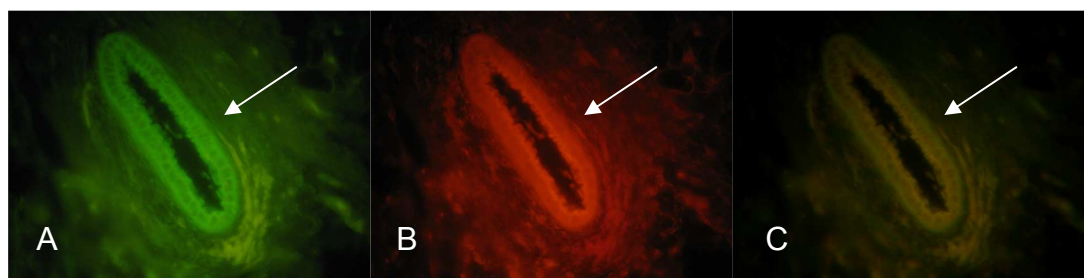
Es stellte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von COX-2 und der hormonellen Therapie der Patientinnen dar.

#### *VEGF-A-Expression:*

Es lagen Angaben zur hormonellen Therapie in 75 Fällen vor, 46 Patientinnen (61,3 %) hatten keine hormonelle Medikation, 17 Patientinnen (22,7 %) nahmen kombinierte orale Kontrazeptiva, 5 Patientinnen (6,7 %) GnRH-Analoga und 7 Patientinnen (9,3 %) Gestagenmonopräparate ein.

Es zeigte sich keine Assoziation zwischen der Expression von VEGF-A und der hormonellen Therapie der Patientinnen.

## 3.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen

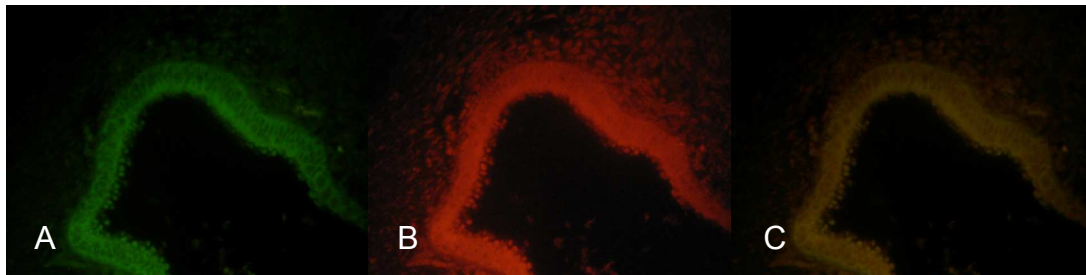


**Abb. 11:** COX-2- (A, grün) und VEGF-A- (B, rot) Immunfluoreszenzbilder eines peritonealen Endometrioseherdes (←), Overlay (C), 40x.

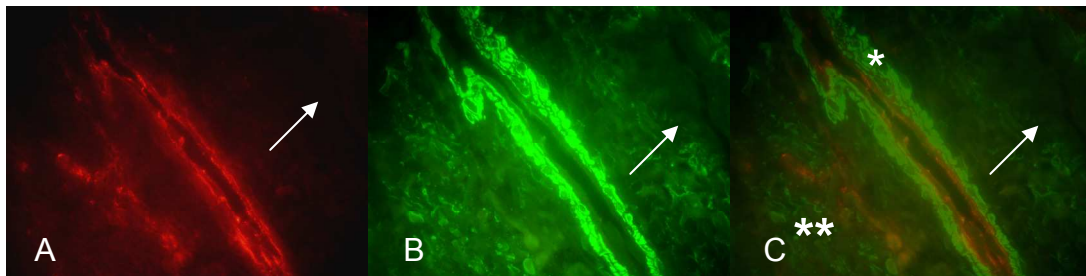
Die Abbildungen 11 und 12 zeigen peritoneale Endometrioseherde (←) mit einer Co-Expression von COX-2 und VEGF-A im Epithel und Stroma.

In Abbildung 13 zeigt sich in der Nähe eines Endometrioseherdes deutlich ein reifes Gefäß (\*), ausgezeichnet durch seine Muskelschicht angezeigt durch SMA. Weiterhin

ließ sich ein unreifes Gefäß (\*\*), welchem die umgebende Muskelschicht fehlt, darstellen. Es zeigt sich eine spezifische Anfärbung von vWF und SMA.



**Abb. 12:** COX-2- (A, grün) und VEGF-A- (B, rot) Immunfluoreszenzbilder eines peritonealen Endometrioseherdes, Overlay (C), 40x



**Abb. 13:** vWF- (A, rot) und SMA- (B, grün) Immunfluoreszenzfärbung einer ovariellen Endometriose (→). Im Overlay (C) zeigt sich ein adultes reifes (\*) und ein junges unreifes Gefäß (\*\*) in der unmittelbaren Umgebung der Endometriose, 40x.

### **3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der EMT der Endometriose**

Zur Untersuchung des invasiven Wachstums und der metastatischen Potenz der Endometriose wurden mehrere an der EMT beteiligten Faktoren untersucht: die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug sowie die Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin. Weiterhin wurden Endometriumpuben von Patientinnen mit und ohne Endometriose auf die Expression von Twist, E- und N-cadherin untersucht. Die Expression der Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug sowie von N-cadherin zeigte sich im Zytoplasma der Epithel- und Stromazellen. Twist konnte zusätzlich noch in den Kernen des Epithels und Stromas nachgewiesen werden. Die E-cadherin-Expression zeigte sich durch Membrananfärbung in den Epithelien.

#### **3.4.1 Twist-Expression in peritonealen (n=9), ovariellen (n=9) und rektovaginalen (n=9) Endometrioseherden (n= 27) und im Endometrium (n= 13)**

Im Zytoplasma der epithelialen Zellen konnte in alle untersuchten Endometrioseherde Twist nachgewiesen werden. 24 von 27 Schnitten (88,8 %) wiesen dabei eine moderate bis starke Anfärbung auf. In den Epithelzellen ließ sich in 16 von 27 Schnitte (59,3 %) eine positive Kernfärbung nachweisen, in 9 Schnitten ließ sich eine moderate bis starke Anfärbung darstellen.

Die Twist-Expression im Zytoplasma der Stromazellen konnte in 23 von 27 Schnitte (85,2 %) dargestellt werden, wobei hier lediglich 25,9 % der Schnitte eine moderate oder starke Anfärbung aufwiesen. Die stromalen Zellkerne zeigten eine Twist-Expression nur in 7 Fällen (25,9 %), wobei 3 Proben eine moderate bis starke Färbung aufwiesen.

Eine hohe Expression von Twist im Zytoplasma der Epithelzellen war signifikant assoziiert mit einer hohen Expression in den Kernen des Epithels (p-Wert: 0,005). Eine erhöhte Expression von Twist in der epithelialen Kernen war assoziiert mit einer erhöhten Expression im stromalen Zytoplasma (p-Wert: 0,004). Weiterhin bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von Twist in den Kernen und im Zytoplasma der Stromazellen (p-Wert: 0,000). Ebenfalls stellte sich eine Korrelation

zwischen der Twist-Expression in den Stromalen Kernen und in den epithelialen Kernen dar (p-Wert: 0,023).

Im Endometrium konnte in 11 von 13 (84,6 %) Proben eine Expression von Twist im Zytoplasma der Epithelzellen nachgewiesen werden, 76,9 % hauptsächlich im schwachen bis moderaten Bereich einteilbar. Hingegen zeigte sich nur in einer Probe eine Kernfärbung im Epithel, 92,3 % waren negativ.

In den Stromazellen waren nur 5 von 13 (38,5 %) Proben positiv für Twist im Zytoplasma, 4 Proben zeigten eine schwache Anfärbung. Es zeigte sich keine Expression von Twist in Stromalen Kernen.

#### **3.4.2 Snail-Expression in peritonealen (n=7), ovariellen (n=9) und rektovaginalen (n=7) Endometrioseherden (n= 23)**

Der Transkriptionsfaktor Snail konnte in allen Proben mit einer Ausnahme (95,7 %) im Epithel und im Stroma nachgewiesen werden. In 78,3 % der Fälle ließ sich eine moderate bis starke Anfärbung in den Epithelzellen darstellen. Hingegen zeigte sich nur in 7 Proben (30,4 %) in den Stromazellen eine moderate Anfärbung, es zeigte sich keine starke Expression.

#### **3.4.3 Slug-Expression in peritonealen (n=6), ovariellen (n=7) und rektovaginalen (n=7) Endometrioseherden (n= 20)**

Eine Expression von Slug im Epithel stellte sich in 16 von 20 Proben (80 %) dar, 10 Schnitte wiesen eine moderate bis starke Anfärbung auf. Im Kontrast dazu zeigte das Stroma nur in 40 % (8 von 20 Schnitten) eine schwache Färbung.

Es zeigte sich eine positive, signifikante Korrelation der Expression in Epithelzellen und Stromazellen (p-Wert: 0,003).

#### **3.4.4 N-cadherin-Expression in peritonealen (n=9), ovariellen (n=9) und rektovaginalen (n=9) Endometrioseherden (n= 27) und im Endometrium (n= 13)**

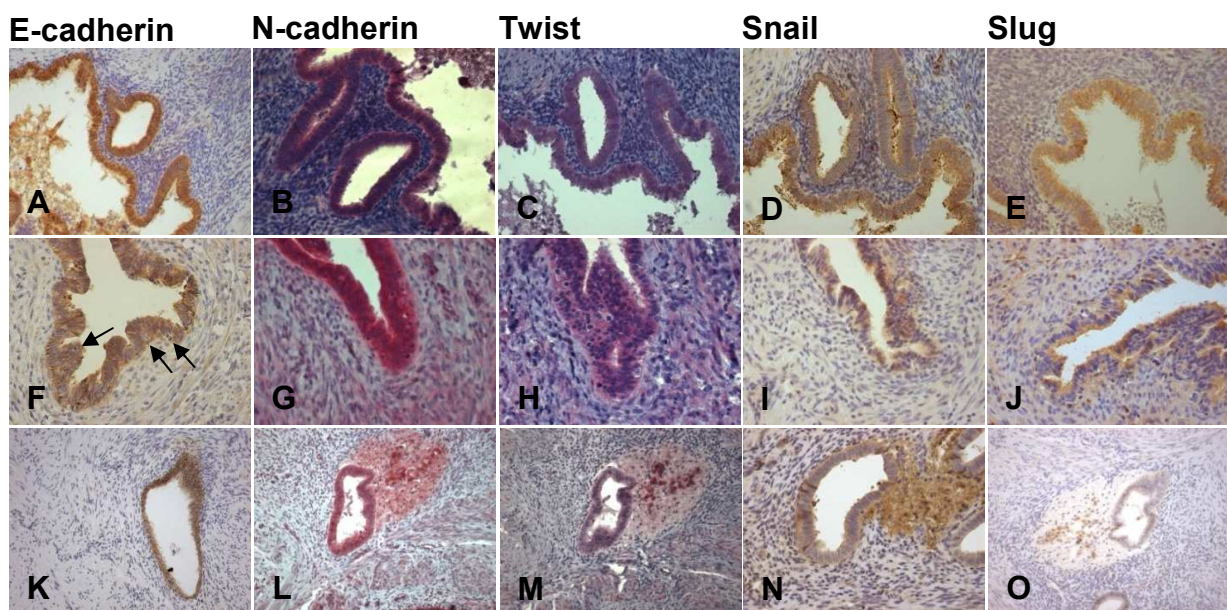
N-cadherin konnte in 26 von 27 Proben (96,3 %) im Epithel nachgewiesen werden, dabei wiesen 88,9 % eine moderate bis starke Anfärbung auf. In den Stromazellen konnte N-cadherin in 22 von 27 Proben (81,4 %) dargestellt werden, 77,7 % lagen im Score-Bereich schwach bis moderat.

In allen 13 Endometriumproben konnte eine N-cadherin-Expression in den Epithelzellen nachgewiesen werden, 12 Proben zeigten eine moderate bis starke Anfärbung. 76,9 % (10 von 13) der Proben zeigten eine stromale, hingegen aber schwache N-cadherin-Anfärbung.

### 3.4.5 E-cadherin-Expression in peritonealen (n=8), ovariellen (n=9) und rektovaginalen (n=8) Endometrioseherden (n= 25) und im Endometrium (n= 12)

In allen untersuchten Endometrioseproben konnte eine E-cadherin-Expression im Epithel festgestellt werden, dabei wiesen 72 % (18 von 25 Proben) eine starke Anfärbung auf. Vereinzelt Epithelzellen zeigten keine E-cadherin-Anfärbung. In den Stromazellen zeigte sich keine Anfärbung.

Alle Endometriumproben wiesen eine E-cadherin-Expression im Epithel auf, 10 von 12 Proben (83,3 %) zeigten eine starke Anfärbung. Es zeigte sich keine stromale Anfärbung im Endometrium.

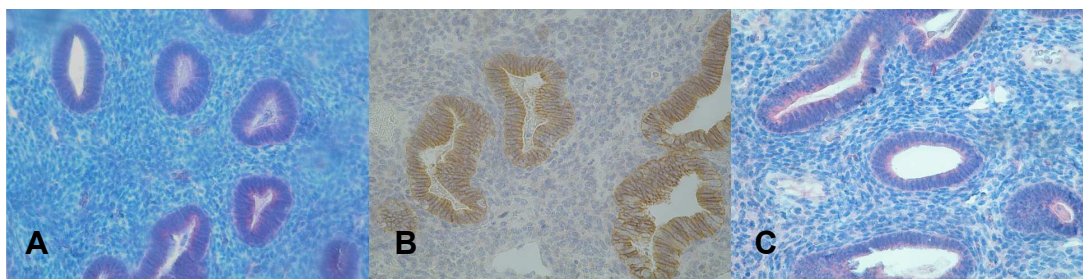


**Abb. 14:** Immunhistochemie eines peritonealen Endometrioseherdes zur Darstellung der Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin sowie der Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug in peritonealer (A-E), ovarieller (F-J) und rektovaginaler (K-O) Endometriose, 40x. Vereinzelt Zellen ohne E-cadherin-Anfärbung (→, F)



### 3.4.6 Unterschiede in der Expression der untersuchten Faktoren zwischen Endometrium (n= 13) und Endometrioseläsionen (n= 27 )

In den Epithelien zeigten die Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin ähnliche Expressionsmuster in Endometrium und Endometrioseläsionen. Sowohl in den Endometrioseproben als auch im Endometrium lag keine stromale E-cadherin-Expression vor. N-cadherin konnte in 10 von 13 Endometriumproben im Stroma mit einer lediglich schwachen Anfärbung nachgewiesen werden, aber in den Endometrioseläsionen im Stroma zeigte sich in 9 von 27 Proben eine moderate bis starke Expression von N-cadherin.



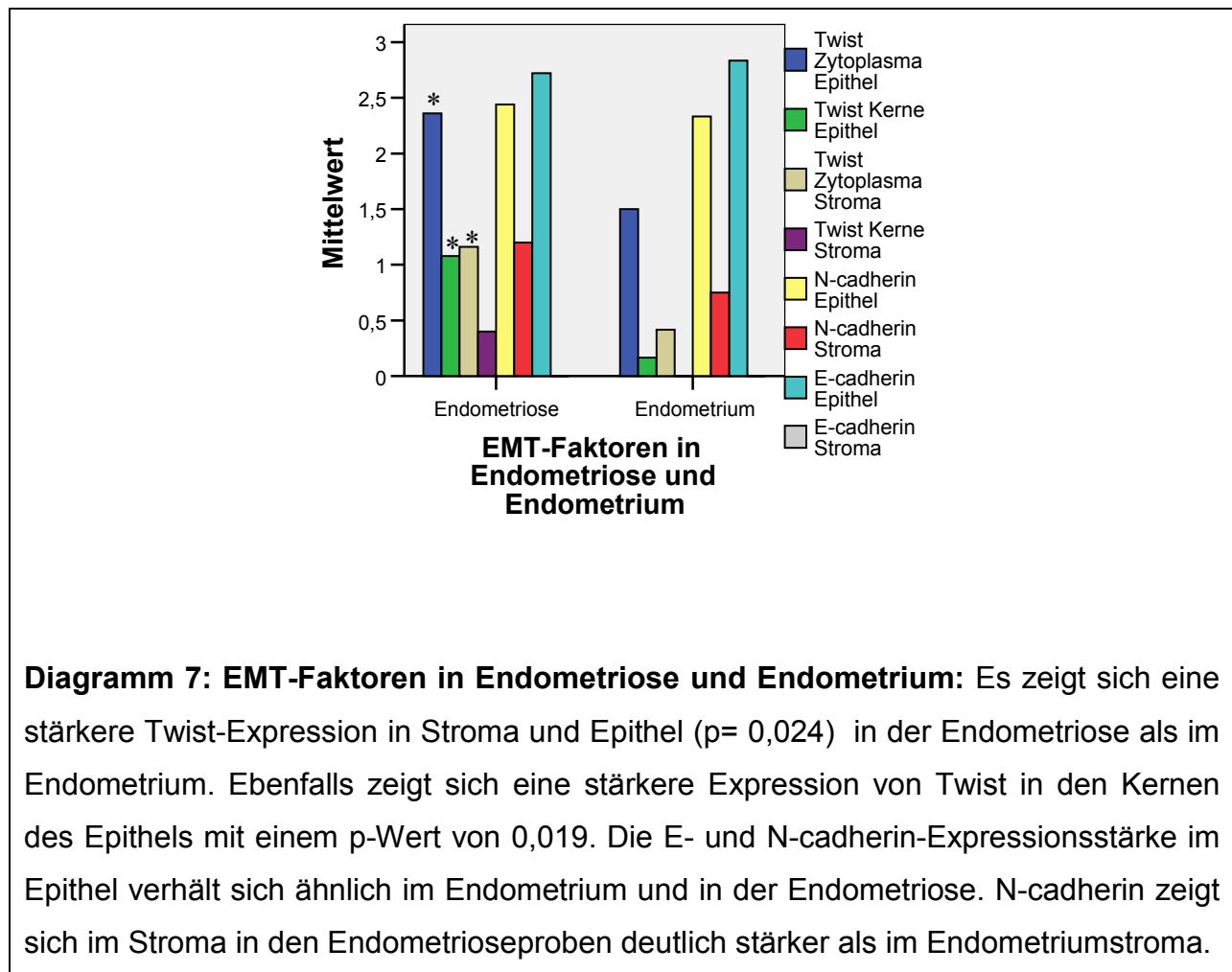
**Abb. 15:** Immunhistochemie von Endometrium zur Darstellung des Transkriptionsfaktors Twist (A) und den Adhäsionsmolekülen E- (B) und N- cadherin (C), 40x

Es zeigte sich in den untersuchten Endometrioseläsionen eine signifikant höhere Expression des Transkriptionsfaktors Twist im Zytoplasma des Epithels und des Stromas (p-Wert: 0,024) sowie in den epithelialen Kernen (p-Wert: 0,019). Lediglich eine Probe des Endometriums wies eine starke Twist-Expression im Zytoplasma des Epithels auf, hingegen zeigten 48,1 % der Endometrioseproben eine starke Anfärbung im epithelialen Zytoplasma. Nur eine Probe des Endometriums wies eine Expression von Twist in den Kernen auf, hingegen zeigte sich in 16 von 27 Proben eine Twistkernfärbung im Epithel der Endometrioseproben. In 8 von 13 Proben des Endometriums waren die Stromazellen negativ, in den Endometrioseproben zeigten 23 von 27 Proben eine schwache Twist-Expression im Stroma.

Folgende Tabelle (Tab. 10) zeigt die Expression der EMT-Faktoren im Endometrium und in den Endometrioseherden:

Tab. 10: Expression der EMT-Faktoren in Endometrium- und Endometrioseproben

Getestetes Antigen	Gewebe	Reaktion			Intensität			Reaktion			Intensität			
					1+	2+	3+		1+	2+	3+		1+	2+
E-cadherin	Endometriose	<u>Epithel</u>	25/25 (100%)	-	7	18	<u>Stroma</u>	0/25 (0%)	-	-	-			
	peritoneal		8/8	-	4	4		-	-	-	-			
	ovarial		9/9	-	2	7		-	-	-	-			
	rektovaginal		8/8	-	1	7		-	-	-	-			
	Endometrium		12/12 (100%)	-	2	10		0/12 (0%)	-	-	-	-		
	Frauen mit Endometriose Frauen ohne Endometriose		5/5 7/7	- -	2 -	3 7		- -	- -	- -	- -	- -		
N-cadherin	Endometriose	<u>Epithel</u>	26/27 (96.3%)	2	7	17	<u>Stroma</u>	22/27 (81.5%)	13	8	1			
	peritoneal		9/9	-	1	8		6/9	4	2	-			
	ovarial		9/9	-	5	4		8/9	3	4	1			
	rektovaginal		8/9	2	1	5		8/9	6	2	-			
	Endometrium		13/13 (100%)	1	6	6		10/13 (76.5%)	10	-	-	-		
	Frauen mit Endometriose Frauen ohne Endometriose		6/6 7/7	- 1	3 3	3 3		6/6 4/7	6 4	- -	- -	- -		
Twist	Endometriose	<u>Epithel</u>	27/27 (100%)	3	11	13	<u>Stroma</u>	23/27 (85.2%)	16	5	2			
	peritoneal	<u>Zytoplasma</u>	9/9	-	2	7		8/9	4	3	1			
	ovarial		9/9	1	6	2		7/9	5	2	-			
	rektovaginal		9/9	2	3	4		8/9	7	-	1			
	Endometriose	<u>Kern</u>	16/27 (59.3%)	7	6	3		7/27 (25.9%)	4	2	1			
	peritoneal		8/9	3	3	2		3/9	2	-	1			
	ovarial		3/9	3	-	-		1/9	1	-	-			
	rektovaginal		5/9	1	3	1		3/9	1	2	-			
	Endometrium	<u>Zytoplasma</u>	11/13 (84.6%)	3	7	1		5/13 (38.5%)	4	1	-			
	Frauen mit Endometriose		5/7	2	3	-		-/7	-	-	-			
	Frauen ohne Endometriose		6/6	1	4	1		5/6	4	1	-			
	Endometrium	<u>Kern</u>	1/13 (7.7%)	-	1	-		0/13 (0%)	-	-	-			
Frauen mit Endometriose		0/7	-	-	-		0/7	-	-	-				
Frauen ohne Endometriose		1/6	-	1	-		0/6	-	-	-				
Snail	Endometriose	<u>Epithel</u>	22/23 (95.7%)	4	14	4	<u>Stroma</u>	22/23 (95.7%)	15	7	-			
	peritoneal		7/7	-	5	2		7/7	4	3	-			
	ovarial		9/9	4	5	-		8/9	7	1	-			
	rektovaginal		6/7	-	4	2		7/7	4	3	-			
Slug	Endometriose	<u>Epithel</u>	16/20 (80%)	6	7	3	<u>Stroma</u>	8/20 (40%)	8	-	-			
	peritoneal		3/6	2	-	1		1/6	1	-	-			
	ovarial		7/7	2	4	1		4/7	4	-	-			
	rektovaginal		6/7	2	3	1		3/7	3	-	-			

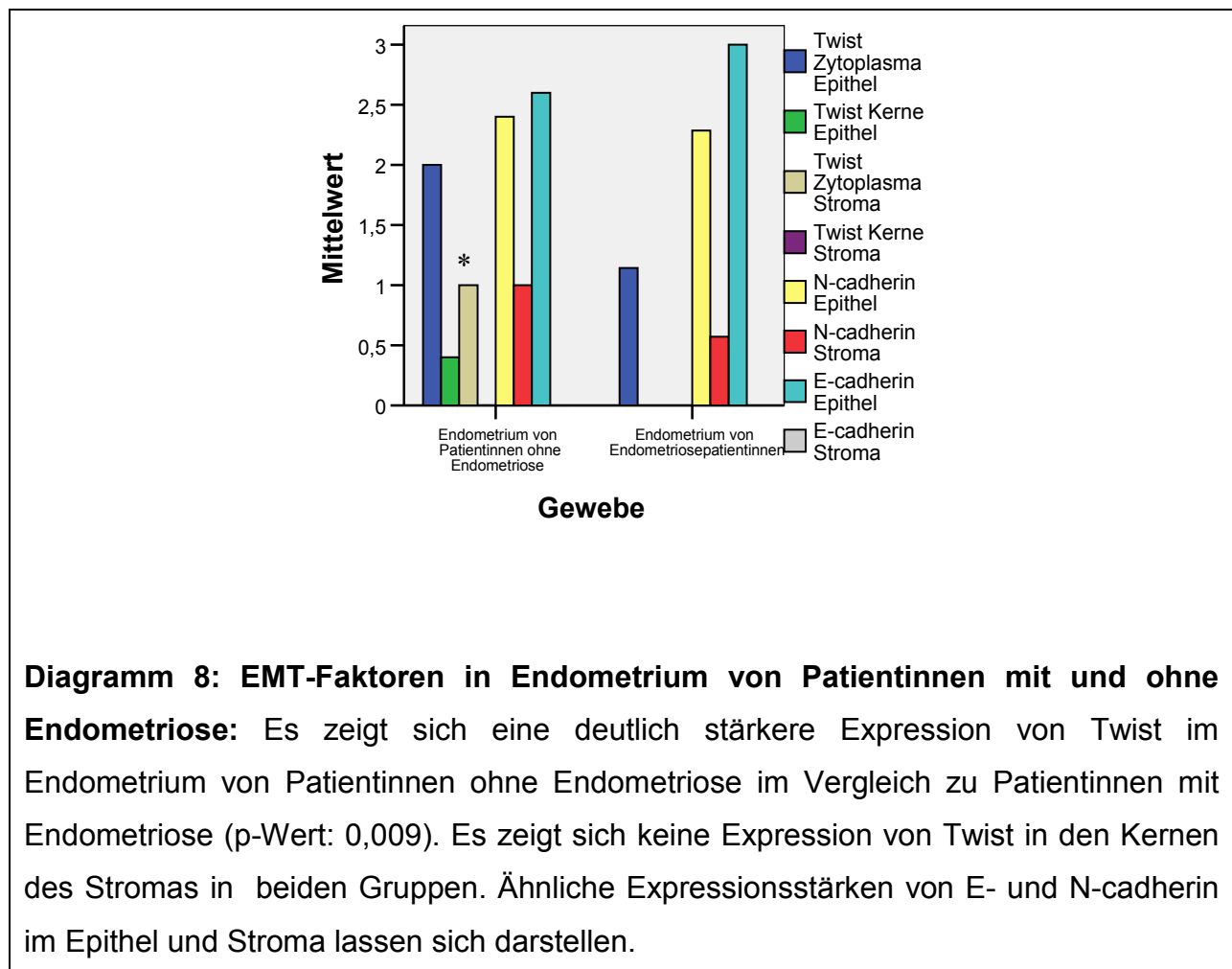


### 3.4.7 Unterschiede in der Expression der untersuchten Faktoren zwischen Endometrium von Patientinnen mit ( $n=7$ ) und ohne ( $n=6$ ) Endometriose

Alle 7 Proben des Endometriums von Endometriosepatientinnen waren negativ für die Twist-Expression im stromalen Zytoplasma, hingegen lag nur in 1 von 6 Proben (16,7 %) des Endometriums von Patientinnen ohne Endometriose ein negatives Ergebnis für die Twist-Expression im stromalen Zytoplasma vor, 5 Proben zeigten ein schwache bis moderate Anfärbung. Es zeigte sich also eine niedrigere Twist-Expression im stromalen Zytoplasma in den Endometriumproben von Endometriosepatientinnen im Vergleich zu Endometrium bei Frauen ohne Endometriose ( $p$ -Wert:  $0,009$ ). Wegen dieses Unterschiedes wurde eine Subgruppenanalyse von Twistexpression im stromalen Zytoplasma im Endometrium von Endometriosepatientinnen und Endometrium von gesunden Frauen im Vergleich zu Endometriose durchgeführt. Auch im Vergleich zu der



jeweiligen Subgruppe ergab sich eine deutlich höhere Expression von Twist im stromalen Zytoplasma der Endometrioseläsionen. Insgesamt zeigte sich im Endometrium bei Endometriosepatientinnen eine geringere bis fehlende Expressionsstärke sowohl im Epithel als auch im Stroma im Vergleich zum Endometrium bei Patientinnen ohne Endometriose. Die Kerne des Stromas zeigten in beiden untersuchten Geweben keine Twist-Expression. Für E- und N-cadherin zeigten sich in beiden Gruppen sowohl in der Häufigkeit als auch in der Stärke ähnliche Expressionsmuster im Epithel. Das Stroma des Endometriums von Endometriosepatientinnen zeigt in 57,1% eine positive N-cadherin-Abfärbung, die sich im schwachen Bereich befand. Bei Proben der Gruppe ohne Endometriose zeigten alle eine schwache N-cadherin-Expression.



### **3.4.8 Unterschiede in der Expression der untersuchten Faktoren bei peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Läsionen**

Es zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der untersuchten EMT-Faktoren zwischen den verschiedenen Endometrioseformen.

### **3.4.9 Korrelation der Expression der untersuchten EMT-Faktoren mit der Zyklusphase**

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression der getesteten Antigene und der Zyklusphase.

### **3.4.10 Korrelation der Expression der untersuchten EMT-Faktoren mit der hormonellen Behandlung der Patientinnen**

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression der untersuchten Faktoren und der angewandten Therapie.

### **3.4.11 Korrelation der Expression der untersuchten EMT-Faktoren mit den Stadien nach der rASRM-Klassifikation**

Es konnte keine Korrelation zwischen der rASRM-Klassifikation und der Expression der untersuchten Antigene Twist, Snail, Slug, E- und N-cadherin festgestellt werden.

### **3.4.12 Korrelation der getesteten Antigene untereinander**

#### *E-cadherin- und N-cadherin-Expression:*

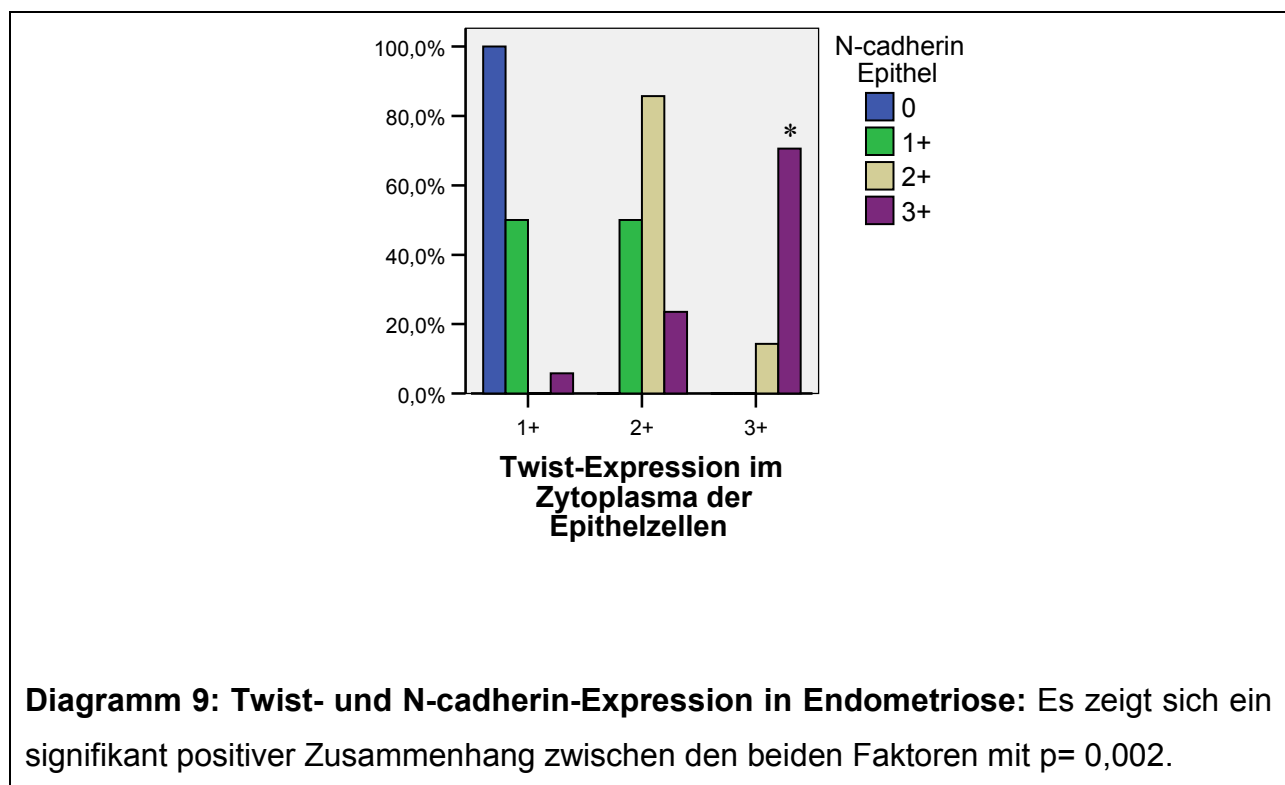
Es zeigte sich bei allen Läsionen mit moderater E-cadherin-Expression eine starke Expression von N-cadherin, alle Proben mit einer negativen bis moderaten Expression von N-cadherin wiesen eine starke Anfärbung von E-cadherin auf. Somit zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation für die Expression von E- und N-cadherin im Epithel (Fisher-Test: p-Wert: 0,02). Die Stromazellen waren alle negativ für E-cadherin, jedoch zeigten 21 von 25 Schnitten eine N-cadherin-Expression, 13 von 25 Schnitten wiesen eine schwache Anfärbung auf.

#### *Twist- und N-cadherin-Expression:*

Es konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der Twist- und N-cadherin-Expression nachgewiesen werden: So zeigten die 17 Proben mit einer starken

Anfärbung für N-cadherin in den Epithelien in 12 Proben eine ebenfalls starke Expression von Twist im Zytoplasma der Epithelzellen (p-Wert: 0,002).

Von 13 Proben mit einer moderaten bis starken Twist-Expression im Stroma zeigten 12 keine oder eine schwache Expression von N-cadherin (Fisher Test: p-Wert: 0,013). Es zeigte sich ebenfalls eine negative Korrelation bei der Expression von N-cadherin im Stroma und der Twist-Expression im Zytoplasma des Epithels. So zeigten bei 13 Proben mit starker Twist-Expression im Zytoplasma des Epithels 12 eine negative bzw. schwache N-cadherin-Expression im Stroma (p-Wert: 0,011).



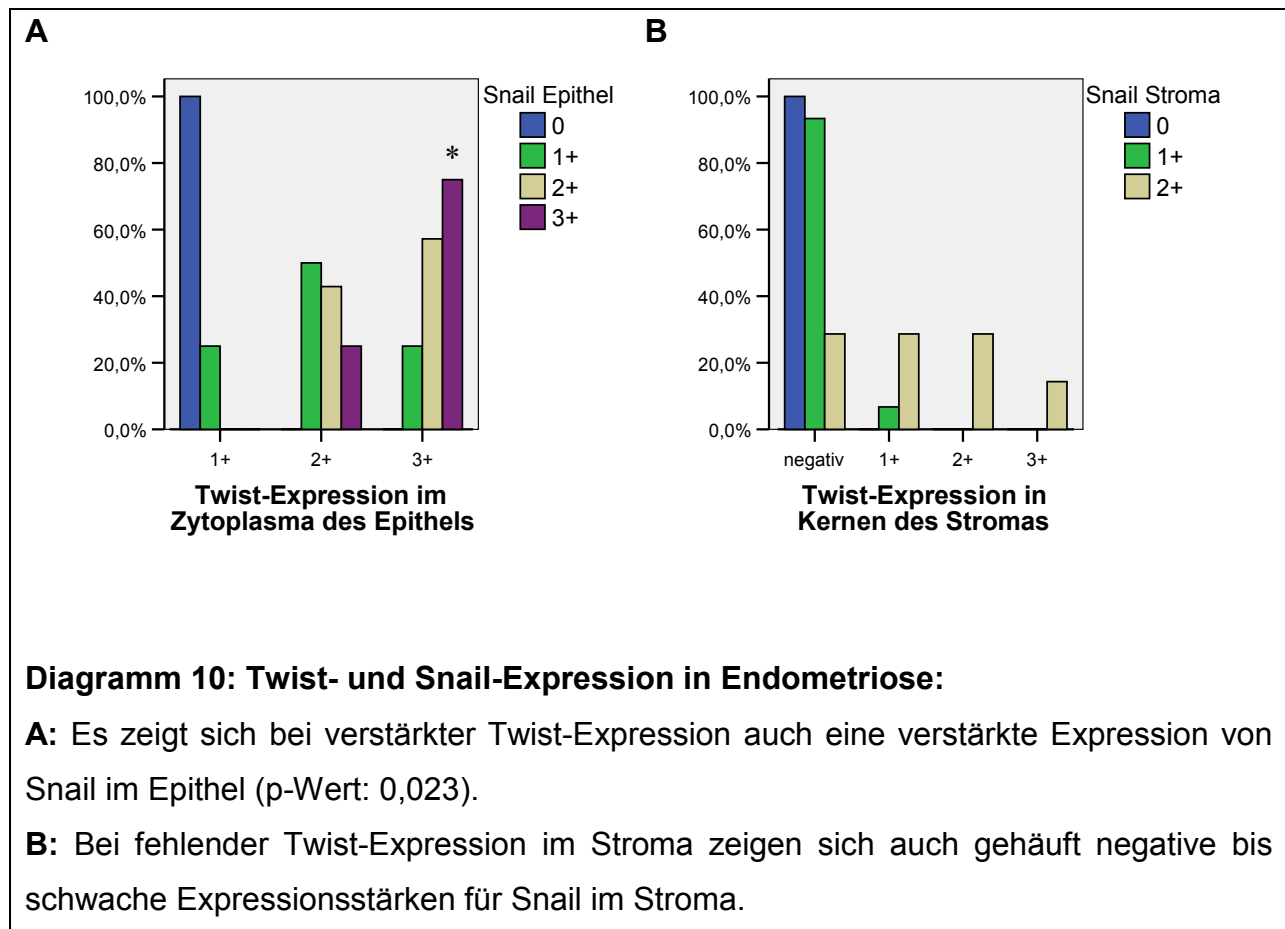
#### *Twist- und E-cadherin-Expression:*

Es stellte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Twist und E-cadherin dar, jedoch zeigte sich, dass eine schwache Twist-Expression nur in Proben mit starker E-cadherin-Expression zu finden war.

#### *Twist- und Snail-Expression:*

Zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren zeigte sich eine positive Korrelation: Die 12 Proben mit einer starken Twist-Expression im Zytoplasma der Epithelzellen zeigten

in 11 Proben eine moderate bis starke Anfärbung für Snail im Epithel. Die Proben mit schwacher Twist-Expression wiesen ebenfalls eine negative bis schwache Expression von Snail auf (p-Wert: 0,023). Weiterhin zeigen sich bei den 17 Proben mit fehlender Twist-Expression in stromalen Kernen ebenfalls bei 15 Proben keine bis schwache Snail-Expression im Stroma, dies erreichte jedoch keine Signifikanz (p-Wert: 0,073).



#### *Twist- und Slug-Expression:*

Es stellte sich keine Korrelation der beiden Faktoren dar.

#### *Snail- und Slug-Expression:*

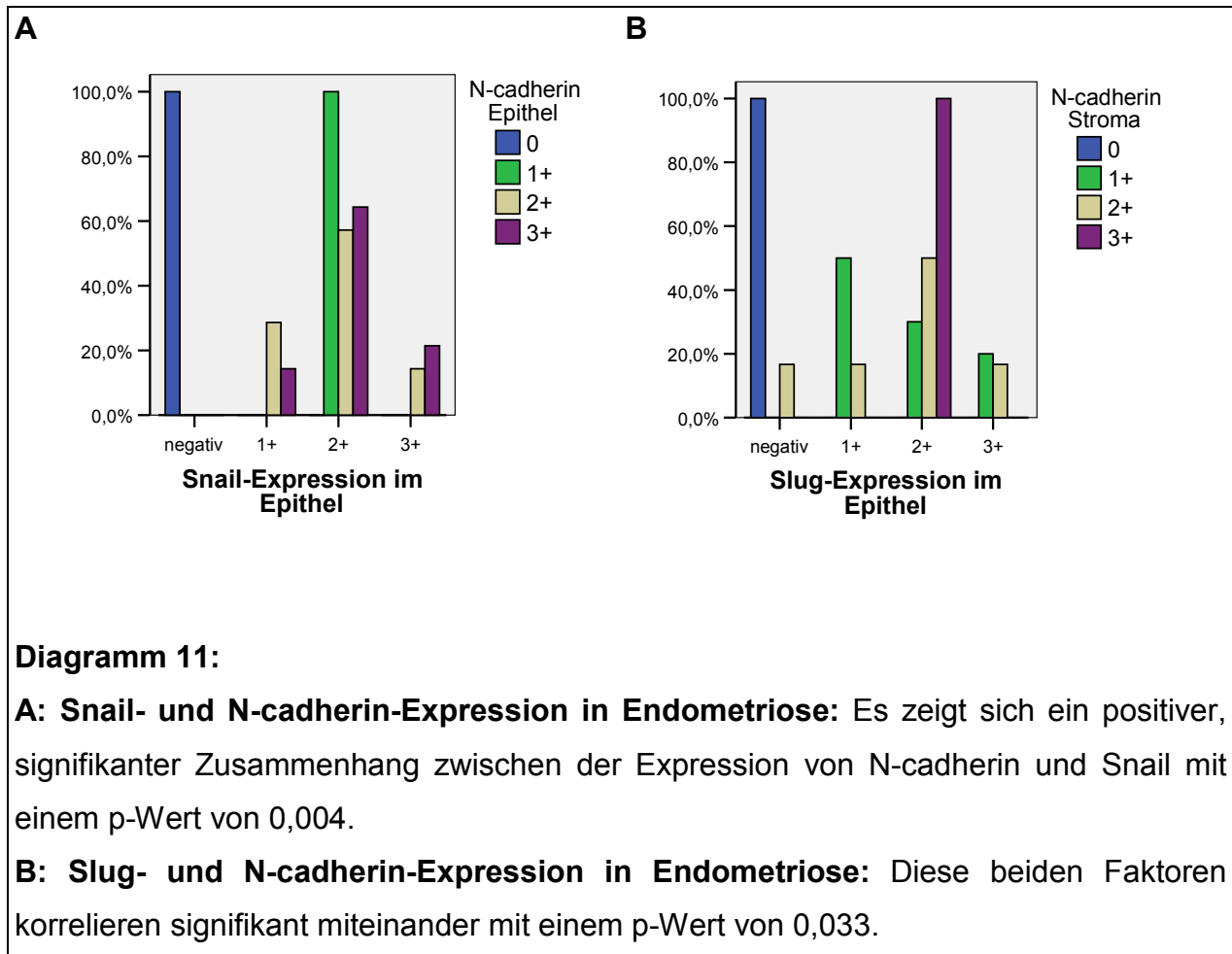
Es konnte keine signifikante Korrelation der beiden Faktoren gefunden werden.

#### *Snail- und E-cadherin-Expression:*

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Snail und E-cadherin in den untersuchten Endometrioseherden.

**Slug- und E-cadherin-Expression:**

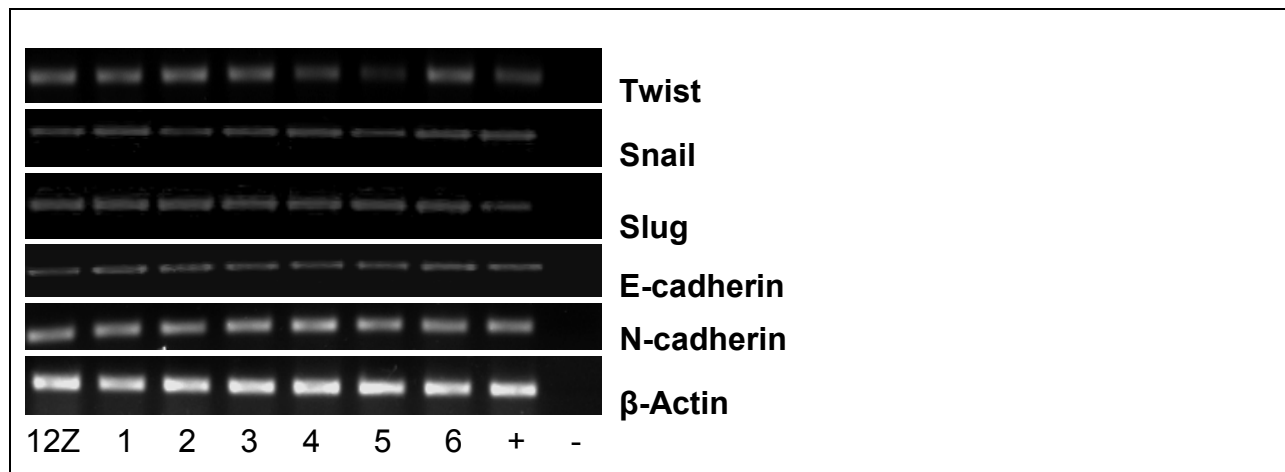
Bei der Expression von Slug und E-cadherin ließ sich keine Korrelation der Faktoren in der Endometriose feststellen.



### 3.5 Ergebnisse der RT-PCR

#### 3.5.1 Ergebnisse der RT-PCR von Endometrioseprimärzelllinien

In allen Proben der Endometrioseprimärzelllinien konnte mittels der RT-PCR die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug sowie die Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde die Endometriumkarzinomzelllinie Kle verwendet.  $\beta$ -Actin diente als interner Standard für die zu untersuchenden Gene (Abb. 16).



**Abb. 16:** PCR der EMT-Faktoren von Endometrioseprimärzelllinien

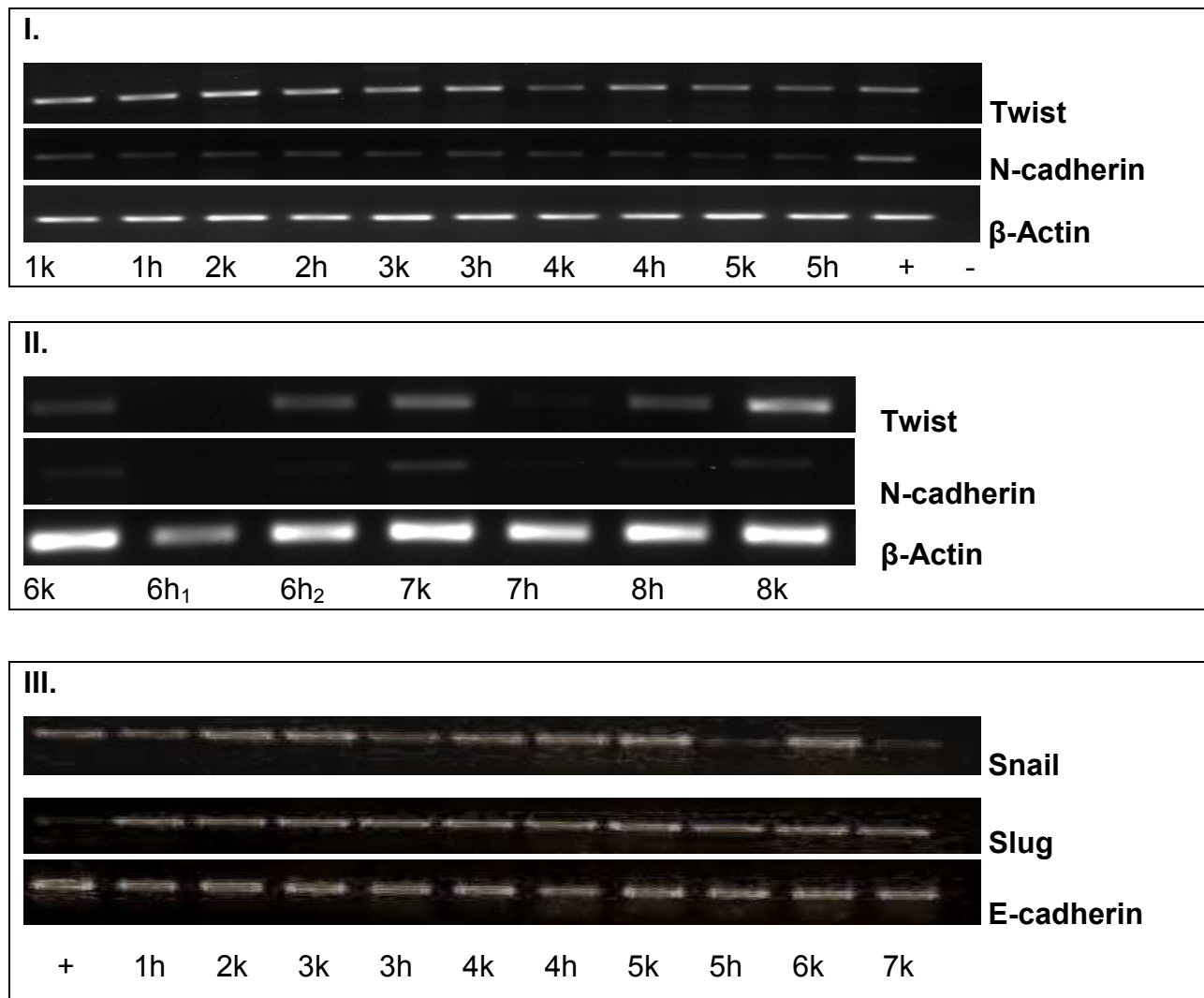
Legende:

- |                                |                                       |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1: rektovaginaler Endometriose | +: Endometriumkarzinom-Zelllinie Kle  |
| 2: rektovaginaler Endometriose | -: Negativkontrolle: H <sub>2</sub> O |
| 3: ovarielle Endometriose      |                                       |
| 4: peritonealer Endometriose   |                                       |
| 5: rektovaginaler Endometriose |                                       |
| 6: ovarielle Endometriose      |                                       |

### 3.5.2 Ergebnisse der RT-PCR von Endometriosegewebe und Endometrium

Bei folgenden in Abb. 17 dargestellten RT-PCRs wurden Endometriosegewebeproben und auch Endometrium von 8 Patientinnen auf die Expression von Twist, Snail, Slug und von den Adhäsionsmolekülen E- und N-cadherin untersucht. Dabei konnten Twist und N-cadherin mit einer Ausnahme (siehe Probe 6h<sub>1</sub> in Abb. 17 II.) sowohl in allen Proben des Endometriosegewebes als auch im Endometrium der an Endometriose erkrankten Frauen selbst nachgewiesen werden. Die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug und das Adhäsionsmolekül E-cadherin ließen sich in allen untersuchten Proben nachweisen (siehe Abb. 17 III.).

Es ließ sich kein deutlicher Unterschied in der Expressionsstärke zwischen den Endometriosegewebeproben und den Endometriumgewebeproben feststellen. In Abb. 17 II. zeigte sich bei verminderter Twist-Expression auch eine verminderte N-cadherin-Expression in 2 Proben.



**Abb. 17:** PCR der EMT-Faktoren von Endometriose- und Endometriumproben

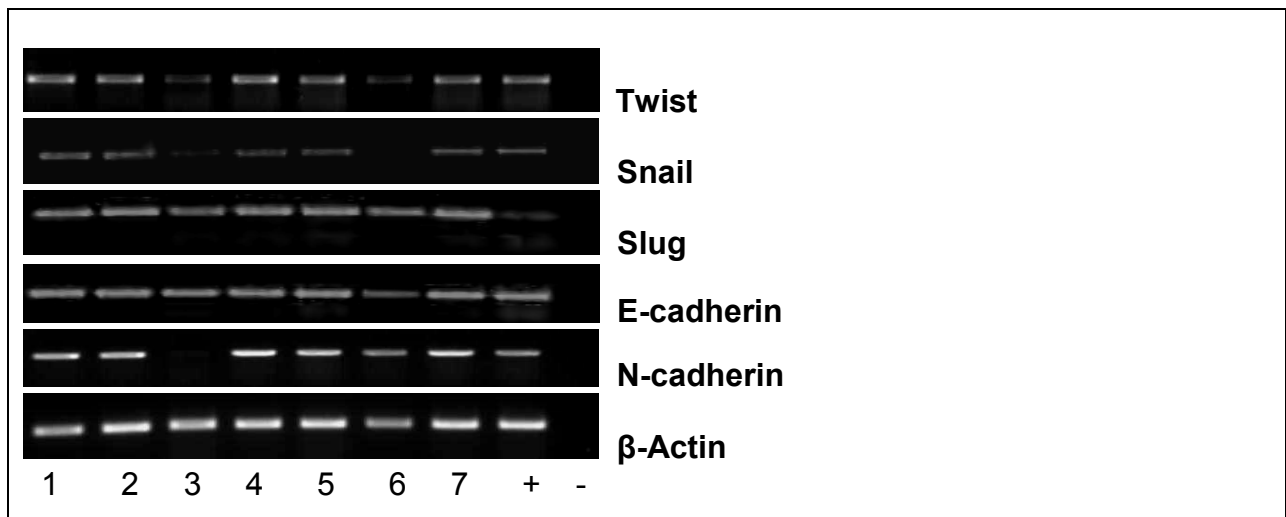
Legende:

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1: peritoneale Endometriose | 6: 1) peritoneale, 2) ovarielle Endometriose |
| 2: Adenomyosis uteri        | 7: rektovaginale Endometriose                |
| 3: ovarielle Endometriose   | 8: rektovaginale Endometriose                |
| 4: ovarielle Endometriose   | +: Endometriumkarzinomzelllinie Kle          |
| 5: ovarielle Endometriose   | - : Negativkontrolle: H <sub>2</sub> O       |
| h: Endometrioseherd         | k: dazugehörige Kürette/Endometrium          |

Bei der in Abb. 18 dargestellten PCR wurde Endometrium von Endometriosepatientinnen und von Patientinnen mit Uterus myomatosus zur Darstellung der Twist-, Snail-, Slug-, E- und N-cadherin-Expression untersucht.

Twist und Slug konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Snail hingegen konnte in allen Proben außer Probe 6 nachgewiesen werden. E-cadherin konnte ebenfalls in allen Proben dargestellt werden, N-cadherin zeigte sich in 6 Proben. Es stellte sich kein deutlicher Unterschied in der Expression der Faktoren bei den untersuchten Endometriumgruppen. Alle Faktoren werden sowohl im Endometrium von Endometriosepatientinnen als auch im Endometrium von Patientinnen mit Uterus myomatosus exprimiert.

Bei fehlender bzw. schwacher Expression von Twist und Snail zeigte sich ebenfalls eine schwächere Expression von N-cadherin (siehe Abb. 18: Probe 3 und 6). Weiterhin zeigte sich bei schwacher Expression von Twist eine schwache bis fehlende Expression von Snail (siehe Abb. 18: Proben 3 und 6).



**Abb. 18:** PCR der EMT-Faktoren von Endometrium von Patientinnen mit Endometriose und von Patientinnen mit Uterus myomatosus

Legende:

- 1-3: Endometrium von Patientinnen mit Endometriose
- 4-7: Endometrium von Patientinnen mit Uterus myomatosus
- +: Positivkontrolle: Endometriumkarzinomzelllinie Kle
- : Negativkontrolle: H<sub>2</sub>O



## 4. Diskussion

Die Potenz der Endometriosezellen zur Angiogenese und zum invasiven Wachstum konnte bereits in mehreren Studien dargestellt werden und charakterisiert diese Erkrankung. So teilt die Endometriose als benigne Erkrankung Wachstumseigenschaften wie wir sie auch bei malignen Krankheiten beobachten können. Die Mechanismen der Pathogenese dieser sehr häufigen Erkrankung in der Frauenheilkunde sind weitestgehend unbekannt. In dieser Studie wurde sowohl die Neoangiogenese, als auch das invasive Wachstumsverhalten der Endometriose betrachtet und verschiedene Faktoren auf ihre Beteiligung an der Entstehung und dem Fortbestand der Endometriose genauer untersucht, um dadurch ein besseres Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung zu erlangen. Wenn durch retrograde Menstruation Endometrium in die Bauchhöhle gelangt, so muss dieses am Mesothel anhaften können und durch Angiogenese wird die weitere Implantation, sowie das Wachstum der Endometriose gewährleistet [107]. Diese Mechanismen bilden Grundvoraussetzungen für die Entwicklung einer Endometriose, allerdings sind die genauen Vorgänge noch weitestgehend unerforscht. Durch das bessere Verständnis der Grundlagen der Entstehung und Progredienz der Endometriose eröffnen sich möglicherweise neue und verbesserte Therapieoptionen.

Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte die Expression von COX-2 und VEGF-A in allen drei Formen der Endometriose in deren zellspezifischen Expressionsmustern dargestellt werden. Mittels Western Blot-Analyse konnte die Expression von COX-2 in allen 7 Endometrioseprimärzellkulturen bestätigt werden.

Die Expression von COX-2 wurde in 72 Proben von peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden untersucht. Diese zeigte sich im Epithel deutlich stärker als im Stroma. Im Epithel war die COX-2-Expression in 91,2 %, 90,5 % und 100 % in peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Herden positiv. Im Vergleich dazu zeigte sich im Stroma eine schwächere COX-2-Expression mit niedrigeren positiven Raten von 58,8 %, 28,6 % und 82,3 % für peritoneale, ovarielle und rektovaginale Endometrioseherde. Der Nachweis von COX-2-Expression in Endometriose passt zu früheren Studien, die deutlich erhöhte Prostaglandinkonzentrationen in der Peritonealflüssigkeit bei Frauen mit Endometriose und in Endometrioseläsionen selbst

feststellen konnten [79, 133]. Ähnliche Ergebnisse konnten in Studien über die COX-2-Expression in ovariellen Endometrioseherden dargestellt werden [80-82]. Allerdings beschrieb *Fagotti et al.* eine wesentlich geringe Expression von COX-2 im Epithel von peritonealen und rektovaginalen Endometrioseläsionen mit 11,1 % und 13,3 % [82] im Vergleich zu 91,2 % und 100 % in unserer Studie. In unserer Studie zeigte sich eine deutlich stärkere COX-2-Expression in rektovaginalen Endometrioseherden als in peritonealen und ovariellen Herden. Die durch eine erhöhte COX-2-Expression gesteigerte Prostaglandinsynthese v.a. von PGE<sub>2</sub> fördert die Migration und das invasive Wachstum sowie das Überleben der Endometriosezellen [134]. Die starke COX-2-Expression in rektovaginalen Endometrioseherden stellt eine mögliche Erklärung für das meist sehr aggressive, infiltrative Wachstumsverhalten dieser Form der Endometriose dar. Ebenfalls gilt PGE<sub>2</sub> als potenter Stimulator der Aromatase in Stromazellen der Endometriose und fördert damit den Fortbestand und das Wachstum der Endometriose [135].

Die VEGF-Expression wurde an 80 Endometrioseproben mittels Immunhistochemie untersucht. Bei der Bewertung wurde im Stroma und Epithel die zytoplasmatische und die Kernfärbung getrennt beurteilt. Im Epithel zeigte sich in 96,3 % im Zytoplasma und in 52,6 % in den Kernen eine VEGF-Expression. Im Stroma lag in 85,1 % im Zytoplasma und in 43,8 % in den Kernen eine VEGF-Expression vor. Vergleicht man die VEGF-Expression in den verschiedenen Formen der Endometriose, zeigt sich v.a. eine sehr starke VEGF-Expression im Zytoplasma der Epithel- und Stromazellen in ovariellen Herden (siehe Tab. 7). Auffällig ist die fehlende Expression von VEGF in Kernen des Stromas und des Epithels in rektovaginalen Endometrioseproben. Die VEGF-Expression zeigt sich stärker und häufiger in Epithelzellen als in Stromazellen. *Ceyhan et al.* beschrieb ebenfalls eine VEGF-Expression in ovariellen Endometrioseherden, jedoch zeigte sich dort eine stärkere Expression im Stroma als im Epithel [136], die sich hier nicht darstellen ließ. *Donnez et al.* beschrieb eine VEGF-Expression in peritonealen Herden. Er konnte darstellen, dass die Expression verstärkt in roten aktiven im Vergleich zu schwarzen Herden vorliegt. Ebenfalls zeigte sich in der Studie eine erhöhte VEGF-Expression im Endometrium von Frauen mit Endometriose in der späten sekretorischen Zyklusphase. Dies unterstützt die Annahme, dass das Endometrium selbst eine wichtige Rolle in der Histogenese der Endometriose spielt [107]. Eine starke VEGF-Expression wurde auch im menstruiierenden Endometrium

nachgewiesen [137]. Dies könnte die Implantationsfähigkeit der Endometriosezellen begünstigen. In anderen Studien konnten Angiogenesefaktoren und VEGF [106] verstärkt bei Frauen mit Endometriose in der peritonealen Flüssigkeit nachgewiesen werden. Eine Ursache könnte die VEGF-Sekretion durch Epithel- und Stromazellen der Endometriose sein. Die Expression von VEGF im Zytoplasma der Epithel- und Stromazellen steht signifikant im Zusammenhang miteinander, ebenfalls ließ sich eine signifikante Assoziation zwischen der Expression in den Kernen im Epithel und Stroma feststellen.

*Williams et al.* demonstrierte, dass Tumorwachstum abhängig von COX-2 ist und COX-2 die Gefäßversorgung im Tumor mit reguliert [110]. COX-2 scheint wesentlich an der Angiogenese in Tumoren beteiligt zu sein. In unserer Studie konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von VEGF und COX-2 darstellen. Dies deutet darauf hin, dass beide Faktoren eine Rolle in der Angiogenese der Endometriose spielen und sich möglicherweise gegenseitig regulieren. Dieses Ergebnis unterstützt die Aussage, dass der potentielle Mechanismus von COX-2 in der Entwicklung und dem Wachstum der Endometriose dessen angiogenetischer Effekt ist. Eine Korrelation dieser beiden Faktoren wurde ebenfalls in einer anderen Studie bei ovarieller Endometriose nachgewiesen. Die VEGF-Expression stellte sich dort hauptsächlich im Stroma dar, hingegen die COX-2-Expression v.a. verstärkt im Epithel. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von unserem: die COX-2- und VEGF-Expression sind im Epithel der Endometrioseherde stärker als im Stroma. Ebenfalls konnte in der Studie die Gefäßdichte mit der VEGF- und COX-2-Expression korreliert werden, was deutlich macht, welchen Stellenwert diese beiden Faktoren für die Angiogenese in der Endometriose möglicherweise haben [136]. Anhand von exemplarisch angefertigten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von vWF und SMA konnten wir zeigen, dass sich in unmittelbarer Nähe der Endometrioseläsionen unreife Gefäße finden lassen. Dies weist auf eine angiogenetische Potenz der Endometriose hin, die ebenfalls durch die COX-2 beeinflusst zu sein scheint. Diese Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass die COX-2 ähnlich wie in Tumorzellen an der Angiogenese der Endometriose beteiligt ist. Die Endometriosezellen fördern durch die Expression von Faktoren wie COX-2 und VEGF die Generierung von neuen Gefäßen zur besseren Versorgung und damit den Fortbestand sowie das Wachstum.

In den Epithelzellen der peritonealen Endometrioseläsionen wurde eine Zyklusabhängigkeit mit einer signifikant höheren COX-2-Expression während der sekretorischen Phase festgestellt (p-Wert: 0,042). Dies spiegelt partiell die Zyklusabhängigkeit der COX-2-Expression in eutopem Endometrium wider, hier steigt die Expression während der sekretorischen Phase und hat ihren Höhepunkt in der menstruellen Phase [80, 138]. Wir konnten wie *Ota et al.* keine Zyklusabhängigkeit für die COX-2-Expression in ovariellen Läsionen feststellen [80]. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Zyklizität der ovariellen Endometriose bietet das Vorhandensein eines komplett anderen Milieus in den Ovarien mit sehr hohen Steroidkonzentrationen. In den rektovaginalen Endometrioseherden konnte ebenfalls keine Zyklusabhängigkeit der COX-2-Expression festgestellt werden.

Die VEGF-Expression in den Endometrioseproben zeigte keinen Zusammenhang mit der Zyklusphase der Patientinnen.

Es konnten keine Unterschiede der Expression von COX-2 und VEGF bei Frauen mit und ohne hormonelle Behandlung gefunden werden. Dies kann unterschiedliche Gründe haben: Es bestehen unter Umständen unterschiedliche regulatorische Mechanismen der Steroidrezeptoren bzw. inaktive Rezeptoren in der Endometriose. So lässt sich die Progesteronresistenz durch die reduzierte Anzahl an Progesteronrezeptoren in Endometrioseläsionen erklären. Weiterhin konnte *Attia et al.* zeigen, dass der inhibierende Progesteronrezeptor PR-A, aber nicht die stimulierende Isoform PR-B in Endometrioseläsionen vorhanden ist. Dies könnte die Progesteronresistenz in der Endometriose zusätzlich erklären [139]. Möglicherweise besteht durch die starke lokale Östrogenproduktion innerhalb der Endometriose eine erhöhte Resistenz für zirkulierende Hormone. Im Endometrium zeigt Progesteron eine antiöstrogene Wirkung durch die Induktion von 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD) 2, welches das biologisch potente Östradiol in das schwächere Östron katalysiert. Dieses Enzym fehlt in den Endometriosezellen, sodass Östrogen nicht inaktiviert wird und zusammen mit einer verstärkten Aromataseaktivität für die erhöhten Östrogenkonzentrationen in der Endometriose verantwortlich sind und damit die Endometriose erhält. Die Aromatase wird stimuliert durch PGE<sub>2</sub>, welches seinerseits durch einen positiven Feedback-Mechanismus wieder durch Östrogene stimuliert wird. Dies bedeutet, dass die lokale Östrogenproduktion durch die COX-2-Expression reguliert wird [78]. Obwohl die hormonelle Behandlung der Endometriose effektiv die

Schmerzen reduziert und das Rezidivrisiko senken, kann diese bei den meisten Patienten aber nicht das Wiederauftreten und die Progression dieser Erkrankung verhindern [140]. Deshalb ist ein genaueres Verständnis der Pathogenese auch unbedingt erforderlich, um diese Erkrankung besser zu behandeln.

Entgegen unseren Erwartungen konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von COX-2 und VEGF im Epithel und der Stadieneinteilung festgestellt werden. Aufgrund der vielen durch COX-2 kontrollierten Zellfunktionen wurde eine verstärkte COX-2-Expression in höheren Stadien vermutet. Im Zytoplasma des Stroma zeigte sich allerdings eine erhöhte VEGF-Expression in rASRM-Stadium III und IV. Für COX-2 zeigte sich aber im Stroma eine negative Korrelation mit den Stadien; so war in niedrigeren Stadien (I und II) eine stärkere COX-2-Expression zu sehen.

Die Klassifikation der Endometriose, welche in dieser Studie verwendet wurde, basiert auf der zurzeit gängigen Klassifikation nach rASRM [11]. Diese Einteilung erfasst allerdings das Gesamtbild der Endometriose schlecht, so wird z.B. der infiltrative Charakter der Endometriose nicht mit einbezogen. Es muss in Betracht gezogen werden, dass diese Ergebnisse die Defizite der verwendeten Klassifikation zur Stadieneinteilung der Endometriose widerspiegeln.

Im Gegensatz zu anderen Studien konnte in dieser Studie überraschenderweise kein Zusammenhang von COX-2 und VEGF mit den Aktivitätsgraden der peritonealen Endometriose hergestellt werden. Für die peritoneale Endometriose ist die Transplantationstheorie nach *Sampson* weitestgehend akzeptiert, die peritonealen Herde sind das Ergebnis der Implantation von durch retrograde Menstruation in den Bauchraum gelangender Endometriumfragmente [13]. Entscheidend für die Entwicklung einer Endometriose sind das erfolgreiche Anheften an das Mesothel, die Invasion der endometrialen Zellen und das Etablieren der Gefäßversorgung. Die unterschiedlichen Aspekte der peritonealen Endometrioseherde - rot, schwarz und weiß - repräsentieren wahrscheinlich die verschiedenen Entwicklungsschritte in der Evolution der Endometriose. In früheren Studien wurden eine verstärkte Vaskularisation und eine erhöhte mitotische Aktivität in roten Läsionen im Gegensatz zu schwarzen und weißen Herden festgestellt. Dies stellt möglicherweise den ersten Schritt der frühen Implantation der endometrialen Zellen dar und bildet somit die erste Stufe der Endometriose. Eine geringere Gefäßversorgung und reduzierte bis fehlende mitotische Aktivität in weißen Herden im Vergleich mit roten Herden lässt vermuten, dass sich

diese Läsionen im Ruhezustand befinden [141, 142]. Eine starke Expression von COX-2 in roten peritonealen Läsionen würde eine wichtige Rolle der COX-2 in der Invasion und Angiogenese der frühen Entwicklungsphase der Endometriose vermuten lassen. Dies konnten wir in unserer Untersuchung entgegen der Erwartung nicht darstellen.

Die hohe Expression von COX-2 in Endometriose weist dennoch auf eine möglich wichtige Rolle der COX-2 in der Invasivität und der Angiogenese dieser Erkrankung hin. Die Ergebnisse dieser Studie stellen den ersten Beweis für eine Korrelation zwischen COX-2 und VEGF in allen drei Formen der Endometriose dar und deuten darauf hin, dass COX-2 an der Neoangiogenese und damit an der Entstehung und Progredienz der Endometriose beteiligt ist. Sowohl COX-2 als auch VEGF stellen Angriffspunkte für die therapeutische Intervention bei Endometriose dar. Durch den fehlenden Einfluss der hormonellen Therapeutika auf COX-2- und VEGF-Expression in unserer Studie, lässt sich mutmaßen, dass selektive COX-2-Inhibitoren, aber auch VEGF-Inhibitoren eine zusätzlich spezifische Therapie der Endometriose bieten. Bereits mehrere Studien zeigten gute Erfolgsaussichten bei der Verwendung dieser Medikamente.

Die gesteigerte Proliferation von ektopen Zellen scheint eine Voraussetzung für ihr Fortbestehen darzustellen, jedoch wird die Proliferation in Endometrioseherde in Studien unterschiedlich beschrieben. Verschiedene Autoren haben eine erhöhte Proliferationsrate im Endometrium von Endometriosepatientinnen [143] und Endometriose [144] darstellen können. Andere Studien zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. *Jones et al.* fand eine reduzierte Proliferationsrate in Endometriose [145] und *Nisolle et al.* konnte keine Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Endometrium und Endometriose feststellen [146].

Zur Darstellung der Proliferationsrate in Endometriose wurde in unserer Studie Ki-67 als Marker verwendet. Ki-67 ist ein Kernprotein, welches während der später G1-, S-, M- und G2-Phase des Zellzykluses exprimiert wird. Wir konnten einen Mittelwert von 17,61 % in den Epithelien und 6,4 % in den Stromazellen in Endometriose darstellen. Diese Raten wirken im Vergleich mit in anderen Studien festgestellten höheren Werten in Endometrium sehr gering. *Scotti et al.* konnte eine durchschnittliche Proliferationsrate von 38% in Epithelzellen von Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose dargestellt, jedoch eine signifikant schwächere Proliferation in epithelialen Endometriosezellen nachweisen. 18 von 24 Proben waren dabei negativ und die 6 positiven zeigten eine durchschnittliche Proliferationsrate von nur 1,2 %. Im Stroma der

Endometriumproben von Frauen mit und ohne Endometriose zeigte sich bei *Scotti et al.* eine Proliferation im Durchschnitt von 10 % und im Endometriosestroma lag keine Ki-67-Expression vor [126].

Unsere Ergebnisse zeigen geringfügig höhere Proliferationsraten für die Endometriose, jedoch bleiben diese ebenfalls sehr gering.

Ähnlich wie bei *Scotti et al.* konnte keine gesteigerte, sondern eher eine erniedrigte Proliferationsrate nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stützen nicht die Vermutung, dass eine erhöhte Proliferationsaktivität an der Pathogenese der Endometriose beteiligt ist. Möglicherweise besitzt die Endometriose einen mehr invasiven als proliferativen Charakter. Es zeigten sich in unserer Studie keine Zusammenhänge zwischen der Ki-67-Expression und der Expression von COX-2 in Endometriose, wie es sich in Karzinomzellen darstellen ließ. Dort scheint die COX-2 ebenfalls an der Proliferationssteigerung von Karzinomzellen beteiligt zu sein. Ebenfalls zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Ki-67 und VEGF, sowie mit den Aktivitätsgraden der peritonealen Endometriose.

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Endometriosezellen nicht hyperproliferativ sind. Ebenfalls scheint die COX-2 in Endometriose nicht wie in Tumorzellen an der Proliferation beteiligt zu sein.

Die ektopen Endometriumfragmente benötigen invasive Eigenschaften, um einen stabilen Kontakt mit ihrer Umgebung herzustellen. Die Endometriose kann trotz ihrer Benignität invasiv wachsen und zeigt metastatische Potenz. Es ist unklar, warum einige Endometriosezellen invasiv wachsen und es sogar zu lymphogenen Streuung kommen kann, wie kürzlich dargestellt werden konnte [147, 157]. Aber vielleicht ist die geringe proliferative Potenz bei gegebener invasiver Potenz gerade ein Mechanismus, der Endometriose zu einer benignen und eben nicht malignen Erkrankung macht.

Die EMT definiert einen Entwicklungsprozess, in dem stationäre polarisierte Epithelzellen sich in motile mesenchymale Zellen verwandeln. Dieser Prozess wurde erstmals 1982 von *Greenburg und Hay* [148] beobachtet und es besteht Einigkeit, dass dieses zelluläre Programm großen Stellenwert in der Morphogenese während der Embryogenese besitzt. Später konnte die EMT als potentieller Mechanismus für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms aus einem soliden Tumor im frühen Stadium verantwortlich gemacht werden. Die Streuung von Zellen, sowohl in der Embryogenese,

als auch bei Karzinomen, beruht auf zwei wesentlichen Schritten: das Auflösen des Zell-Zell-Kontaktes durch Verlust der interzellulären Verbindungen und die Fähigkeit zur Motilität. Dies ermöglicht es einzelnen Zellen die Basalmembran zu durchbrechen, invasiv zu wachsen und durch Intra- und Extravasation Metastasen zu bilden. An diesem Prozess sind Transkriptionsfaktoren wie Twist, Snail und Slug sowie die Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin beteiligt. In der Annahme, dass die EMT auch in der Endometriose eine Rolle in der Entstehung und Progredienz spielt, wurden Endometrioseherde und Endometrium erstmals mittels Immunhistochemie und RT-PCR auf die an der EMT beteiligten Faktoren wie Twist, Snail, Slug, E- und N-cadherin untersucht.

In der vorliegenden Studie konnten wir Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin sowie von Twist in Endometrioseläsionen und Endometrium feststellen: Es zeigte sich eine stärkerer Twist-Expression in den Endometrioseproben als im Endometrium sowohl in den Epithel als auch in den Stromazellen. N-cadherin ist deutlich stärker in Endometriosestromazellen vorhanden als im Stroma des Endometriums. Im Epithel zeigten E-cadherin und N-cadherin ähnliche starke Expressionsmuster in den beiden untersuchten Geweben.

Es wurde postuliert, dass in der Endometriose, ähnlich wie in Tumorzellen, die E-cadherin-Herunterregulierung möglicherweise einen Mechanismus darstellt, welcher es den Endometriumzellen erlaubt, sich aus ihrem Verband zu lösen und wie in *Sampson's* Transplantationstheorie beschrieben an anderen Stellen anzuheften, invasiv zu wachsen und Endometrioseherde zu bilden. Diese Hypothese wird unterstützt durch einige Studien, welche eine signifikante Downregulation von E-cadherin in Endometriosezellen im Vergleich zu Endometrium feststellen konnten [123, 127]. Eine Studie konnte eine geringere Expression von E-cadherin und zusätzlich vereinzelt E-cadherin-negative Zellen in der sonst positiven Endometriosedrüse zeigen. Dabei konnte mittels eines Kollagen-Invasionsassays dargestellt werden, dass einige Endometriosezellen eine starke invasive Kapazität besitzen, welche mit der von malignen Tumorzellen vergleichbar ist. Diese Zellen waren für E-cadherin negativ [125]. In unserer Studie konnte wie bereits oben erwähnt keine generelle Downregulation von E-cadherin in Endometrioseherden festgestellt werden, aber wir konnten ebenfalls vereinzelt E-cadherin-negativen Zellen in den E-cadherin-positiven Drüsen



nachweisen. Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von anderen Autoren überein, welche eine sehr moderate oder eine fehlende Differenz zwischen der E-cadherin-Expression in Endometriose und Endometrium darstellen konnten [128, 129]. Möglicherweise ist der Verlust von E-cadherin nicht an der Pathogenese der Endometriose beteiligt [128].

Die Anwesenheit von E-cadherin alleine impliziert jedoch nicht, dass dieses seine Funktion vollständig entfalten kann. Der Funktionsverlust ist ein Charakteristikum der EMT, dies geschieht durch Mutation des  $\beta$ -Catenin-Gens, sowie durch veränderte Phosphorylierung der Tyrosine des Cadherin-Catenin-Komplexes [116].  $\beta$ -Catenin verbindet die zyttoplasmatische Domäne von E-cadherin über weitere Adapterproteine an Aktinfilamente und ist somit am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Neben der strukturellen Rolle von  $\beta$ -Catenin in der Zelle, reguliert dieses die Adhäsionsfunktion der Cadherine. Freies zytosolisches  $\beta$ -Catenin kann im Kern die Transkription über LEF/TCF (lymphoid enhancer binding factor/ T-cell specific factor) aktivieren. Es gibt Hinweise, dass die EMT-Transkriptionsfaktoren Twist und Slug über diese von  $\beta$ -Catenin vermittelte Transkription reguliert werden [149, 150]. Die Datenlage zur Expression von  $\beta$ -Catenin in Endometriose ist unzureichend und widersprüchlich. So konnte in Studien eine Reduktion des gesamten E-cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplexes in Endometrioseläsionen festgestellt werden [126, 129]. *Shaco Levy et al.* konnte eine alleinige Reduktion von  $\beta$ -Catenin ohne zusätzliche Reduktion von E-cadherin in Endometriose feststellen [151]. Der Funktionsverlust des Adhäsionsmoleküls E-cadherin kann eine Folge von Genpolymorphismen sein und in einer Studie von *Shan et al.* konnte gezeigt werden, dass bestimmte E-cadherin-Genpolymorphismen in Zusammenhang mit dem Risiko einer Erkrankung an Endometriose stehen [152]. Wahrscheinlich ist der Verlust von E-cadherin kein generelles und zuverlässiges Merkmal der Endometriose. Dies spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen wieder, so zeigten sich ähnliche Ergebnisse der E-cadherin-Expression in den drei Formen der Endometriose, ebenso zeigten sich keine Zusammenhänge der Expression mit dem Stadium der Erkrankung. Unsere Ergebnisse unterstreichen, dass E-cadherin nicht als Marker für Dedifferenzierung und invasives Wachstumsverhalten von Endometriosezellen dienen kann. Ausgeschlossen ist damit jedoch nicht die Möglichkeit, dass E-cadherin in früher Entwicklungsstufen der Endometriose herunterreguliert ist.

N-cadherin, als mesenchymaler Marker, ist wichtig für die Migration von Zellen während der Embryogenese, aber auch in pathophysiologischen Prozessen, z.B. in der Karzinogenese. *Niemann et al.* konnte in Mammakarzinomzellen nachweisen, dass N-cadherin die Motilität dieser Zellen induzieren kann, auch wenn diese stark E-cadherin positiv waren. Die Herunterregulierung von E-cadherin korreliert nicht zwangsläufig mit invasivem Wachstum und metastatischer Potenz, jedoch zeigen Zellen mit N-cadherin-Expression einen invasiven Charakter. Dies impliziert, dass N-cadherin sich in diesem Zusammenhang dominant über E-cadherin darstellt und es kann postuliert werden, dass sich die Cadherine in verschiedenen Zellen unterschiedlich verhalten [153]. *Hazan et al.* konnte bestätigen, dass der metastasierende Effekt von N-cadherin dominant über der tumorsuppressiven Funktion von E-cadherin ist: Gut differenzierte E-cadherin positive MCF-7 Mammakarzinomzellen bekamen durch exogene Expression von N-cadherin mittels Transfektion einen invasiven und metastatischen Charakter [154].

In dieser vorliegenden Studie konnten wir eine moderate bis starke N-cadherin-Expression in Epithelzellen aller untersuchten Endometrioseherde und Endometriumproben nachweisen. In den Stromazellen der Endometrioseläsionen lag eine höhere Anzahl von N-cadherin-positiven Zellen im Vergleich mit den Endometriumproben vor, mit 81.5% versus 76.5%. Weiterhin zeigte sich eine deutlich intensivere N-cadherin-Expression in den Stromazellen der Endometrioseherde (p-Wert: 0,017). Interessanterweise konnten wir eine inverse Korrelation zwischen den beiden Adhäsionsmolekülen E- und N-cadherin in Endometriose feststellen (p-Wert: 0,02). In Karzinomzellen gilt dieser Switch von E-cadherin zu N-cadherin als Merkmal der EMT. Die inverse Korrelation der beiden Adhäsionsmoleküle weist möglicherweise auf eine Interaktion der beiden Moleküle in der Endometriose hin, auch wenn wir wie oben erwähnt in unserer Studie keine Herunterregulierung der E-cadherin-Expression in Endometriose nachweisen könnten. *Rosivatz et al.* konnten in Kolonkarzinomzellen ebenfalls keine Herunterregulation von E-cadherin bei gleichzeitiger Expression von N-cadherin nachweisen. In diesen Zellen konnte die Transkriptionsfaktoren der EMT Twist, Snail 1 und Sip 1 nicht dargestellt werden, sodass dort postuliert wurde, dass bei einer Co-Expression von E- und N-cadherin diese nicht auf transkriptionalem Wege reguliert werden [155]. Auch hier erscheint N-cadherin dominant über der Funktion von E-cadherin zu sein, ähnlich wie in Mammakarzinomzellen.

Wir konnten eine signifikante Hochregulierung von Twist in Endometriosezellen, sowohl in Epithel- als auch Stromazellen, im Zytoplasma und Kern im Vergleich mit Endometriumproben nachweisen. Weiterhin konnten wir tendenziell eine stärkere Twist-Expression in Endometrioseherden mit geringerer E-cadherin-Expression feststellen, dies erreichte jedoch keine Signifikanz. Twist wurde anfänglich im Zusammenhang mit seiner Rolle in der Differenzierung des Mesoderms und der Morphogenese in Drosophila-Fliegen identifiziert. Mittlerweile wurde deutlich, dass Twist eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Tumoren spielt. So konnten *Rosivatz et al.* als Erste zeigen, dass eine Twist-Expression mit einer hohen N-cadherin-Expression in diffusen Magenkarzinomzellen einhergeht [156]. Twist ist hochreguliert in verschiedenen Karzinomen, so z.B. in Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinomen. Die Gruppe um Prof. Weinberg konnte im Mausmodell zeigen, dass Twist für die Intravasation und Metastasierung von Mammakarzinomzellen verantwortlich ist. Die exogene Induktion von Twist führte durch Verlust von E-cadherin zur Auflösung der Zell-Zell-Adhäsion und Zellmotilität, also Merkmale, die typisch für den Prozess der EMT sind. Die exogene Induktion von E-cadherin kann interessanterweise diesen von Twist angetriebenen Prozess nicht mehr stoppen. Weiterhin konnten diese Autoren darstellen, dass in lobulären Mammakarzinomzellen Twist hochreguliert ist, während über die Hälfte dieser Karzinome E-cadherin-Mutationen aufweisen [116]. Twist, zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, SIP1 und ZEB-1, bewirkt möglicherweise die transkriptionale Repression von E-cadherin vermittelt über E-Box-Elemente in der Promotorregion. Twist ist in Mammakarzinomzellen nach shRNA-vermitteltem E-cadherin-Verlust hochreguliert. Die Twist-Inhibition in diesen E-cadherin-negativen Karzinomzellen führte zu einer signifikanten Reduktion des invasiven und metastatischen Verhaltens der Zellen. Dies lässt vermuten, dass Twist möglicherweise ebenfalls Auswirkungen auf die zelluläre Funktion im Zusammenhang mit dem Verlust von E-cadherin in humanen Mammakarzinomzellen hat.

Die Hochregulation von Twist in den Endometrioseherden im Vergleich zum Endometrium, die Twist-Hochregulation in den Endometrioseläsionen mit geringerer E-cadherin-Expression sowie die starke N-cadherin-Expression in Endometrioseläsionen und die inverse Korrelation mit E-cadherin passen zu den in humanen Karzinomzellen festgestellten Ergebnissen bei Untersuchungen der EMT.

Weiterhin haben wir die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug untersucht, welche als direkte Suppressoren von E-cadherin in Tumorzellen gelten und möglicherweise einen genaueren Aufschluss über die fehlende Herunterregulation von E-cadherin in Endometriose geben können. Snail und Slug können direkt an die E-Box des E-cadherin-Promoters binden und dessen Transkription unterdrücken. Ihre Repressionsfunktion ist unterschiedlich: so scheint die Funktion von Snail verstärkt in der initialen Phase des invasiven Prozesses zu liegen, Slug hingegen scheint für die Erhaltung des malignen Geschehens durch dauerhafte Repression von E-cadherin verantwortlich zu sein.

Snail konnte in 95,7 %, in 22 von 23 Proben, sowohl im Epithel, als auch im Stroma in Endometriose nachgewiesen werden, Slug konnte in 80 % (16/20) in Epithelzellen der Endometriose und zu geringerem Prozentsatz von 40 % (8/20) auch in Stromazellen dargestellt werden. Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Expression von Snail bzw. Slug und der Expression von E-cadherin in Endometriose feststellen.

Die Expression der Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug, sowie die Expression der Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin in Endometriose und Endometrium konnte zusätzlich mittels RT-PCR dargestellt werden. Alle untersuchten Faktoren konnten in den Endometrioseprimärzellen (Abb. 16, 3.5.1) nachgewiesen werden.

In Abb. 17 Bild II (siehe 3.5.2) zeigte sich in 2 Fällen bei einer schwächeren Expression von Twist ebenfalls eine schwächere Bande für N-cadherin in der peritonealen Endometrioseprobe 6 und in der rektovaginalen Endometrioseprobe 7. Es ließ sich kein Unterschied zwischen den Endometriose- und den dazugehörigen Endometriumproben in der Expression der EMT-Faktoren abgelesen an der Bandenstärke feststellen. Die in Abb. 18 (siehe 3.5.2) dargestellte RT-PCR zur Untersuchung von Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose konnte Twist, Slug und E-cadherin in allen Proben nachgewiesen werden. Snail und N-cadherin zeigten sich in allen außer einer Probe. Es zeigte sich kein Unterschied in der Expression der Faktoren in den beiden untersuchten Endometriumgruppen. Lag eine reduzierte Expression von Twist vor, so zeigte sich ebenfalls eine reduzierte bis fehlende Expression von Snail in 2 Proben. Durch die RT-PCR an Endometriumgewebe konnten wir zusätzlich noch einen Hinweis auf die Hochregulation der beiden weiteren Transkriptionsfaktoren Snail und Slug liefern, welche nicht mittels Immunhistochemie untersucht wurden. Da es sich bei der RT-PCR um ein semiquantitatives Verfahren handelt, ist eine genaue Bestimmung der

Stärke der Expression nicht möglich, lediglich die Beurteilung der Bandenstärken bestimmt das Expressionsmaß. Diese Ergebnisse aus der RT-PCR stützen insgesamt unsere Ergebnisse aus der Immunhistochemie, dass EMT möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielt. Es zeigen sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von Twist und N-cadherin. Auch in den PCR zeigt sich keine Downregulation von E-cadherin in Endometriose, sondern ebenfalls eine starke Expression der RNA.

In dieser Untersuchung konnten die Transkriptionsfaktoren der EMT erstmals in der Endometriose charakterisiert werden. Dadurch eröffnet sich möglicherweise ein neues Verständnis der Pathogenese der Endometriose und eine mögliche Erklärung für die Entstehung und das invasive Wachstum der Endometriose. Weiterhin konnten wir die EMT-Faktoren auch im Endometrium nachweisen. Das Endometrium stellt ein besonderes Gewebe dar, da es verschiedene Faktoren exprimiert, die sonst nur in der Embryogenese oder in der Tumorgenese nachgewiesen werden. Es sollten weitere Studien am gesunden Endometrium bezüglich der EMT-Transkriptionsfaktoren sowie der Adhäsionsmoleküle auch unter Einbezug der Zyklusphase erfolgen, um neue aufschlussreiche Erkenntnisse über dieses Gewebe, aber auch über die Endometriose zu erlangen. Dies könnte helfen die Pathogenese dieser Erkrankung besser zu verstehen und damit weitere mögliche Angriffspunkte für zukünftige Therapiekonzepte liefern.

Wir konnten zeigen, dass Endometriose und Endometrium Gewebe darstellen, welche die Transkriptionsfaktoren der EMT Twist, Snail und Slug bei gleichzeitig hoher E-cadherin-Expression exprimieren. Dies unterliegt der Vielfältigkeit der EMT-Regulation abhängig von Zelltypus und –Zusammenhang. Die Co-Expression von E- und N-cadherin ebenso wie die hohe Expression von Twist im Endometrium unterstützt die Vermutung, dass der Prozess der EMT möglicherweise Teil an den stark dynamischen zyklischen Veränderungen des Endometriums hat. Das Endometrium ist bisher das einzige Gewebe, in welchem die EMT möglicherweise eine Rolle in physiologischen Prozessen des Erwachsenen spielt.

Die ähnliche Expression der getesteten Antigene in Endometriose und Endometrium kann als Hinweis gewertet werden, dass Endometriosezellen, wie bereits in *Sampson`s* Implantationstheorie postuliert, von Endometrium stammen. Die Hochregulation von Twist in epithelialen und stromalen Zellen, sowie die N-cadherin-Hochregulation in

stromalen Zellen der Endometriose weist möglicherweise darauf hin, dass die Veränderung in der EMT-Regulation in endometrialen Zellen Voraussetzung für die Bildung von Endometrioseläsionen darstellt. Die starke E-cadherin-Expression ist unter Umständen ein Mechanismus, durch welchen die Endometriose ihren Charakter als primär benigne Erkrankung beibehält. Dies unterscheidet möglicherweise eine benigne Zelle, wie die Endometriosezelle, von einer malignen Zelle, wie der Endometriumkarzinomzelle.

## 5. Zusammenfassung

Für diese Dissertation wurde experimentelle Grundlagenforschung zur Steuerung und Bedeutung der Angiogenese und Invasivität von Endometriosezellen durchgeführt. Angiogenese spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Endometriose. Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird in Endometriose exprimiert und ist in Tumoren assoziiert mit der Angiogenese. Um darzustellen, ob die COX-2 ähnlich wie in Tumoren eine Rolle in der Angiogenese spielt, wurde der Zusammenhang zwischen COX-2 und VEGF-A Expression in Endometriose untersucht.

Dazu wurden immunhistochemische Untersuchungen von COX-2 und VEGF an peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseläsionen durchgeführt. Zusätzlich wurden exemplarisch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen für COX-2 und VEGF, sowie für SMA und vWF zur genaueren Diskriminierung der die Endometriose umgebenden Gefäße in unreife und reife Gefäße angefertigt.

COX-2 und VEGF-A wurden in Epithelzellen in 93 % und 96,3 % exprimiert. Die Expressionen der beiden Faktoren waren im Stroma signifikant geringer mit 55 % für COX-2 und 85,1 % im Zytoplasma für VEGF. Die Expression von VEGF in den Kernen lag bei 52,6 % in Epithelien und 43,8 % im Stroma.

Es zeigte sich ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der Expression von COX-2 in den Epithelzellen und VEGF im Zytoplasma der Epithelzellen ( $p$ -Wert: 0,008). In den rektovaginalen Läsionen zeigte sich eine signifikant stärkere COX-2-Expression im Vergleich mit ovariellen und peritonealen Herden im Epithel ( $p$ -Wert: 0,025) und im Stroma ( $p$ -Wert: 0,016). Es konnten neugebildete Gefäße in Endometrioseläsionen mit COX-2-Expression mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass COX-2 ähnlich wie in Tumoren auch in der Endometriose mit der Expression von VEGF und damit mit der Angiogenese assoziiert ist. Die Korrelation der beiden Faktoren, sowie der Nachweis von neugebildeten Gefäßen in der Endometriose mit Expression von COX-2 deutet darauf hin, dass COX-2 eine wichtige Rolle in der Angiogenese der Endometriose spielt und möglicherweise einen bestimmenden Faktor in der Pathogenese dieser Erkrankung darstellt. Damit bietet COX-2 einen vielversprechenden Angriffspunkt für die medikamentöse Intervention der Endometriose.

Endometriose ist eine benigne Erkrankung, welche jedoch Charakteristika wie das invasive Wachstum und die metastatische Potenz mit malignen Erkrankungen teilt. Dazu wurde die potentielle Rolle der EMT in der Pathogenese der Endometriose untersucht. Epitheliale mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen Prozess, in dem es zum Verlust der epithelialen Charakteristika von Epithelzellen zu Gunsten eines mesenchymalen Phänotyps der Zelle kommt. Die EMT spielt eine entscheidende Rolle in der Embryogenese, konnte aber auch in Zusammenhang mit invasivem und metastatischem Wachstum von Karzinomzellen gebracht werden. Die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug induzieren die EMT durch Herunterregulation des Adhäsionsmoleküls E-cadherin. E-cadherin ist verantwortlich für die stabile Zell-Zell-Adhäsion. Twist führt ebenfalls zu einer Expression von N-cadherin, welche mit einem erhöhten invasiven Potential von Tumorzellen und damit auch mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert ist.

Die Expression der Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug sowie der Adhäsionsmoleküle E- und N-cadherin wurde mittels Immunhistochemie an peritonealen, ovariellen und rektovaginalen Endometrioseherden untersucht. Ebenfalls wurden immunhistochemische Untersuchungen an Endometriumproben für Twist, E- und N-cadherin angefertigt. Zusätzlich wurden RT-PCRs zur Untersuchung der Faktoren in Endometriose und Endometrium durchgeführt.

Twist, Snail, Slug, E- und N-cadherin wurden in Epithelzellen in 100 %, 95,7 %, 80 %, 100 % und 96,3 % von allen untersuchten Endometrioseproben exprimiert. Twist zeigte sich zusätzlich in 59,3 % in epithelialen Kerne. Die Expression aller Faktoren war in Epithelzellen stärker als in Stromazellen, E-cadherin stellte sich in Stromazellen nicht dar. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen E- und N-cadherin (p-Wert: 0,02). Jedoch zeigte sich keine Korrelation der Expression von E-cadherin und den Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug in Endometriose. Es ließ sich ein positiver Zusammenhang zwischen Twist und N-cadherin feststellen (p-Wert: 0,002). Erstaunlicherweise zeigte sich keine Herunterregulation von E-cadherin in Endometriose. In der RT-PCR konnten alle untersuchten Faktoren nachgewiesen werden.



Im Endometrium wurde Twist, E- und N-cadherin in 84,6 %, 83,3 % und 100 % im Zytoplasma des Epithels der untersuchten Proben nachgewiesen. Twist konnte ebenfalls in den Kernen des Epithels in 7,7 % der Proben dargestellt werden. Im Stroma lag eine wesentlich geringere Expression der untersuchten Faktoren vor, E-cadherin konnte als epithelialer Marker nicht in Stromazellen dargestellt werden. Im Vergleich mit den Endometriumproben zeigte sich bei der Endometriose eine signifikant stärkere Expression von Twist in den Epithelzellen (p-Wert: 0,024). Zusätzlich zeigte sich eine stärkere Expression von N-cadherin im Stroma der Endometriose im Vergleich zu Endometrium.

Die Faktoren der EMT werden in Endometriose und Endometrium exprimiert. Dies ist der erste Nachweis der EMT-Transkriptionsfaktoren in einer benignen Erkrankung wie der Endometriose, sowie in einem adulten Gewebe wie dem Endometrium. Die Hochregulation von Twist und N-cadherin in der Endometriose weist möglicherweise auf eine Beteiligung der EMT in der Pathogenese der Endometriose hin und ist ein möglicher Mechanismus, der das invasive Wachstum und die metastatische Potenz dieser Erkrankung mitreguliert. Vielleicht spielt die EMT auch eine Rolle in der physiologischen Zyklizität des Endometriums. Die fehlende Herunterregulation von E-cadherin oder die gleichzeitige Expression klassischer EMT-Faktoren ist evtl. ein Mechanismus über den die Endometriose trotz des invasiven Potentials ihren benignen Charakter behält.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ebert, A., Endometriose - Ein Wegweiser für die Praxis. De Gruyter, Frauenärztliche Taschenbücher, Berlin 2003.
2. Cramer, D.W. and S.A. Missmer, The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 955: p. 11-22; discussion 34-6, 396-406.
3. Fedele, L., et al., Stage and localization of pelvic endometriosis and pain. *Fertil Steril*, 1990. 53(1): p. 155-8.
4. Ulrich, U., Sillem, M., Keckstein, J., Endometriose - medikamentöse und chirurgische Therapie. *Med Welt* 2002. 53((1)): p. 23-8.
5. Anaf, V., et al., Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions. *Hum Reprod*, 2000. 15(4): p. 767-71.
6. Schweppe, K., Therapie der Endometriose unter Berücksichtigung der Aktivitätsgrade. *Gynäkologie*, 2002. 35: p. 255-61.
7. Sampson, J., Endometrial carcinoma of the ovary. *Arch Surg* 1925. 10: p. 1-72.
8. Judson, P., Temple, AM., Fowler, WC., Novotny, DB., Funkhouser, WK., Case report: Vaginal adenosarcoma arising from endometriosis. *Gynecol Oncol*, 2000. 76: p. 123-25.
9. Nunes, H., et al., [Thoracic endometriosis]. *Rev Mal Respir*, 2007. 24(10): p. 1329-40.
10. Thibodeau, L.L., et al., Cerebral endometriosis. Case report. *J Neurosurg*, 1987. 66(4): p. 609-10.
11. American Society for Reproductive Medicine: Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*, 1997. 67((5)): p. 817-21
12. Keckstein, J., et al., [Laparoscopic therapy of intestinal endometriosis and the ranking of drug treatment]. *Zentralbl Gynakol*, 2003. 125(7-8): p. 259-66.
13. Sampson, J., Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927. 14: p. 422-69.
14. Valle, R.F., Endometriosis: current concepts and therapy. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002. 78(2): p. 107-19.

15. Bulletti, C., et al., Endometriosis: absence of recurrence in patients after endometrial ablation. *Hum Reprod*, 2001. 16(12): p. 2676-9.
16. Witz, C.A., Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*, 1999. 42(3): p. 566-85.
17. Meyer, R., Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zbl Gynäkol*, 1919. 43: p. 745-50.
18. Koninckx, P.R., S.H. Kennedy, and D.H. Barlow, Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update*, 1998. 4(5): p. 741-51.
19. Leyendecker, G., et al., Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1034: p. 338-55.
20. Leyendecker, G., Redefining endometriosis: endometriosis is an entity with extreme pleiomorphism. *Hum Reprod*, 2000. 15(1): p. 4-7.
21. Leyendecker, G., et al., Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod*, 2002. 17(10): p. 2725-36.
22. Kennedy, S., et al., ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*, 2005. 20(10): p. 2698-704.
23. Spaczynski, R.Z. and A.J. Duleba, Diagnosis of endometriosis. *Semin Reprod Med*, 2003. 21(2): p. 193-208.
24. Cirkel, U., H. Ochs, and H.P. Schneider, A randomized, comparative trial of triptorelin depot (D-Trp6-LHRH) and danazol in the treatment of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1995. 59(1): p. 61-9.
25. Steiner, H., et al., Differential expression of ErbB3 and ErbB4 neuregulin receptors in dopamine neurons and forebrain areas of the adult rat. *Exp Neurol*, 1999. 159(2): p. 494-503.
26. Shaw, R.W., An open randomized comparative study of the effect of goserelin depot and danazol in the treatment of endometriosis. Zoladex Endometriosis Study Team. *Fertil Steril*, 1992. 58(2): p. 265-72.
27. Sutton, C.J., et al., Prospective, randomized, double-blind, controlled trial of laser laparoscopy in the treatment of pelvic pain associated with minimal, mild, and moderate endometriosis. *Fertil Steril*, 1994. 62(4): p. 696-700.

28. Telimaa, S., et al., Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, 1987. 1(1): p. 13-23.
29. Rock, J.A., J.A. Truglia, and R.J. Caplan, Zoladex (goserelin acetate implant) in the treatment of endometriosis: a randomized comparison with danazol. The Zoladex Endometriosis Study Group. *Obstet Gynecol*, 1993. 82(2): p. 198-205.
30. Prentice, A., et al., Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2000(2): p. CD000346.
31. Olive, D.L. and E.A. Pritts, Treatment of endometriosis. *N Engl J Med*, 2001. 345(4): p. 266-75.
32. Hughes, E., et al., Ovulation suppression for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003(3): p. CD000155.
33. Hornstein, M.D., et al., Use of nafarelin versus placebo after reductive laparoscopic surgery for endometriosis. *Fertil Steril*, 1997. 68(5): p. 860-4.
34. Telimaa, S., L. Ronnberg, and A. Kauppila, Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis after conservative surgery. *Gynecol Endocrinol*, 1987. 1(4): p. 363-71.
35. Hornstein, M.D., et al., Leuprolide acetate depot and hormonal add-back in endometriosis: a 12-month study. Lupron Add-Back Study Group. *Obstet Gynecol*, 1998. 91(1): p. 16-24.
36. Kiilholma, P., et al., Comparison of the gonadotropin-releasing hormone agonist goserelin acetate alone versus goserelin combined with estrogen-progestogen add-back therapy in the treatment of endometriosis. *Fertil Steril*, 1995. 64(5): p. 903-8.
37. Makarainen, L., L. Ronnberg, and A. Kauppila, Medroxyprogesterone acetate supplementation diminishes the hypoestrogenic side effects of gonadotropin-releasing hormone agonist without changing its efficacy in endometriosis. *Fertil Steril*, 1996. 65(1): p. 29-34.
38. Olive, D.L., Medical therapy of endometriosis. *Semin Reprod Med*, 2003. 21(2): p. 209-22.

39. Sharpe-Timms, K.L., et al., Gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) therapy alters activity of plasminogen activators, matrix metalloproteinases, and their inhibitors in rat models for adhesion formation and endometriosis: potential GnRH-a-regulated mechanisms reducing adhesion formation. *Fertil Steril*, 1998. 69(5): p. 916-23.
40. Jones, R.C., The effect of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist on experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1987. 114(3): p. 379-82.
41. Kettel, L.M., et al., Preliminary report on the treatment of endometriosis with low-dose mifepristone (RU 486). *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 178(6): p. 1151-6.
42. Bulun, S.E., et al., Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol*, 2000. 25(1): p. 35-42.
43. Bulun, S.E., et al., Molecular basis for treating endometriosis with aromatase inhibitors. *Hum Reprod Update*, 2000. 6(5): p. 413-8.
44. Ebert, A., Starzinski-Powitz, A., Aromatase und Cyclooxygenase-2 - neue Ansätze in der Endometriosetherapie? . *Gynäkologie* 2002. 35: p. 250-254.
45. Bartley, J., et al., [COX-2-expression in extragenital endometriosis lesions as a novel therapeutical approach?]. *Zentralbl Gynakol*, 2003. 125(7-8): p. 252-5.
46. Leyendecker, G., et al., Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod*, 1996. 11(7): p. 1542-51.
47. Lebovic, D.I., M.D. Mueller, and R.N. Taylor, Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 2001. 75(1): p. 1-10.
48. Lessey, B.A., Medical management of endometriosis and infertility. *Fertil Steril*, 2000. 73(6): p. 1089-96.
49. Marcoux, S., R. Maheux, and S. Berube, Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Engl J Med*, 1997. 337(4): p. 217-22.
50. Leyendecker, G., The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet*. 2009 Oct;280(4):529-38. Epub 2009 Jul 31.

51. Tuttlies, F., Der revidierte ENZIAN-Score – eine einfachere Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose?, Newsletter Endometriose Aktuell, Stiftung Endometriose Forschung, 01/2010. p.3-4
52. Tuttlies, F., et al., ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose, ENZIAN-Score, a classification of Deep Infiltrating Endometriosis Zentralbl Gynakol 2005; 127: p. 275-281
53. Smith, W.L., R.M. Garavito, and D.L. DeWitt, Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. J Biol Chem, 1996. 271(52): p. 33157-60.
54. Miyamoto, T., et al., Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. J Biol Chem, 1976. 251(9): p. 2629-36.
55. Xie, W.L., et al., Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(7): p. 2692-6.
56. Kennedy, C.R., et al., Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. Nat Med, 1999. 5(2): p. 217-20.
57. Griswold, D.E. and J.L. Adams, Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. Med Res Rev, 1996. 16(2): p. 181-206.
58. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. 38: p. 97-120.
59. Herschman, H.R., Prostaglandin synthase 2. Biochim Biophys Acta, 1996. 1299(1): p. 125-40.
60. Dinchuk, J.E., et al., Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. Nature, 1995. 378(6555): p. 406-9.
61. Lim, H., et al., Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. Cell, 1997. 91(2): p. 197-208.
62. Chakraborty, I., et al., Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. J Mol Endocrinol, 1996. 16(2): p. 107-22.
63. Rocca, B., et al., Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. J Clin Invest, 1999. 103(10): p. 1469-77.

64. Loftin, C.D., et al., Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(3): p. 1059-64.
65. Hinz, B. and K. Brune, [COX-1 and COX-2: functions and pharmacological effects]. *Pharm Unserer Zeit*, 1999. 28(1): p. 21-9.
66. Chandrasekharan, N.V., et al., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): p. 13926-31.
67. Appleby, S.B., et al., Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J*, 1994. 302 ( Pt 3): p. 723-7.
68. Hla, T. and K. Neilson, Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(16): p. 7384-8.
69. Davies, G., et al., Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Oncol*, 2002. 13(5): p. 669-78.
70. Howe, L.R., et al., Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2001. 8(2): p. 97-114.
71. Eberhart, C.E., et al., Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 1994. 107(4): p. 1183-8.
72. Tsujii, M., et al., Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 1998. 93(5): p. 705-16.
73. Denkert, C., et al., Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 2002. 160(3): p. 893-903.
74. Langman, M.J., et al., Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *JAMA*, 1999. 282(20): p. 1929-33.
75. Simon, L.S., et al., Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 1999. 282(20): p. 1921-8.
76. Bresalier, R.S., et al., Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med*, 2005. 352(11): p. 1092-102.

77. Bombardier, C., et al., Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*, 2000. 343(21): p. 1520-8, 2 p following 1528.
78. Bulun, S.E., Endometriosis. *N Engl J Med*, 2009. 360(3): p. 268-79.
79. Badawy, S.Z., L. Marshall, and V. Cuenca, Peritoneal fluid prostaglandins in various stages of the menstrual cycle: role in infertile patients with endometriosis. *Int J Fertil*, 1985. 30(2): p. 48-52.
80. Ota, H., et al., Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*, 2001. 16(3): p. 561-6.
81. Chishima, F., et al., Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol*, 2002. 48(1): p. 50-6.
82. Fagotti, A., et al., Analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in different sites of endometriosis and correlation with clinico-pathological parameters. *Hum Reprod*, 2004. 19(2): p. 393-7.
83. Risau, W. and I. Flamme, Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. 11: p. 73-91.
84. Kressin, P., Dietrich, K., Malik, E., Endometriose und Angiogenese. *der Gynäkologe*, 2002. 35(3): p. 224-31.
85. Hoeben, A., et al., Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, 2004. 56(4): p. 549-80.
86. Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995. 1(1): p. 27-31.
87. Dvorak, H.F., Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(8): p. 1835-42.
88. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.
89. Senger, D.R., et al., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983. 219(4587): p. 983-5.
90. Ferrara, N. and W.J. Henzel, Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 161(2): p. 851-8.



91. Neufeld, G., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999. 13(1): p. 9-22.
92. Dvorak, H.F., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 2002. 20(21): p. 4368-80.
93. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 2005. 23(5): p. 1011-27.
94. Paavonen, K., et al., Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol*, 2000. 156(5): p. 1499-504.
95. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 2004. 25(4): p. 581-611.
96. Gately, S., The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 2000. 19(1-2): p. 19-27.
97. Costa, C., et al., Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*, 2002. 55(6): p. 429-34.
98. Shweiki, D., et al., Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(3): p. 768-72.
99. Brown, L.F., et al., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*, 1997. 79: p. 233-69.
100. Kim, K.J., et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 841-4.
101. Ellis, L.M., et al., Role of angiogenesis inhibitors in cancer treatment. *Oncology (Williston Park)*, 2001. 15(7 Suppl 8): p. 39-46.
102. Dvorak, H.F., J.A. Nagy, and A.M. Dvorak, Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells*, 1991. 3(3): p. 77-85.
103. Denekamp, J., Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol*, 1984. 23(4): p. 217-25.

104. Nisolle, M. and J. Donnez, Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*, 1997. 68(4): p. 585-96.
105. Smith, S.K., Angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, 1997. 15(3): p. 221-7.
106. McLaren, J., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*, 1996. 11(1): p. 220-3.
107. Donnez, J., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod*, 1998. 13(6): p. 1686-90.
108. Schmedtje, J.F., Jr., et al., Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997. 272(1): p. 601-8.
109. Ji, Y.S., Q. Xu, and J.F. Schmedtje, Jr., Hypoxia induces high-mobility-group protein I(Y) and transcription of the cyclooxygenase-2 gene in human vascular endothelium. *Circ Res*, 1998. 83(3): p. 295-304.
110. Williams, C.S., et al., Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest*, 2000. 105(11): p. 1589-94.
111. Harada, S., et al., Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest*, 1994. 93(6): p. 2490-6.
112. He, H., et al., Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem*, 1999. 274(35): p. 25130-5.
113. Kang, Y. and J. Massague, Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 2004. 118(3): p. 277-9.
114. Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(6): p. 442-54.
115. Karreth, F. and D.A. Tuveson, Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther*, 2004. 3(11): p. 1058-9.
116. Yang, J., et al., Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004. 117(7): p. 927-39.
117. Kyo, S., et al., High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol*, 2006. 37(4): p. 431-8.

118. Takeichi, M., The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 1988. 102(4): p. 639-55.
119. Gumbiner, B.M., Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(8): p. 622-34.
120. Takeichi, M., Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 1991. 251(5000): p. 1451-5.
121. Gloushankova, N.A., Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Mosc)*, 2008. 73(7): p. 742-50.
122. Alexander, N.R., et al., N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res*, 2006. 66(7): p. 3365-9.
123. Gaetje, R., et al., Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol*, 1997. 150(2): p. 461-7.
124. Gaetje, R., et al., Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet*, 1995. 346(8988): p. 1463-4.
125. Starzinski-Powitz, A., et al., Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Hum Reprod Update*, 1998. 4(5): p. 724-9.
126. Scotti, S., et al., Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod*, 2000. 6(7): p. 610-7.
127. Fujimoto, J., et al., Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNAs in ovarian endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996. 67(2): p. 179-83.
128. Beliard, A., et al., Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril*, 1997. 67(2): p. 266-72.
129. Ueda, M., et al., Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, 2002. 16(5): p. 391-402.
130. Akarasereenont, P.C., et al., The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein tyrosine kinase. *Mediators Inflamm*, 2002. 11(1): p. 17-22.

131. Matsuzaki, S., et al., Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*, 2001. 76(4): p. 712-6.
132. Leong, J., et al., Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res*, 1996. 224(1): p. 79-87.
133. Dawood, M.Y., F.S. Khan-Dawood, and L. Wilson, Jr., Peritoneal fluid prostaglandins and prostanoids in women with endometriosis, chronic pelvic inflammatory disease, and pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol*, 1984. 148(4): p. 391-5.
134. Banu, S.K., et al., Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinology*, 2008. 149(3): p. 1180-9.
135. Noble, L.S., et al., Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(2): p. 600-6.
136. Ceyhan, S.T., et al., Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in ovarian endometriotic cysts and their relationship with angiogenesis. *Fertil Steril*, 2008. 90(4): p. 988-93.
137. Smith, S.K., Vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod*, 1996. 11 Suppl 2: p. 56-61.
138. Jones, R.L., R.W. Kelly, and H.O. Critchley, Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod*, 1997. 12(6): p. 1300-6.
139. Attia, G.R., et al., Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(8): p. 2897-902.
140. Muzii, L., et al., Atypical endometriosis revisited: clinical and biochemical evaluation of the different forms of superficial implants. *Fertil Steril*, 2000. 74(4): p. 739-42.
141. Nisolle, M., et al., Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*, 1993. 59(3): p. 681-4.
142. Matsuzaki, S., et al., Angiogenesis in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, 1998. 46(2): p. 111-5.

143. Li, S.F., et al., The number of proliferating cell nuclear antigen positive cells in endometriotic lesions differs from that in the endometrium. Analysis of PCNA positive cells during the menstrual cycle and in post-menopause. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993. 423(4): p. 257-63.
144. Wingfield, M., et al., Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 1995. 64(2): p. 340-6.
145. Jones, R.K., J.N. Bulmer, and R.F. Searle, Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. *Hum Reprod*, 1995. 10(12): p. 3272-9.
146. Nisolle, M., F. Casanas-Roux, and J. Donnez, Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril*, 1997. 68(5): p. 912-9.
147. Mechsner, S., et al., Immunohistochemical evaluation of endometriotic lesions and disseminated endometriosis-like cells in incidental lymph nodes of patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 2009.
148. Greenburg, G. and E.D. Hay, Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*, 1982. 95(1): p. 333-9.
149. Conacci-Sorrell, M., et al., Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol*, 2003. 163(4): p. 847-57.
150. Onder, T.T., et al., Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, 2008. 68(10): p. 3645-54.
151. Shaco-Levy, R., et al., Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and beta-catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008. 139(2): p. 226-32.
152. Shan, K., et al., Association of three single nucleotide polymorphisms of the E-cadherin gene with endometriosis in a Chinese population. *Reproduction*, 2007. 134(2): p. 373-8.
153. Nieman, M.T., et al., N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol*, 1999. 147(3): p. 631-44.

154. Hazan, R.B., et al., Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*, 2000. 148(4): p. 779-90.
155. Rosivatz, E., et al., Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer*, 2004. 111(5): p. 711-9.
156. Rosivatz, E., et al., Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol*, 2002. 161(5): p. 1881-91.
157. Mechsner, S., et al., Oxytocin receptor expression in smooth muscle cells of peritoneal endometriotic lesions and ovarian endometriotic cysts. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83 Suppl 1:1220-31.
158. Halme J., et al., Increased activation of pelvic macrophages in infertile women mild endometriosis. *AM J Obstet Gynecol*. 1983 Feb. 1;145(3):333-7.
159. Keichel, S., et al., Lymphangiogenesis in deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod*. 2011 Oct;26(10):2713-20
160. Chen, YJ., et al., Oestrogen-induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *J Pathol*. 2010 Nov;222(3):261-70.

## 7. Anhang

	<b>Patientinnen n= 82</b>
<b>Gewebe</b>	
peritoneal	40
ovariell	22
rektovaginal	20
<b>Alter (Mittelwert)</b>	34,4
<b>rASRM-Stadium</b>	
Stadium I	13
Stadium II	14
Stadium III	12
Stadium IV	22
extragenital	20
<i>fehlende Angaben</i>	1
<b>Zyklusphase</b>	
Menstruelle Phase	1
Sekretorische Phase	20
Proliferatorische Phase	22
<i>fehlende Angaben</i>	4
<b>Therapie</b>	
keine	47
GnRH-Analoga	5
Orale kombinierte Kontrazeptiva	18
Gestagen- Monopräparate	7
<i>fehlende Angaben</i>	5

**Anhang 1:** klinische Daten der Endometriosepatientinnen der Proben zur Immunhistochemie von COX-2 und VEGF-A

	<b>Patientinnen n= 40</b>
<b>Gewebe</b>	
peritoneal	9
ovariell	9
rektovaginal	9
Endometrium von Endometriosepatientinnen	7
Endometrium von Patientinnen mit Uterus myomatosus	6
<b>Alter (Mittelwert)</b>	36,85
<b>rASRM-Stadium</b>	
Stadium I	9
Stadium II	5
Stadium III	9
Stadium IV	10
<i>fehlende Angaben</i>	1
<b>Zyklusphase</b>	
Menstruelle Phase	0
Sekretorische Phase	8
Proliferatorische Phase	14
<i>fehlende Angaben</i>	2
<b>Therapie</b>	
Keine	24
GnRH-Analoga	1
Orale kom. Kontrazeptiva/ Gestagen- Monotherapie	15
<i>fehlende Angaben</i>	0

**Anhang 2:** Klinische Daten zu den Endometriose- und Endometriumproben für die Immunhistochemie von Twist, Snail, Slug, E-cadherin, N-cadherin



	<b>Patientinnen n= 6</b>
<b>Gewebe</b>	
peritoneal	1
ovariell	2
rektovaginal	3
<b>Alter (Mittelwert)</b>	32,5
<b>rASRM-Stadium</b>	
Stadium I	0
Stadium II	0
Stadium III	2
Stadium IV	4
<i>fehlende Angaben</i>	0
<b>Zyklusphase</b>	
Menstruelle Phase	0
Sekretorische Phase	1
Proliferatorische Phase	2
<i>fehlende Angaben</i>	0
<b>Therapie</b>	
keine	3
GnRH-Analoga	1
Orale kombinierte Kontrazeptiva	1
Gestagen- Monotherapie	1
<i>fehlende Angaben</i>	0

**Anhang 3:** Klinische Daten der Endometriosepatientinnen der Proben zur Herstellung von Primärzellkulturen für die PCR zur EMT

	<b>Patientinnen n= 8</b>
<b>Gewebe</b>	
peritoneal	2
ovariell	4
rektovaginal	2
Adenomyosis uteri	1
<b>Alter (Mittelwert)</b>	34
<b>rASRM-Stadium</b>	
Stadium I	1
Stadium II	0
Stadium III	3
Stadium IV	3
<i>fehlende Angaben</i>	1
<b>Zyklusphase</b>	
Menstruelle Phase	0
Sekretorische Phase	2
Proliferatorische Phase	2
<i>fehlende Angaben</i>	1
<b>Therapie</b>	
keine	5
Aromataseinhibitor	1
Orale kombinierte Kontrazeptiva	0
Gestagen-Monotherapie	1
<i>fehlende Angaben</i>	1

**Anhang 4:** Klinische Daten der Patientinnen der Proben von Endometriosegewebe für die PCR zur EMT

	<b>Patientinnen n= 7</b>
<b>Gewebe</b>	
Endometrium von Endometriosepatientinnen	3
Endometrium von Patientinnen ohne Endometriose	4
<b>Alter (Mittelwert)</b>	38,1
<b>rASRM-Stadium bei Endometriose (n=3)</b>	
Stadium I	0
Stadium II	0
Stadium III	1
Stadium IV	0
<i>fehlende Angaben</i>	2
<b>Zyklusphase</b>	
Sekretorische Phase	2
Proliferatorische Phase	1
<i>fehlende Angaben</i>	4
<b>Therapie</b>	
keine	7
GnRH-Analoga	0
Orale kombinierte Kontrazeptiva	0
Gestagen-Monopräparate	0
<i>fehlende Angaben</i>	0

**Anhang 5:** klinische Daten zu Endometriumproben für die PCR zur EMT

<b><u>Primärantikörper</u></b>			
<b>Bezeichnung</b>	<b>gerichtet gegen Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ca.-No</b>
monoklonal mouse anti-COX-2 Verdünnung 1:500	Mensch	Cayman chemicals , USA	160112
polyklonal rabbit anti-VEGF Verdünnung 1:100	Mensch	Neo Markers, UK	RB-9031-P0
monoklonal mouse anti-Ki-67 Verdünnung 1:2000	Mensch	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	M7187
polyklonal rabbit anti-Twist Verdünnung 1: 500	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-15393
polyklonal gaot anti-N-cadherin Verdünnung 1:300	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	sc-1502
Polyklonal rabbit anti-E-cadherin Verdünnung 1: 100	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7870
polyklonal rabbit anti-Snail Verdünnung 1: 50	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	Sc-10433
polyklonal rabbit anti-Slug Verdünnung 1: 50	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	Sc-15391
<b><u>Sekundärantikörper</u></b>			
<b>Name</b>	<b>gegen Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ca.-No</b>
Biotin-SP-konjugiertes IgG Verdünnung 1:400	Kaninchen anti-Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	315-065-045
Biotin-SP-konjugiertes IgG Verdünnung 1:400	Maus anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg, Deutschland	211-065-109
Biotin-SP-konjugiertes IgG Verdünnung 1:400	Kaninchen anti-Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	E0466
Biotin-SP-konjugiertes IgG Verdünnung 1: 200	Ziege anti-Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-2040

**Anhang 6:** Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

<b><u>Primärantikörper</u></b>			
<b>Bezeichnung</b>	<b>gerichtet gegen Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ca.-No</b>
monoklonal mouse anti-COX-2 Verdünnung 1:500	Mensch	Cayman chemicals, USA	160112
polyklonal rabbit anti-VEGF Verdünnung 1:100	Mensch	NeoMarkers, UK	RB-9031-P0
monoklonal anti-SMA Verdünnung 1:50	Mensch	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	M0851
polyklonal anti-vWF Verdünnung 1:1000	Mensch	Sigma, Deutschland	F3520
<b><u>Sekundärantikörper</u></b>			
<b>Name</b>	<b>gegen Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ca.-No</b>
Cy <sup>TM</sup> 2-konjugierte F(ab') <sub>2</sub> Fragment Verdünnung 1:100	Ziege anti-Maus	Dianova Hamburg, Deutschland	115-226-062
Rhodamine Red <sup>TM</sup> -X-konjugiertes IgG Verdünnung 1:100	Esel anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg, Deutschland	711-295-152

**Anhang 6:** Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

---

## Lösungen, Puffer und Medien

### 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
5 %/ 10 % Trockenmilch-Lösung (NFDM)	5 g/10 g in 100mL PBS/Tween 0,5 %

### Puffer

Die pH-Einstellung erfolgte mit HCl/NaOH.

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 <sup>®</sup> HCl 4 g Trizma <sup>®</sup> Base 43,9 g NaCl
10mM Citratpuffer pH 6,0	
<u>Lösung A</u>	0,1 M Zitronensäure (21.01g in 1000 mL Aqua dest.)
<u>Lösung B</u>	0.1 M NaCitrat (29,41g in 1000 mL Aqua dest.)
18mL Lösung A und 82 mL Lösung B ad 1000 mL Aqua dest.	
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 Natrium 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 (Western Blot)	0,5% Tween-20 in PBS oder 0,1% Tween-20 in PBS
<b>Medien</b>	
Wachstumsmedium	Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000 µg/mL) 1 % Glutamin (200 mM)

## Geräte und Reagenzien

### 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
BioPhotometer	Eppendorf Scientific, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Canon PowerShot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Dampfgarer	Braun, Melsungen
Douncer	Zeiss, Jena
Elektrophoreses power supply 300V- 500mA E835	Consort, Belgien
Elektrophoresekammer Sub-Cell <sup>®</sup> GT	Bio-Rad, München
Flow bench NU 425-400	NuAire, Plymouth, MN, USA
Gene Genius Bio imaging system	Syngene, Cambridge, UK
GeneSnap 6.05	Synoptics LTD, Cambridge, UK
Heizschrank/Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke und Kunkel, Taufen
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach
Master cycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Microtom/ Kryostat HM 560	MICROM International GmbH, Walldorf
Mikroliterzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Walldorf
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Power Ease Power Supply	Invitrogen GmbH, Karlsruhe



Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
RNase-free zone Bench	Gelaire Flow Laboratories, Kirkham, UK
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Schüttler 3005	GFL, Burgwedel
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke und Kunkel, Taufen
Schwenker Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu Europa, Duisburg
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge eppendorf zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tissue cool plate COP 20	Medite GmbH, Burgdorf
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 II™ Blot Module Kit CE Mark	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### **Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien**

1kd DNA Molekulargewichtsmarker	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
3, 3`-Diaminobenzidine DAB	Sigma, Deutschland
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland
Aerosol Resistant Tips verschiedene Größen	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
Agarose	
Alkaline Phosphatase anti Alkaline Phosphatase-	DakoCytomation, Glostrup,

---

Detektiermethode	Dänemark
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Calcium Chlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CMR Complete mini reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako® Antibody Diluent with Background Reducing Agent	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako® Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
DermaClean, nicht sterile Einmal-Untersuchungshandschuhe	Ansell, München
Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Dispase 1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Disposable Scalpel sterile	Feather Safety Razor Co., pfm, Köln
dNTP	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom, Berlin
ECL™ Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Eppendorf T.I.P.S., verschiedene Grössen	Eppendorf, Hamburg
Ethanol (96 %) reinst	Merck, Darmstadt
Ethanol (70 %)	

---

Falcon Serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25 mL	Becton Dickinson Labware,, Franklin Lakes, NJ USA
Falcon Tubes 25 und 50 mL	Becton Dickinson Labware,, Franklin Lakes, NJ USA
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Fuchsin Substrate-Chromogen-System	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Full Range Rainbow	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Ipegal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kollagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
M-MLV reverse transcriptase	Promega, Mannheim, Germany
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) min 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, IL, USA
Natriumchlorid (NaCl) min 99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

---

---

Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose Membran	Schleicher und Schüll,
Novex™ Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Nunc EasyFlask™ 25, 75, 150 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Zellkulturschalen 8,8 und 21,5 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
NuPage® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Novex Bis-Tris Gel 10%	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
Oligo (dt) oligonukleotide	Promega, Mannheim, Germany
Parafilm	American National Can, Neenah, WI, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pasteur Pipetten	Brand GmbH + Co, Wertheim
PBS Dulbecco (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
PBS Dulbecco Instamed	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/mL	Biochrom, Berlin
peroxidasekonjugierter Avidin- Biotin Komplex	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Plastipur® sterile Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Polyethylenbecher	Plano, Wetzlar
Power Block	BioGenex, San Ramon, Kanada
Primer	TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

---

---

Ready-Mix Taq PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co, Wertheim
Reporter Lysis Buffer 5x	Promega, Madison, WI, USA
RNase-free DNase Set 50	Quiagen, Hilden
RNasin	Promega, Mannheim, Germany
Roti Histo- Kitt	ROTH
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Softa-Man <sup>®</sup>	Braun, Melsungen
sterile Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Sterilfilter Millex <sup>®</sup> GP	Millipore, Bedford, MA, USA
Streptavidin-AP Coniugate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Target retrieval solution pH 9	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Tissue Tek	Sakura, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Trizma <sup>®</sup> Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma <sup>®</sup> Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trockenmilchpulver (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad, München
Trypsin / EDTA Solution in PBS 0,05 % / 0,02 % (w/v) ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
Tween <sup>®</sup> 20	Bio-Rad, München
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Zellschaber, steril	Nunc, Wiesbaden
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

## 8. Erklärung

Ich, Anne Jülicher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung der epithelialen mesenchymalen Transition und Angiogenese in der Pathogenese der Endometriose“ 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

## **9. Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."