

Aus der Klinik für Gynäkologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle der Calcium-bindenden Proteine in der
Endometriose-assoziierten Innervation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sina Harf, geb. Münch

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	9
II.	Abbildungsverzeichnis.....	11
III.	Tabellenverzeichnis.....	14
IV.	Abstract-Deutsche Fassung.....	16
V.	Abstract-Englische Fassung.....	18
1	Einleitung.....	20
1.1	Definition & Epidemiologie.....	20
1.2	Symptome & Diagnostik	20
1.3	Formen der Endometriose	21
1.4	Klassifikation der Endometriose.....	22
1.5	Therapie der Endometriose	23
1.6	Ätiologie der Endometriose.....	24
1.7	Neurotrophe Eigenschaften und Innervation der Endometriose	27
1.8	Die Funktion der Calcium-bindenden Proteine	29
1.9	Zielsetzung der Promotionsarbeit	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Geräte	33
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.3	Lösungen und Chemikalien.....	34
2.1.4	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	35

Inhaltsverzeichnis

2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Beschreibung des Patientinnenkollektivs	37
2.2.2	Kategorisierung der Patientinnen	38
2.2.3	Auswahl der Patientinnen für die immunhistochemischen Färbungen.....	39
2.2.4	Auswahl der Peritonealflüssigkeiten für die Western-Blot Analyse und den Neuronalen Wachstums-Assay	40
2.2.5	Auswahl der Peritonealflüssigkeiten zur Inkubation von PC12-Zellen	41
2.3	Immunhistochemische Färbungen.....	43
2.3.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	43
2.3.2	Entparaffinierung der Gewebeschnitte	43
2.3.3	Antigendemaskierung	43
2.3.4	Immunhistochemische Färbungen gegen die Calcium-bindenden Proteine S100B, Calbindin, Calretinin, Calmodulin, Parvalbumin und die neuronalen Marker PGP 9.5 und GAP 43.....	43
2.3.5	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	45
2.4	Kultivierung und Inkubation von Phäochromozytomzellen.....	46
2.4.1	Ansetzen der Zellkultur	46
2.4.2	Zellpassagierung.....	47
2.4.3	Kryokonservierung	47
2.4.4	Inkubation der Phäochromozytomzellen in Peritonealflüssigkeiten von Endometriosepatientinnen und Patientinnen ohne Endometriose	47
2.4.5	Vorbereitung der in Peritonealflüssigkeiten inkubierten PC12-Zellen für die Western-Blot Analyse	48

Inhaltsverzeichnis

2.4.6	Bestimmung der Zellzahl.....	49
2.5	Western-Blot Analysen	49
2.5.1	Proteinextraktion aus Mausgehirngewebe	49
2.5.2	Proteinbestimmung	49
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	49
2.5.4	Western-Blot Analyse der Calcium-bindenden Proteine S100B, Calbindin und Calretinin	50
2.6	Neuronaler Wachstums-Assay sensibler Hinterwurzelganglien.....	52
2.6.1	Vorbereitung der Eier	52
2.6.2	Präparation der sensiblen Hinterwurzelganglien	52
2.6.3	Inkubation sensibler Hinterwurzelganglien in Peritoneal- flüssigkeiten von Endometriosepatientinnen und Patientinnen ohne Endometriose	52
2.6.4	Auswertung der Nervenfaseraussprossung	53
2.6.5	Fixierung der sensiblen Hinterwurzelganglien	53
2.6.6	Immunfluoreszenzfärbung sensibler Hinterwurzelganglien gegen die Calcium-bindenden Proteine S100B, Calbindin, Calretinin und Parvalbumin	54
2.7	Statistische Auswertungen	55
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Immunhistochemische Charakterisierung Endometriose-assoziiertes Nervenfasern	56
3.2	Nervenfaserdichte intakter Nerven in peritonealer und rectovaginaler Endometriose.....	59
3.2.1	Expression von PGP 9.5 in Nervenfasern der peritonealen Endometriose.....	59

Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Expression von PGP 9.5 in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose.....	60
3.3	Nervenfaserdichte myelinisierter Nerven in peritonealer und rectovaginaler Endometriose	62
3.3.1	Expression von S100B in Nervenfasern der peritonealen Endometriose.....	62
3.3.2	Expression von S100B in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose.....	63
3.4	Expression von Calcium-bindenden Proteinen in Nervenfasern der peritonealen und rectovaginalen Endometriose.....	65
3.4.1	Calbindin.....	65
3.4.1.1	Expression von Calbindin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose.....	65
3.4.1.2	Expression von Calbindin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose	66
3.4.2	Calretinin.....	68
3.4.2.1	Expression von Calretinin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose.....	68
3.4.2.2	Expression von Calretinin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose	70
3.4.3	Calmodulin	71
3.4.3.1	Expression von Calmodulin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose.....	71
3.4.3.2	Expression von Calmodulin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose	73
3.4.4	Parvalbumin	74

Inhaltsverzeichnis

3.4.4.1 Expression von Parvalbumin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose.....	74
3.4.4.2 Expression von Parvalbumin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose	76
3.4.5 GAP 43.....	77
3.4.5.1 Expression von GAP 43 in Nervenfasern der peritonealen Endometriose.....	77
3.4.5.2 Expression von GAP 43 in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose	79
3.4.6 Expression der Calcium-bindenden Proteine in Endometriose-assoziierten Nervenfasern hinsichtlich der Schmerzintensität, klinischer Parameter und Relation der Calcium-bindenden Proteine zueinander	81
3.4.6.1 Expression der Calcium-bindenden Proteine sowie PGP 9.5 und GAP 43 in Nervenfasern der peritonealen Endometriose in Korrelation zur Schmerzintensität.....	82
3.4.6.2 Expression der Calcium-bindenden Proteine sowie PGP 9.5 und GAP 43 in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose in Korrelation zur Schmerzintensität.....	83
3.4.6.3 Gegenüberstellung der Expression Calcium-bindender Proteine in Endometriose-assoziierten Nervenfasern in der peritonealen Endometriose.....	83
3.4.6.4 Gegenüberstellung der Expression Calcium-bindender Proteine in Endometriose-assoziierten Nervenfasern in der rectovaginalen Endometriose	84
3.5 Expression der CaBP in Peritonealflüssigkeiten	85

Inhaltsverzeichnis

3.5.1	Expressionsanalyse von S100B, Calbindin und Calretinin in Peritonealflüssigkeiten von Endometriosepatientinnen und Patientinnen ohne Endometriose	85
3.5.2	Expressionsanalyse von S100B, Calbindin und Calretinin in Peritonealflüssigkeiten in Korrelation zur Schmerzintensität.....	87
3.5.3	Expressionsanalyse von S100B, Calbindin und Calretinin in PC12-Zellen in Korrelation zur Schmerzintensität.....	88
3.6	Induktion der Expression Calcium-bindender Proteine im Neuronalen Wachstums-Assay	89
3.6.1	Das Neuritenwachstum sensibler Hinterwurzelganglien	89
3.6.2	Das Neuritenwachstum sensibler Hinterwurzelganglien unter Berücksichtigung klinischer Parameter	91
3.6.3	Expression der CaBP in sensiblen Hinterwurzelganglien.....	93
4	Diskussion	94
4.1	Der Einfluss der Calcium-bindenden Proteine auf die Endometriose-assoziierte Innervation und die Schmerzpathogenese der Endometriose.....	95
4.2	EM-abhängige Modulation der Expression Calcium-bindender Proteine in sensiblen Hinterwurzelganglien und PC12-Zellen.....	101
5	Ausblick	104
6	Zusammenfassung	105
7	Literaturverzeichnis	107
8	Anhang.....	119
8.1	Danksagung.....	119
8.2	Lebenslauf	120
8.3	Publikationsliste	122

Inhaltsverzeichnis

8.4 Eidesstattliche Versicherung.....	123
---------------------------------------	-----

Abkürzungsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

ABB	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BGA	Bicinchoninic acid
CaBP	Calcium-bindende Proteine
CB	Calbindin
CR	Calretinin
CM	Calmodulin
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRG	Dorsal root ganglia (sensible Hinterwurzelganglien)
ECL	enhanced chemiluminescence
EM	Endometriose
HRP	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
mRE	mittlere relative Expression
NF	Nervenfaser
NGF	Nerve growth factor
NT-3	Neurotrophin 3
NWS	neuronaler Wachstums-Score

Abkürzungsverzeichnis

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC12-Zellen	Phäochromozytomzellen
pEL	peritoneale Endometriose
PF	Peritonealflüssigkeit
PV	Parvalbumin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rEM	rectovaginale Endometriose/tief infiltrierende Endometriose
RT	Raumtemperatur
SI	Schmerzintensität

Abbildungsverzeichnis

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung zellulärer Signalwege, die zu Transmitterfreisetzungen sensibler Neuronen führen	29
Abbildung 2: Überblick der verwendeten Antikörper PGP 9.5, der Calcium-bindenden Proteine und GAP 43 in der pEL und rEM	56
Abbildung 3: Immunhistochemische Darstellung PGP 9.5-positiver NF in pEL.....	59
Abbildung 4: PGP 9.5-positive NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum.....	60
Abbildung 5: Immunhistochemische Darstellung PGP 9.5-positiver NF in rEM.....	61
Abbildung 6: PGP 9.5-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina.....	61
Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung S100B-positiver NF in pEL.....	62
Abbildung 8: S100B-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum	63
Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung S100B-positiver NF in rEM	64
Abbildung 10: S100B-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina.....	64
Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung CB-positiver NF in pEL.	65
Abbildung 12: CB-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum	66
Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung CB-positiver NF in rEM.....	67
Abbildung 14: CB-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung CR-positiver NF in pEL	69
Abbildung 16: CR-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum	69
Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung CR-positiver NF in rEM.....	70
Abbildung 18: CR-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina	71
Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung CM-positiver NF in pEL.....	72
Abbildung 20: CM-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum.	72
Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung CM-positiver NF in rEM.....	73
Abbildung 22: CM-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina.....	74
Abbildung 23: Immunhistochemische Darstellung PV-positiver NF in pEL.....	75
Abbildung 24: PV-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum.	75
Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung PV-positiver NF in rEM	76
Abbildung 26: PV-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina	77
Abbildung 27: Immunhistochemische Darstellung GAP 43-positiver NF in pEL.....	78
Abbildung 28: GAP43-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONSNAH und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum.	78
Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung GAP43-positiver NF in rEM.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: GAP 43-pos. NF-Dichte/mm ² läSIONsnah und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina.....	80
Abbildung 31: Expression der CaBP, PGP 9.5 und GAP 43 in der pEL und im gesunden Peritoneum	84
Abbildung 32: Expression der CaBP, PGP 9.5 und GAP 43 in den anatomischen Schichten der rEM.....	85
Abbildung 33: Expression der CaBP in der PF.....	86
Abbildung 34: Relative Expression von S100, CB und CR in der PF	86
Abbildung 35: Relative Expression von S100B, CB und CR in den PF von EM-Patientinnen ohne, mit leichten und starken Schmerzen.....	87
Abbildung 36: NervenauSSproSSung aus sensiblen Hinterwurzelganglien	90
Abbildung 37: NervenauSSproSSung von in PF inkubierten Hinterwurzelganglien....	91
Abbildung 38: Quantifizierung der NervenauSSproSSung von in PF von EM-Patientinnen unterschiedlicher Schmerzintensitäten inkubierten Hinterwurzelganglien.....	92
Abbildung 39: Immunfluoreszenzfärbung der in den PF von EM-Patientinnen inkubierten Hinterwurzelganglien mit Anti-S100, Anti-CB, Anti-CR und Anti-PV	93

Tabellenverzeichnis

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Versuchsdurchführungen verwendete Geräte	33
Tabelle 2: Für die Versuchsdurchführungen verwendete Verbrauchsmaterialien ..	34
Tabelle 3: Für die Versuchsdurchführungen verwendete Lösungen und Chemikalien	34
Tabelle 4: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen	35
Tabelle 5: Übersicht der EM-Patientinnen mit pEL.....	39
Tabelle 6: Übersicht der EM-Patientinnen mit rEM.....	40
Tabelle 7: Übersicht der PF für die Western-Blot Analysen	41
Tabelle 8: Übersicht der PF zur Inkubation der PC12-Zellen	42
Tabelle 9: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper	44
Tabelle 10: In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper	44
Tabelle 11: Übersicht der gepoolten PC12-Zellen, die in PF von EM-Patientinnen (EM) und Patientinnen ohne EM (kEM) inkubiert wurden	48
Tabelle 12: Zusammensetzung der in den Western-Blot Analysen verwendeten Polyacrylamidgele	50
Tabelle 13: In der Western-Blot Analyse verwendete Primärantikörper	51
Tabelle 14: In der Western-Blot Analyse verwendete Sekundärantikörper	51
Tabelle 15: Für die Immunfluoreszenz verwendete Primärantikörper	54
Tabelle 16: Für die Immunfluoreszenz verwendete Sekundärantikörper.....	54
Tabelle 17: Charakterisierung CaBP-positiver Endometriose-assoziiertes Nervenfasern.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 18: NF-Dichte/mm ² ermittelt mit anti- a) PGP 9.5, S100B und GAP 43 und b) CB, CR, CM und PV in peritonealer und rectovaginaler Endometriose in Abhängigkeit zur Zyklusphase, Hormoneinnahme und des Stadiums der pEL und rEM.....	81
Tabelle 19: NF-Dichte/mm ² peritonealer EM in Korrelation zur Schmerzintensität...	83
Tabelle 20: NF-Dichte/mm ² rectovaginaler EM in Korrelation zur Schmerzintensität.....	83
Tabelle 21: Relative Expressionen der PC12-Zellen, die in PF von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM inkubiert wurden	89
Tabelle 22: Neuronaler Wachstums-Score der DRG, die in PF von symptomatischen EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM inkubiert wurden.....	92

IV Abstract- Deutsche Fassung

Jüngste Studien haben die Beteiligung von Nervenfasern (NF) und Neurotrophinen in der Pathogenese der Endometriose (EM) gezeigt. Die Beteiligung Calcium-bindender Proteine (CaBP) an entzündlichen Prozessen ist bereits bekannt. Das Ziel dieser Arbeit lag in der Charakterisierung von Nervenfasern (NF) in den läsionsnahen und peripheren (EM-freien) Anteilen peritonealer (pEL) und rectovaginaler (rEM) EM und dem Nachweis der CaBP in NF der pEL und rEM sowie den Peritonealflüssigkeiten (PF) von EM-Patientinnen, um die Rolle der CaBP in der Endometriose-assoziierten Innervation und der Schmerzpathogenese der EM zu analysieren.

Es erfolgte der Nachweis von PGP 9.5 (Marker intakter NF) und GAP43 (neuronaler Wachstumsmarker) sowie der CaBP S100B, Calbindin, Calretinin, Calmodulin, Parvalbumin in NF der läsionsnahen und peripheren Anteile der pEL (n=20), des gesunden Peritoneums von Patientinnen ohne EM (n=10) sowie in den Schichten der rEM (n=20), gesunden Darms und gesunder Vagina von Patientinnen ohne EM (n=7). Mittels Western-Blot-Analyse erfolgte der Nachweis CaBP in PF von Patientinnen mit (n=33) und ohne (n=11) EM und in neuronalen PC12-Zellen, die in PF von EM-Patientinnen (n=30) inkubiert wurden. Ein neuronaler Wachstums-Assay und Immunfluoreszenz sensibler Hinterwurzelganglien (DRG) zum Nachweis CaBP wurde ebenfalls durchgeführt.

In den peripheren Anteilen der pEL ergab sich im Vergleich zu den läsionsnahen Anteilen sowie zum gesunden Peritoneum eine signifikant niedrigere Dichte intakter NF. Im Verhältnis zeigte sich jedoch eine größtenteils signifikant höhere Dichte S100B-, Calbindin-, Calretinin-, Calmodulin- und Parvalbumin-positiver NF in der pEL und auch der rEM. Hinsichtlich der Schmerzintensität ergab sich für Calbindin in der pEL eine erhöhte NF-Dichte für Patientinnen mit leichter Schmerzintensität sowie eine signifikant erniedrigte Calmodulin-positiv NF-Dichte für Patientinnen mit starker Schmerzintensität. GAP43 ließ sich in NF der pEL signifikant erhöht nachweisen. S100B, Calbindin und Calretinin konnten gleichermaßen in PF von Patientinnen mit und ohne EM nachgewiesen werden. Für S100B und Calretinin ergab sich hinsichtlich der Schmerzintensität eine signifikant erhöhte Expression in PF von EM-Patientinnen mit leichten Schmerzen. In PC12-Zellen, die in PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden, ließen sich eine erniedrigte Calretinin-Expression sowie eine erhöhte Expression von Calbindin, mit höchster Ausprägung im Rahmen leichter

Abstract

Schmerzintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. In PF von EM-Patientinnen inkubierte DRG zeigten ein stärkeres Neuritenwachstum und CaBP-Expression als DRG, die in PF von Patientinnen ohne EM inkubiert wurden.

CaBP werden in Endometriose-assoziierten Nervenfasern verstärkt exprimiert. Ebenso scheinen Peritonealfüssigkeiten von EM-Patientinnen Einfluss auf die Expression von CaBP in neuronalem Gewebe zu nehmen. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint eine Rolle der CaBP in den chronisch entzündlichen Prozessen und der Schmerzpathogenese der EM möglich.

V Abstract- Englische Fassung

Recent studies demonstrated the involvement of nerve fibres and neurotrophines in the pathogenesis of endometriosis. The involvement of calcium-binding proteins (CaBP) in inflammatory processes is already known. The aim of this study was to characterize nerve fibres subpopulations in the proximal and distal area of the peritoneal endometriotic (pEL) and rectovaginal (rEM) lesions and to demonstrate the expression of CaBP in endometriosis-associated nerve fibres and also in peritoneal fluid of women with endometriosis, in order to study their role in endometriosis-associated innervations and pain pathogenesis in EM.

Nerve fibres near endometriotic lesions (proximal area) in pEL (n=20), the matching unaffected peritoneum (distal area) and healthy peritoneum of patients without EM (n=10) and in the different layers of rEM (n=20), healthy bowel and vagina of patients without EM (n=7) were characterized with PGP 9.5 (neuronal panmarker) and GAP43 (marker for neuronal regeneration) and the CaBP S100B, calbindin, calretinin, calmodulin, parvalbumin. Peritoneal fluids (PF) of women with (n=33) and without (n=11) EM and neuronal PC12-cell lines incubated with PF (n=30) were used for western-blot-analysis to verify the expression of CaBP. A neuronal growth assay and immunofluorescence of dorsal root ganglia (DRG) was performed.

The intact nerve fibre-density was significantly reduced in the distal area of pEL compared with the proximal area of women with endometriosis or with healthy peritoneum. The density of S100B-, calbindin-, calretinin-, calmodulin- and parvalbumin-positive nerve fibres was significantly increased in pEL and rEM. Taking into account the pain intensity in pEL an increased density of calbindin-positive nerve fibers for patients with mild pain intensity and a decreased density of calmodulin-positive nerve fibers for strong pain intensity could be shown. S100B, calbindin and calretinin were detected equally in the PF of patients with and without EM. For S100B and calretinin significantly increased expressions were shown for EM-patients with mild pain intensity. PC-12 cells incubated in PF of women with EM expressed less calretinin but more calbindin, for patients with mild pain intensity, than the control group. DRG incubated with peritoneal fluid of women with EM showed a significant higher outgrowth of new nerve fibres and expression of CaBP than the DRG incubated in PF of women without EM.

Abstract

CaBP are increased in endometriosis-associated nerve fibres. Similarly, the PF of patients with EM seem to influence the expression of CaBP in neuronal tissue. Based on these results CaBP might play a role in the chronic inflammatory processes and pain pathogenesis of EM.

1 Einleitung

1.1 Definition & Epidemiologie

Die Endometriose (EM) ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen und gilt als Östrogen abhängig (Giudice, 2004). 10-15% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter leiden an dieser chronisch entzündlichen Erkrankung, die sich durch das Auftreten von endometrialem Drüsengewebe (Epithel- und Stromazellen) und glatter Muskulatur außerhalb des Cavum uteri definiert (Olive and Pritts, 2001; Giudice and Kao 2004; Anaf et al., 2011). Bei jungen Frauen mit chronischen Unterbauchschmerzen, die auf eine hormonelle Therapie oder Schmerztherapie mit nicht-steroidalen Antiphlogistika nicht ansprechen, liegt die Prävalenz der Endometriose sogar bei etwa 70 % (Bulun et al., 2009). Mit geschätzten 40.000 Neuerkrankungen jährlich allein in Deutschland verursacht die EM eine beachtliche Morbidität, ist in der klinischen und basiswissenschaftlichen Forschung jedoch eher unterrepräsentiert (Schweppe, 2003). Wie präsentiert sich diese symptomatisch vielseitige Erkrankung? Wie wird sie diagnostiziert und therapiert?

1.2 Symptome & Diagnostik

Die EM nimmt häufig einen chronischen und schmerzhaften Verlauf. Eine Vielzahl von Frauen im reproduktionsfähigen Alter wird mit starken zyklusabhängigen oder chronischen Unterbauchschmerzen vorstellig, die für viele betroffene Frauen auch eine psychische und den Alltag einschränkende Belastung darstellen. Die Schwere der Erkrankung korreliert jedoch nicht mit der Intensität der Schmerzen. Ungefähr 60% der betroffenen Frauen präsentieren sich mit einer sekundären Dysmenorrhoe. Im Rahmen der peritonealen Endometriose (pEL) bestehen vor allem chronische Unterbauchschmerzen. Die Dyspareunie tritt bei bis zu 70% der betroffenen Frauen auf (Kaiser et al., 2009). Ebenso leiden viele Frauen unter Hypermenorrhoe. Die Dysurie und Dyschezie treten in einzelnen Fällen auf, wenn es zu einer Beteiligung der Organe des kleinen Beckens oder auch des Darms kommt. Im Falle einer tief infiltrierenden EM können je nach Ausbreitungsform der EM, zusätzlich zum hauptsächlich zyklischen Unterbauchschmerz, auch Beschwerden wie die stellungsabhängige oder stellungsunabhängige Dyspareunie, verschiedene Blutungs-

störungen sowie Dyschezie, perimenstruelle Blähungen und wechselnde Stuhlkonsistenz, Übelkeit und vegetative Dystonie auftreten (Abbott et al., 2004; Ebert, 2003). In bis zu 50% scheint eine primäre oder sekundäre Sterilität mit einer EM assoziiert zu sein und wird häufig erst durch einen unerfüllten Kinderwunsch diagnostiziert (Inoue et al., 1992; Missmer und Cramer, 2003; Pritts und Taylor, 2003). Bis zur endgültigen Diagnose der EM, deren Goldstandard letztlich die Laparoskopie mit Gewebeexzision und histologischer Befundung darstellt, können an die 6 Jahre vergehen (Schweppe, 2003), da sie mittels gynäkologischer Untersuchung kaum und über die vaginale oder abdominale Sonographie nur schwer zu diagnostizieren ist (Spaczynski und Duleba, 2003; Ulrich und Keckstein, 2005). Ebenfalls erschwert wird die Diagnose der EM durch eine Vielzahl von Differenzialdiagnosen. Bei ähnlicher Symptomatik kommen auch Erkrankungen außerhalb des gynäkologischen Formenkreises wie eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, Obstipation, Reizdarmsyndrom, chronische Harnwegsinfekte oder Harnsteine in Frage (Schindler et al., 2008). Die geschilderten Symptome sollten an eine EM denken lassen, beweisen sie jedoch keinesfalls, da bis zu 50% der EM-Patientinnen beschwerdefrei sind (Vercellini et al., 1997; D'Hooghe et al., 2003). Die Ausprägung der Symptome lässt ebenfalls nicht auf den Ausprägungsgrad oder die Schwere der Erkrankung schließen (Parazzini, 1999).

1.3 Formen der Endometriose

Abhängig von ihrer Lokalisation wird die EM in unterschiedliche Formen eingeteilt. Man unterscheidet zwischen der *Endometriosis genitalis externa*, die sich durch Manifestationen im Bereich der inneren weiblichen Genitale, sprich an den Ovarien, der Sacrouterinligamente oder am Douglas- und Blasenperitoneum, darstellt. Die *Endometriosis genitalis interna*, auch bezeichnet als Adenomyosis uteri, stellt sich in Form von Endometrioseinseln im Myometrium, die mindestens 2,5 mm von der Junktionalzone entfernt liegen, dar. Eine *Endometriosis extragenitalis* präsentiert sich durch Manifestationen unabhängig vom inneren Genitale wie beispielsweise an der Harnblase, den Ureteren, dem Darm oder Appendix sowie dem Zwerchfell, dem Nabel oder der Lunge. Reichen Endometrioseläsionen mit einer Tiefe von 5mm oder mehr in den Retroperitonealraum oder die Wand der Beckenorgane (Koninckx et al., 1991), so spricht man von einer *tief infiltrierenden EM*. Hier finden sich die

Endometrioseherde meistens im Septum rectovaginale, im Fornix vaginae, im Retroperitoneum sowie im Darm wieder (Ulrich et al., 2009). Insgesamt sind das Beckenperitoneum, die Ovarien, das Sacrouterinligament, Septum rectovaginale und Fornix vaginae sowie extragenitale Strukturen in absteigender Häufigkeit befallen (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2010).

1.4 Klassifikation der Endometriose

Auch wenn hinsichtlich der Symptomatik einer EM nicht auf ihr Stadium geschlossen werden kann, ist eine detaillierte Klassifikation notwendig, um den Schweregrad der EM und ihre Ausbreitung zu kennen, besser zu verstehen und eine mögliche Kontrolle über therapeutische Erfolge zu erzielen. Die rASRM-Klassifikation der American Society for Reproductive Medicine beschreibt vorwiegend eine intra-peritoneal sichtbare Manifestation der vorliegenden EM im kleinen Becken (ASRM, 1997). Die Einteilung erfolgt intraoperativ anhand eines Punktesystems und abhängig von der ermittelten Punktzahl in vier Stadien von leicht bis schwer. Eine Bewertung der Aktivität der Endometrioseherde erfolgt makroskopisch durch Beschreibung der Herde. In die Bewertung gehen Oberflächenausdehnung und Infiltrationstiefe der Läsionen an Ovarien, Tuben und Peritoneum sowie die Obliteration des Douglasraumes ein (ASRM, 1997). Jede tiefer liegende extra-peritoneale Manifestation, die durch eine entsprechende gynäkologische Palpation, wie auch durch ein bildgebendes Verfahren wie die Vaginalsonographie oder Becken-Magnetresonanztomographie diagnostiziert werden kann, wird in der rASRM-Klassifikation nicht berücksichtigt und letztendlich falsch-negativ oder zu ungenau bewertet (Tuttlies F et al., 2005). So wird z.B. bei Patientinnen mit Darm-symptomatik und histologisch nachgewiesener Darmendometriose lediglich in der Hälfte der Fälle ein rASRM Grad IV festgestellt (Keckstein et al., 2003). Die *ENZIAN-Klassifikation* stellt in Ergänzung zur rASRM-Klassifikation eine Möglichkeit dar die tief infiltrierende EM differenzierter zu erfassen und einer entsprechenden Stadien adaptierten Therapie zu zuführen (Tuttlies et al., 2005). In Anlehnung an onkologische Stadieneinteilungen erfolgte die Klassifikation des Schweregrads der Erkrankung anhand drei verschiedener Level (I bis III). Die Abgrenzung der Level ergibt sich aufgrund der Ausdehnung in der Fläche und in der Tiefe. Eine Ausdehnung des Befundes < 1cm entspricht Level 1, 1-3 cm dem Level 2 und eine

Ausdehnung > 3cm dem Level 3. Anhand der Lokalisation der Endometrioseläsionen erfolgt eine zusätzliche Einteilung in Untergruppen. Hierbei steht die Untergruppe a) für einen Befall des Douglas-Raums, des Septum rectovaginale und der Vagina, b) für die Lokalisation an den Sacrouterinligamente, Parametrien, Beckenwänden und eine extrinsische Lokalisation an den Ureteren sowie c) für Organüberschreitungen in Richtung des Rektums. Im Falle einer extragenitalen Manifestation („F“) der EM erfolgt eine Erweiterung der Klassifikation. Beispielsweise bei Befall der Harnblase („FB“) oder intrinsischer Endometriose der Ureteren („FU“) und im Falle intestinaler Herde am Sigma, Coecum oder terminalen Ileum („FI“) oder einer Adenomyose („FA“) (Tuttlies et al., 2005).

1.5 Therapie der Endometriose

Primär ist für alle Formen der EM die chirurgische Sanierung das Ziel. Bei einem ausgeprägten Befund mit Ausdehnung auf extragenitale Strukturen, wie im Falle der tief infiltrierenden EM, sind der Resektion die operationsbedingte Morbidität und die Rezidivrate der EM gegenüber zustellen (Camagna et al., 2004; Darai et al., 2005). Neben hormonellen Therapieansätzen aufgrund der Östrogenabhängigkeit dieser Erkrankung, erfolgt die Therapie der EM symptomatisch. Hormonell besteht die Möglichkeit durch die Einnahme oraler kombinierter Kontrazeptiva oder Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRH-Analoga) den endogenen Östrogenhaushalt herunter zu regulieren und damit in den Sexualhormonstoffwechsel (Hypothalamus, Hypophyse, Nebenniere, Ovar) einzugreifen (Vercellini et al., 1993; Olive und Pritts, 2001; Halis et al., 2006). Wegen der Folgen eines potenziellen Östrogenmangels sollten GnRH-Analoga mit entsprechender protektiver Begleitmedikation und zeitlich begrenzt appliziert werden (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2010). Studienergebnisse zeigen ebenfalls gute Therapieerfolge der Gestagenmonopräparate, die eine zusätzliche Therapiealternative zum bisherigen Goldstandard der GnRH-Analoga darstellen (Strowitzki, 2010). Häufig kommen sie postoperativ nach unvollständiger Entfernung der Endometrioseherde zum Einsatz (Neunhoeffer und Lawrenz, 2011). Zunehmend an Bedeutung gewinnt auch die Anwendung Levonorgestrel-haltiger Intrauterinsysteme (Mirena). Sie kommen therapeutisch im Rahmen der Adenomyosis uteri und rectovaginalen EM zur Anwendung, da durch hohe lokale Wirkspiegel eine gute

Gestagenwirkung im kleinen Becken erzielt werden kann (Fedele et al., 2001; Gomes et al., 2007). Zur Schmerzbekämpfung kommen nicht-steroidale Antiphlogistika zur Anwendung, wobei Belege für deren positive Effekte auf spezifische EM-assoziierte Beschwerden bisher fehlen (Allen et al., 2009). Im Fokus aktueller Forschung steht die Erprobung weitere Therapieoptionen mittels COX2- und Aromataseinhibitoren, da in EM-Herden die Überexpression der jeweiligen Enzyme nachgewiesen werden konnte (Urđl, 2006). Auch über selektive Progesteronrezeptormodulatoren und Estrogen-beta Agonisten können neue therapeutische Ansätze erwogen werden und sind Gegenstand aktueller Studien (Eilers et al., 2006; Schindler et al., 2008). Da es sich bei der EM um eine chronische Erkrankung handelt, sollte die Therapie langfristig erfolgen, da die Beschwerden bei Absetzen der Medikation erneut auftreten würden. Unabhängig der durchgeführten Therapieform kommt es bei 20-80% der EM-Patientinnen zu Rezidiven (Schweppe et al., 2003; Urđl, 2006).

1.6 Ätiologie der Endometriose

Auch wenn die Ätiologie und Pathogenese der EM bis dato ungeklärt sind, wurden bisher eine Vielzahl an Theorien vorgestellt. Die Entstehungstheorie, die im Laufe der Zeit mitunter die größte Akzeptanz erfuhr, ist die *Transplantationstheorie* nach J.A. Sampson. 1927 stellte Sampson die Behauptung auf, dass während der Menstruation vitales Endometriumgewebe retrograd durch die Tuben in die Bauchhöhle gelangt und es unter optimalen Bedingungen zur Implantation dieser Fragmente auf dem Peritoneum kommt (Sampson, 1927).

Die *Transplantationstheorie* wird durch verschiedene wissenschaftliche Untersuchungsergebnisse, wie die Tatsache, dass man bei Frauen mit Störungen der Entwicklung der Müllerschen Gänge und Abflussbehinderung des Menstrualblutes ein gehäuftes Auftreten von EM findet, gestützt (Dmowski und Radwandska, 1984). Das Auftreten der EM bei Frauen mit primärer Amenorrhoe und auch die Tatsache, dass schätzungsweise bei 90% der geschlechtsreifen Frauen eine retrograde Menstruation stattfindet, aber nur 15% an einer EM erkranken sowie das seltene Auftreten einer EM beim Mann, kann mit diesem Erklärungsansatz nicht begründet werden.

Einleitung

An diesem Punkt setzt die *Metaplasietheorie* nach Meyer an. Sie besagt, dass es unter bestimmten Stimuli wie Infektionen, hormoneller Dysbalance oder immunologischen Störungen zu metaplastischen Veränderungen embryonaler Zölomzellen kommt (Meyer, 1919). Diese Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass es in seltenen Fällen bei Männern nach Prostatektomie und Östrogentherapie zur Ausbildung einer EM kommt (Oliker und Harris, 1971; Pinkert et al., 1979; Schrodts et al., 1980).

Um mögliche Erklärungsansätze für die verschiedenen klinische Manifestationen der EM anzubieten, entwickelte Ph. Koninckx die *Endometriotic Disease Theory*. Koninckx beschreibt den Pathomechanismus der EM als Zusammenwirken verschiedener durch genetische Veränderungen entstandene aggressive Eigenschaften von Endometriuszellen wie Invasionsfähigkeit, verstärkte Angiogenese und eine verzögerte Reaktion auf Sexualsteroiden sowie das Einwirken von Cytokinen und Wachstumshormonen auf das Mikromilieu; die Peritonealflüssigkeit (Koninckx et al., 1998). Infolge dessen kommt es aufgrund einer veränderten Immunabwehr mit reduzierter zellulärer Immunität zur Entstehung einer EM (Koninckx et al., 1999).

Das „*Tissue Injury and Repair Concept (TIAR)*“ von Gerhard Leyendecker setzt an dem limitierten Erklärungskonzept der Transplantationstheorie an und versucht die Tatsache, dass laut Sampson alle Frauen an einer retrograden Menstruation leiden, aber nicht alle an einer EM erkranken, zu erklären (Ebert, 2003). Nach Leyendecker kommt es durch eine Hyperperistaltik des Uterus zur Lösung und Dissemination von Zellen mit Stammzellcharakter aus der Basalis des Endometriums und zu einer nachfolgenden Differenzierung dieser Zellen zu Endometrioseläsionen (Epithel-Stroma und Muskelzellen). Die Dissemination wird durch Traumatisierung der Basalis durch besagte uterine Hyperperistaltik möglich, deren Ursachen untersucht werden. Diskutiert wird ein basaler Hyperöstrogenismus bedingt durch die Hochregulation der Aromatase im Rahmen der Gewebereparatur nach Traumatisierung. Dadurch wird die Hyperperistaltik aufrechterhalten und es kommt zur Autotraumatisierung (Leyendecker et al., 1998).

Im *Aromatasekonzept* werden die bis dato diskutierten Ätiologien, durch die Auswirkungen der in Endometriosegewebe festgestellten Überexpression und damit verbundenen steigenden lokalen Konzentration von Östradiol (E₂) und Prostaglandin,

ergänzt. Über diesen neuen Ansatz erschließen sich zudem neue therapeutische Wege (Bulun et al., 2000).

Anna Starzinski-Powitz betrachtete die EM in ihrem *Zell-Molekularbiologiekonzept* also eine Erkrankung ähnlich maligner Tumore. Die Invasivität und Ausbreitung der EM nach Übertritt in die Bauchhöhle erklärt sie über bestimmte Eigenschaften der Endometriosezellen, die denen maligner Zellen ähneln. So kann es durch die modulierte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle zu einer gestörten Gewebeintegrität und damit verbundenen Loslösung von Zellen aus ihrem eigentlichen Zellverband und folglich zur Metastasierung kommen (Starzinski-Powitz et al., 2001).

Die nachfolgenden *Immunologischen Theorien* gehen auf die fehlende Reaktion des Immunsystems auf die ektopen sich außerhalb des Cavum uteri implantierenden Endometriumzellen ein. Angenommen wird eine Überexpression von Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren bei Frauen mit EM (Fakih et al., 1987; Mori et al., 1991; Rier et al., 1994). Lokal produzierte Cytokine modulieren als komplexes Netzwerk das entzündliche Verhalten der ektopen endometrialen Implantate. Proinflammatorische Proteine aus Endometrioseherden und aus zugehörigen Immunzellen tragen ebenfalls zur verstärkten Entzündungsreaktion der EM bei. Folglich kommt es zum Erhalt der entzündlichen Läsionen, statt zu deren Beseitigung durch die humorale oder zelluläre Immunabwehr (Lebovic et al., 2001).

Obwohl die oben genannten Theorien viele interessante Aspekte aufweisen, konnte bisher kein Model die Pathogenese der EM vollständig klären. Von großer klinischer Bedeutung ist die Symptomatik, für die es aufgrund der mangelnden kausalen Ursachen der Endometriose keine ausreichenden Behandlungskonzepte gibt. Von besonderer Bedeutung sind dabei die chronischen Unterbauchschmerzen, die zunächst zyklisch auftreten und sich anfänglich operativ oder hormonell behandeln lassen. Dennoch entwickeln sich die Schmerzen in ca. 20-30 % zu chronischen Unterbauchschmerzen, die auch unter hormoneller Therapie auftreten können und persistieren.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Ausarbeitung möglicher Pathogenesemechanismen der chronischen Unterbauchschmerzen und entzündlichen Komponente der EM. Neben den inflammatorischen Schmerzkomponenten (Freisetzung

von Schmerzmediatoren) scheint die EM auch über neurotrophe Eigenschaften zu verfügen, die zu weitreichenden Veränderungen in der Endometriose-assoziierten Innervation führen. Im Folgenden soll intensiv auf die aktuelle Datenlage eingegangen werden.

1.7 Neurotrophe Eigenschaften und Innervation der Endometriose

Die Pathogenese der Unterbauchschmerzen im Rahmen der EM ist bisher ungeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass neuromodulatorische Prozesse in der EM stattfinden. 2000 konnten Anaf et al. erstmals die Expression von Nervenfasern (NF) in der tief infiltrierenden EM nachweisen. Berkley und Kollegen wiesen 2004 mittels eines Rattenmodells darauf hin, dass ektopisch wachsende Endometrioseherde ihre eigene Innervation in Form von sensiblen und efferenten Nervenfaserteilen zu entwickeln scheinen (Berkley et al., 2004). Mechsner et al. gelang 2007 der Nachweis von NF in topographischer Beziehung zu Endometrioseläsionen. Die lokalisierten NF führen sensible und auch sympathische Anteile (Tokushige et al., 2006; Mechsner et al., 2007).

Im Vergleich zu gesundem Peritoneum von Patientinnen ohne Endometriose, stellt sich im endometriotisch veränderten Peritoneum eine Dysbalance dieser sympathischen und sensiblen Nervenfaserteile dar. Es ließen sich eine Vermehrung der sensiblen NF und eine Verminderung der sympathischen NF nahe den peritonealen Läsionen feststellen (Arnold et al., 2012). Die Entdeckung der EM-assoziierten Innervation ließ erstmals einen neuropathischen Schmerzcharakter vermuten (Vercellini et al., 2009). Diese Vermutung ließ sich vor allem mit der oft durch die EM-Patientinnen angegebene Chronifizierung der Unterbauchschmerzen vereinbaren und legt nahe, dass die vorkommenden NF Einfluss auf die Schmerzpathogenese nehmen.

Das Nervensystem spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese chronischer Entzündungen und Schmerzen (Lorton et al., 1999; Straub et al., 2007). So wird beispielsweise auch in chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine profunde Beteiligung des neuronalen Systems angenommen (Härle et al., 2005; Straub et al., 2007; Levine et al., 1984; Lorton et al., 1999). Während das sym-

Einleitung

pathische Nervensystem in frühen Stadien einer Entzündung proinflammatorisch (Härle et al., 2005; Levine et al., 1988) und im weiteren Verlauf antiinflammatorisch wirken kann (Härle et al., 2005), spielt das sensible Nervensystem mit seinem wichtigen Neurotransmitter Substanz P vor allem eine proinflammatorische Rolle (Jancso et al., 1967; Karagiannides und Pothoulakis, 2009; Levine et al., 1984). Arnold et al. konnten zeigen, dass die Anzahl sympathischer NF in der Peripherie um die Endometrioseläsion herum deutlich reduziert ist (Arnold et al., 2012).

Die Veränderungen der peritonealen Innervation könnten durch die ebenfalls veränderte Peritonealflüssigkeit von EM-Patientinnen bedingt sein, in der erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Cytokinen (Rana et al., 1996; Fakhri et al., 1987), Prostaglandinen (Vernon et al., 1986), Nerve growth factor (NGF) (Barcena de Arellano et al., 2011) und aktivierten Makrophagen (Halme et al., 1983) gefunden wurden. Selbige Mediatoren werden in den peritonealen Läsionen exprimiert und scheinen an der Aktivierung peritonealer Nozizeptoren und der Schmerzmodulation beteiligt zu sein (Vernon et al., 1986; Anaf et al., 2002; Borghese et al., 2010). Neurotrophe Faktoren wie der NGF, das Neurotrophin (NT) 3 und der Brain derived neurotrophic factor (BDNF) werden in der EM exprimiert und scheinen an der Modulation der EM-assoziierten Innervation beteiligt zu sein (Anaf et al., 2002; Mechsner et al., 2007; Borghese et al., 2010; Arnold et al., 2012). NGF und die anderen bereits erwähnten Neurotrophine nehmen dabei auf verschiedene Typen von NF Einfluss (Eide et al., 1993; Ip et al., 1993; Jones et al., 1994; Baimbridge et al., 1992) und manche dieser NF exprimieren Calcium-bindende Proteine (CaBP). Auch die Freisetzung des Neurotransmitters Substanz P aus sensiblen Neuronen soll an der Entstehung entzündlicher und neurogener Schmerzen beteiligt sein (Theodoro et al., 2012) und zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle führen (Womack et al., 1988). Übermäßige intrazelluläre Calcium-Mengen können jedoch apoptotische Reaktionskaskaden aktivieren (Lynch et al., 2000). Da die Schmerzpathogenese der EM allein durch den Einfluss der Neurotrophine nicht erklärt werden kann, müssen auch andere in Wechselwirkung mit den Neurotrophinen stehenden Faktoren wie die CaBP näher betrachtet werden. Es besteht die Möglichkeit einer direkten Einwirkung von Calcium und CaBP auf die Schmerzpathogenese der EM, die im Folgenden nähere Betrachtung findet.

1.8 Die Funktion der Calcium-bindenden Proteine

Im Prozess des chronischen Schmerzes, einhergehend mit pathologischen Sensibilitäten wie Allodynie und Hyperalgesie, spielt die zentrale Sensibilisierung durch synaptische Modulation auf Rückenmarksebene eine zentrale Rolle (Woolf und Thompson, 1991; Willis, 2001). Dieser Prozess ist calciumabhängig (Willis, 2001; Malenka und Nicoll, 1999). Calciumionen regulieren eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse und spielen eine zentrale Rolle während transmembranärer Signalwege (Baimbridge et al., 1992; Berridge et al., 2003). Außerdem agieren sie als wichtige Regulatoren der Genexpression u.a. in kultivierten cerebellaren Körnerzellen, wo das neuronale Überleben von einem durch Membrandepolarisation induzierten Calciumeinstrom abhängig ist (Schwaller et al., 2009). Über die physiologischen Werte hinaus erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen können jedoch zu irreversiblen Zellschäden führen (Clarke, 1989; Schanne et al., 1979). Zu hohe Calciumkonzentrationen führen ebenfalls zu einer Verstärkung neurotoxischer Effekte auf exzitatorisch wirkende Transmitter (Choi, 1987). Ein Calciumanstieg durch Aktivierung von Oberflächenrezeptoren immunologischer Zellen, aktiviert wiederum verschiedenste Signalwege, die die Aktivierung, Proliferation und vielseitige Effektorfunktionen im Rahmen von Entzündungsprozessen beeinflussen (Lewis, 2001).

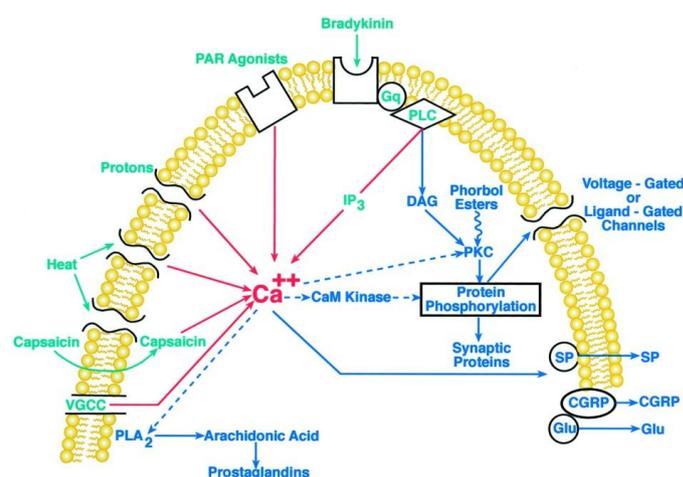


Abbildung 1: Darstellung zellulärer Signalwege, die zu Transmitterfreisetzungen sensibler Neuronen führen. Capsaicin, Hitze und Protonen aktivieren ligandengesteuerte Kationenkanäle, die u.a. intrazellulären Calciumeinstrom erlauben. Die dadurch entstehenden Depolarisationen aktivieren erneut spannungsgesteuerte Calciumkanäle und führen somit zu weiterem Calciumeinstrom in die Zelle. Der Anstieg intrazellulären Calciums führt zu Transmitterfreisetzung und Aktivierung verschiedener Enzyme wie PLA₂, CaM-Kinansen und PKC (Richardson und Vasko, 2002).

Einleitung

Calcium ist an der Transmitterausschüttung und Aktivierung verschiedener Enzyme aus sensiblen Neuronen beteiligt (Richardson und Vasko, 2002). Auch im Rahmen der Beteiligung des proinflammatorisch wirkenden sensiblen Nervensystems in der Endometriose, sollte die Rolle von intrazellulärem Calcium bzw. CaBP genauer betrachtet werden.

CaBP agieren als Calcium-Puffer und Calcium-Sensoren, sind an der Aktivierung verschiedener Signalwege beteiligt und spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Calciumhomöostase von NF (Schwaller et al., 2002 und 2009). Die Hypothese von Scharfmann und Schwartzkroin von 1989 geht sogar davon aus, dass die intrazelluläre Konzentration der CaBP während längerer Exzitation direkt proportional zum Widerstand der Nervenzelle gegen Degeneration ist (Schwaller et al., 2009). Die Anwesenheit der CaBP in prä- oder postsynaptischen Abschnitten kann synaptische Transmissionen auf Rückenmarksebene peripher und effektiv modulieren und daher Einfluss auf pathologische Sensibilitäten nehmen (Schwaller et al., 2009).

Calbindin D-28k (CB), *Calretinin (CR)*, *Parvalbumin (PV)* und *Calmodulin (CM)* gehören in die Gruppe der EF-Hand-Proteine. Die EF-Hand, eine Aminosäuresequenz mit charakteristischer dreidimensionaler Struktur, ist eine hoch affine calciumbindende Hand (Moews and Kretsinger, 1975). *S100B* ist ein Mitglied der S100-Multigenfamilie, die über zwei EF-Hände verfügen. Eine calciumbindende und eine S100-spezifische Hand (Leach und Day, 2006). Die Mehrzahl der Proteine dieser Gruppe agiert als Calciumsensoren. Die Bindung von intrazellulärem Calcium führt zu einer Konformationsänderung der Proteine, die wiederum eine Calcium-regulatorische Interaktion mit spezifischen Zielen möglich macht (Schwaller et al., 2010) und somit regulatorisch Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration nimmt. CaBP lassen sich in verschiedenen Subpopulationen von Nervenzellen im zentralen und peripheren Nervensystem nachweisen. CB lässt sich in Nervengewebe wie cerebellären Purkinje-Zellen, hippocampalen Körnerzellen, CA3 Interneuronen und CA1 Pyramidalzellen nachweisen (Fierro und Llano, 1996) sowie in Geweben der Nieren, des Pankreas und Thymus. Auch im menschlichen Endometrium konnte CB bereits nachgewiesen werden und scheint östrogenabhängig im Rahmen der Reproduktion und im Menstruationszyklus eine Rolle zu spielen (Hyun et al., 2011). CR lässt sich in skelettalen Muskelzellen von Vertebraten, endokrinen sowie im zentralen und peripheren Nervengewebe, vor allem in sensiblen NF, nachweisen

Einleitung

(Parmentier et al., 1991; Rogers et al., 1990). In ovariellen Oberflächenepithel und der oberflächlichen Funktionalis des Uterus konnte CR nachgewiesen werden (Doglioni et al., 1996; Lugli et al., 2003) und dient u.a. als Marker für ovarielle Keimstrangtumoren (Deavers et al., 2003; McCluggage et al., 2001). PV kann ebenfalls in skelettalen Muskelzellen von Vertebraten, endokrinem Gewebe, cerebellären Purkinje-Zellen und Neuronen der Hinterwurzelganglien des spinalen Hinterhorns nachgewiesen werden (Endo et al., 1985; Jamieson et al., 2005). CM lässt sich intrazellulär ubiquitär und vor allem an Aktin gebunden in der glatten Muskulatur des Menschen nachweisen, wo es die Muskelkontraktion reguliert (Koller et al., 1991; O'Day et al., 2003). S100B ist in neuronalen Zellen wie Gliazellen und Nervenzellen des Hippocampus nachweisbar sowie in Adipozyten und glatten Muskelzellen (van Eldik and Zimmer, 1989; Donato, 1991). Die Abwesenheit eines CaBP in einer Zellen oder einem bestimmten Gewebe kann nicht durch die Anwesenheit eines anderen EF-Hand-Protein-Familienmitgliedes kompensiert werden. Wird erst einmal ein bestimmtes CaBP exprimiert ist die Zelle bzw. das Gewebe auf dieses angewiesen (Schwaller et al., 2004). Mehrere Autoren vertreten die Hypothese, dass Nervenzellen, die CaBP exprimieren weniger anfällig gegenüber Neurodegeneration sind (Waldvogel et al., 1991; Lukas et al., 1994; Lacopino et al., 1994). So ließ sich für CR eine indirekt protektive Rolle in kortikalen CR-exprimierenden Zellen dahingehend nachweisen, dass diese Zellen bei Anwesenheit von CR gegenüber Glutamatoxizität resistenter waren, als einfache neuronale Populationen (Lukas et al., 1994). In experimentellen Morbus Parkinson Modellen konnte gezeigt werden, dass CB-exprimierende Zellen der Substantia Nigra im Unterschied zu CB-armen Zellen nicht degenerieren (Yamada et al., 1990). Die S100 Subtypen S100A8 und S100A9 sind in der Lage die Immunglobulinproduktion zu hemmen, dienen der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten, können Apoptosen induzieren und Inflammationen regulieren (Brun et al., 1994; Ryckman et al., 2003; Yui et al., 2003). Laut Dale et al. ist S100A9 scheinbar in der Lage einer Hyperalgesie entgegen zu wirken (Dale et al., 2006).

Die Beteiligung erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentrationen an Sensibilisierungsprozessen in Neuronen des Hinterhorns (Sojka et al., 2010) und die Tatsache, dass CaBP auch in Modellen experimenteller Arthritis (Dougherty et al., 1992; Neugebauer und Schaible, 1990; Schaible et al., 2002; Sojka et al., 2010), Rattenmodellen der chronischen Colitis (Auli et al., 2008) oder Migränemodellen (Teepker et al., 2008)

eine wesentliche Rollen zu spielen scheinen, lässt vermuten, dass CaBP auch im Rahmen der chronischen Entzündung und Schmerzpathogenese der EM beteiligt sein könnten. Aufgrund verschiedener Parallelen zwischen den oben genannten chronisch entzündlichen Erkrankungen und der EM, sollte eine Beteiligung der CaBP auch in der chronisch entzündlichen Komponente und Schmerzpathogenese der EM untersucht werden. Die Anwesenheit einzelner CaBP wie CB und CR wurde in der EM bereits nachgewiesen (Kusakabe et al., 2010, Ferrero et al., 2007), jedoch wurde ihre Anwesenheit noch nicht in Bezug auf die EM betrachtet und verstanden.

1.9 Zielsetzung der Promotionsarbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin die Expression der Calcium-bindenden Proteine CB, CR, PV, CM und S100B in EM-assoziierten NF und in Hinblick auf ihre Rolle im Rahmen der Schmerzpathogenese und des chronisch entzündlichen Charakters der EM in den läsionsnahen und peripheren Arealen der peritonealen Endometriose (pEL) und tief infiltrierenden Endometriose zu analysieren. Hinsichtlich der tief infiltrierenden Endometriose liegt der Fokus dieser Arbeit vor allem auf der recto-vaginalen Endometriose (rEM). Ebenfalls sollte versucht werden die kontrovers diskutierten neuroprotektiven Eigenschaften der Calcium-bindenden Proteine in Hinblick auf die EM-assoziierte Innervation genauer zu betrachten und im Rahmen der chronisch entzündlichen Erkrankung der EM einzuordnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Für die Versuchsdurchführungen verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Deutschland
Tissue cool plate COP 20	Medite Medizintechnik, Deutschland
Ultracentrifuge Optima L-90 L	Heraeus, Deutschland
Trockenschrank	Ehret, Deutschland
Dampfgarkocher	Braun, Deutschland
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, Deutschland
Research Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Deutschland
Kamera Canon power shot G5	Canon GmbH, Deutschland
Gefrierschrank Ultra low -80°C	Sanyo, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Bosch, Deutschland
Pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke und Kunkel, Deutschland
Mikrowellengerät NN-E205W	Panasonic, Deutschland
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Deutschland
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Deutschland
Wärmebad	Medax, Deutschland
Brutmaschine Modell 3000	Jane Schütz GmbH, Deutschland
Pinzetten (spitz und gebogen)	A. Dumont & Fils, Schweiz
Uhrmacherpinzette	Carl Roth GmbH, Deutschland
Binokular Wild M8	Wild Heerbrugg, Schweiz
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Deutschland
Axiovert 40 CFL Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
Sterilwerkbank	Hera Safe, Heraeus, Laboratory Products, Deutschland
Saugmaschine	HLC Biotech, Deutschland
Schere BC 464	Aesculap AG, Deutschland
Elektrophoresekammer, Mini-Protean® 3 Cell System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Entwickler, X-OMAT 1000	Kodak, Schweiz
Mini-Tank Transfer Cell	Bio Rad, Deutschland
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 3000	Bio Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Heraeus, Deutschland

Material und Methoden

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Für die Versuchsdurchführungen verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Objekträger Super Frost Plus	Menzel, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc, Deutschland
Deckgläser Cover glass, 24x50mm	VWR International GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Falcon Tubes, 15ml	Becton Dickinson Labware, USA
Safe seal Reagiergefäße, 2ml	Sarstedt, Deutschland
Falcon Serologische Pipette, 5/10/25ml	Becton Dickinson Labware, USA
Mikrotom-Skalpelle	Feather, Japan
Valo SPF Eier	Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland
Petrischalen Nunclon Surface	Nunc, Dänemark
Lab-Tek Chamber slide system	Nalge Nunc International, USA
BCATM Protein Assay Reagent Kit	Pierce, UK
ECLTM Western Blotting Detection Reagent Kit	Amersham Bioscience, Deutschland
PVDF-Membran	Perkin Elmer, Deutschland
Röntgenfilm, Hyperfilm TM ECL	Amersham Bioscience, Deutschland
4 x SDS Proben-Puffer	Merck, Deutschland
Whatman-Papier	Whatman-International, UK

2.1.3 Lösungen und Chemikalien

Tabelle 3: Für die Versuchsdurchführungen verwendete Lösungen und Chemikalien

Lösungen und Chemikalien	Hersteller
Formaldehyd-Lösung 35%	Hedinger, Deutschland
Eisessig (96 % (w/v) Essigsäure)	Merck, Deutschland
Servablue	Serva, Deutschland
Paraplast Plus-Gewebeeinbettungs-medium	Leica Biosystems, USA
flüssiger Stickstoff	Linde, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Ethanol 100%	Merck, Deutschland
Ethanol 96%	Merck, Deutschland
Ethanol 80%	Merck, Deutschland
Ethanol 70%	Merck, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland
Isopropanol	Serva Elektrophoresis GmbH, Deutschland
fetales Kälberserum (fetal bovine serum)	Biochrom, Deutschland
Biotin Blocking System	Dako Corporation, USA
DAB Kit – Dako Envision + System HRP (DAB)	Dako Denmark A/S
Dako Pen	Dako Corporation, USA

Material und Methoden

Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako Corporation, USA
Streptavidin-AP-conjugate	Roche Diagnostics, indianapolis, IN, USA
Streptavidin-HRP-conjugate	Dako Cytomation, Deutschland
Fuchsin + Substrate Chromogen System	Dako Corporation, USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck KgaA, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck KgaA, Deutschland
TRIZMA® Hydrochlorid	Sigma Chemical Co., USA
TRIZMA® Base	Sigma Chemical Co., USA
NaCL (Natriumchlorid), M= 58,44 g/mol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat, M=210,14g/mol	Merck KgaA, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, M= 294,10 g/mol	Merck KgaA, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid), M= 40,00 g/mol	Merck KgaA, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
HCl 37%	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Dulbecco´s PBS 1x without Ca ²⁺ +Mg	PAA Laboratories GmbH, Österreich
DMEM/F-12	Invitrogen, Deutschland
Kollagen IV (1:50)	Biochrom, Deutschland
NGF 2,5S (0,1ng/ml)	Sigma Aldrich, Deutschland
Paraformaldehydlösung	Merck, Deutschland
Penicillin, Streptomycin	Biochrom, Deutschland

2.1.4 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Tris-Puffer (pH 7,4-7,6)	68,5 g Tris-HCl (10mM) 8 g Tris-Base 87,8 g NaCl (150 mM) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und Einstellung auf pH 7,4-7,6 mit HCl/ NaOH
Citratpuffer (10mM, pH 6)	18 ml Lösung A 82 ml Lösung B 900 ml Aqua dest.
Lösung A	21,01 g Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
Lösung B	29,41 g Natriumcitrat (C ₆ H ₅ O ₇ N ₃) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Material und Methoden

Triton-X_100-Löung (0,2%)	200 µl Triton X 100 ml PBS Mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen
Target-Retrieval-Lösung (pH 9.2)	21 g Tris Base 37 g EDTA 5 ml Tween 20 1000 ml Aqua dest.
Paraformaldehydlösung 4%	4 g Paraformaldehyd mit PBS auf 100 ml auffüllen
Lysepuffer	50 mM HEPES-KOH, pH 7 150 mM NaCl 10 % Glyzerin 1 % NP-40 1 mM EGTA, pH 7 20 mM NaF 1 mM DTT 1,5 mM MgCl ₂ 1:5 Proteaseinhibitor EDTA frei
4x Ladepuffer (1,25 M Tris-HCL pH 6,8)	1 g SDS 2,5 ml 2-Mercaptoethanol 5,8 ml Glycerin (87%) 16 ml Aqua dest. 2-4 mg Bromphenolblau Mit Aqua dest. auf 25 ml auffüllen
Tankpuffer pH 8,3	3,03 g/l Tris-Base 14,4 g/l Glycin 100ml Ethanol
TST-Puffer	Für 20x TS: 24g Tris Base 175,4 g NaCl 7ml HCL (37%) auf 1 Liter 50 ml 20x TS + 500 µl Tween und auf 1 Liter auffüllen
Elektrodenpuffer pH 8,3	721,0 g Glycin 151,5 g Tris- Base 50,0 g SDS 5 Liter Aqua dest.
APS	1 g Ammoniumperoxidisulfat auf 10 ml Aqua dest. 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8)

Material und Methoden

SDS-Page Trenngel	30% Acrylamid 10% SDS 10% APS TEMED
SDS-Page Sammelgel	0,5 M Tris-HCL (pH 6,8) 30% Acrylamid 10% SDS 10% APS TEMED
Coomassie-Färbelösung	1,2 g Serva Blue 400 ml Methanol 400 ml Aqua dest. 40 ml Essigsäure
Coomassie- Entfärberlösung	10% Essigsäure (96%) 20% Methanol
ECL-Lösung-Solution A	200ml 0,1M Tris-HCL (pH 8,6) 50mg Luminol
ECL-Lösung Solution B	5,5 mg Para-Hydroxycoumarinsäure 5ml DMSO
ECL-Belichtungslösung	5ml ECL-Solution A 500µl ECL-Solution B 1,5µl Wasserstoffperoxid

2.2 Methoden

2.2.1 Beschreibung des Patientinnenkollektivs

Zur Durchführung dieser retrospektiven Studie erfolgte die Auswahl der Patientinnen anhand der Patientenakten aller zwischen 2007-2011 in der Frauenklinik der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin wegen einer symptomatischen EM operativ behandelten Frauen. Die Patientinnen wurden gezielt nach den Diagnosen der pEL und rEM ausgesucht. Die Sicherung der klinischen Diagnosen erfolgte durch die vorliegenden pathologischen Befunde der einzelnen Patientinnen, validiert durch das Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Material und Methoden

Anhand der Angaben in den vorliegenden Patientenakten konnten die Patientinnen näher klassifiziert werden (s. 2.2.2). Insgesamt wurden 85 geeignete EM-Patientinnen ausgewählt. Verschiedene Proben und Gewebe dieser Patientinnen wurden zur Bestimmung der Expression der CaBP in den unten beschriebenen Nachweisverfahren verwendet. Die verschiedenen Proben kamen in den unterschiedlichen Nachweisverfahren mehrmals zum Einsatz, um im Rahmen der Auswertung Bezüge zwischen den Ergebnissen in den einzelnen Nachweisverfahren herstellen zu können. Bei den verwendeten Proben handelt es sich zum einen um Peritonealfüssigkeiten (PF), die während operativer Eingriffe aus der Douglashöhle der Patientinnen gewonnen und zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren wurden. Des Weiteren wurden während laparoskopischer oder laparotomischer Eingriffe entfernte Endometrioseläsionen, die im Rahmen der pathologischen Diagnostik in der Pathologie des Benjamin Franklin Klinikums für 12h in 4%iger Formalinlösung inkubiert und anschließend paraffiniert wurden, verwendet. Die Entnahme aller Proben erfolgte stets nach Einwilligung der Patientinnen im Rahmen der operativen Therapie sowie gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

2.2.2 Kategorisierung der Patientinnen

Im Rahmen ihrer ambulanten und stationären Behandlung in der Frauenklinik der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin wurden die Patientinnen nach den in Verbindung mit der EM empfundenen Schmerzintensitäten und Schmerzqualitäten befragt. Anhand eines Schmerzfragebogens, den die Patientinnen während ihrer ambulanten oder stationären Behandlung ausfüllten, konnten die angegebenen Schmerzintensitäten anhand einer visuellen Analogskala und einer Schmerzskala in leichte, mittlere und starke Schmerzen eingeteilt werden. Anhand der Informationen in den jeweiligen Patientenakten ließen sich die Zyklusphasen über die letzte Periode der Patientinnen errechnen. Postmenopausale Frauen wurden ausgeschlossen. Relevante Nebendiagnosen wurden in der Auswertung berücksichtigt bzw. führten gegebenenfalls zum Ausschluss der Patientinnen.

Ebenfalls in die Auswertungen mit einbezogen wurden Symptome wie Dysmenorrhoe, zyklische und chronische Unterbauchschmerzen, das klinische Stadium der pEL oder rEM nach rASRM- und ENZIAN-Klassifikation sowie eine mögliche Hormoneinnahme.

Material und Methoden

2.2.3 Auswahl der Patientinnen für die immunhistochemischen Färbungen

Anhand der vorliegenden Patientenakten und den pathologischen Befundberichten wurden insgesamt 20 Patientinnen mit pEL und 20 mit rEM ausgewählt und die jeweiligen Gewebeblöcke aus der Pathologie angefordert. Im Rahmen der Auswertung wurden die Patientinnen nach Hormoneinnahme, Zyklusphasen, klinischem Stadium und Symptomatik unterteilt (Tab. 5 und 6). Als Kontrollgruppe für die pEL-Präparate wurden 10 Präparate gesunden Peritoneums von Patientinnen ohne EM verwendet. Für die rEM-Präparate dienten je 7 Präparate gesunden Darms und Vagina von Patientinnen ohne EM als Kontrollgruppe. Die ausgewählten Paraffinblöcke wurden geschnitten und für immunhistochemische Färbungen zum Nachweis der CaBP weiterverwendet.

Tabelle 5: Übersicht der EM-Patientinnen mit pEL

Gesamtzahl verwendeter pEL-Proben: 20	Anzahl	Prozent
Hormone	2	10,00%
ohne Hormone	17	85,00%
Proliferationsphase	5	29,40%
Sekretionsphase	12	70,50%
Klinische Klassifikation		
rASRM I	3	21,40%
rASRM II	4	28,60%
rASRM III	5	29,40%
rASRM IV	5	29,40%
Dysmenorrhoe	13	65,00%
Unterbauchschmerzen	14	70,00%
Keine Schmerzen	3	15,00%
Leichte Schmerzen	6	42,90%
Starke Schmerzen	8	57,10%

Material und Methoden

Tabelle 6: Übersicht der EM-Patientinnen mit rEM

Gesamtzahl verwendeter rEM-Proben: 20	Anzahl	Prozent
Hormone	3	15,00%
ohne Hormone	17	85,00%
<hr/>		
Proliferationsphase	6	46,20%
Sekretionsphase	7	53,80%
<hr/>		
Klinische Klassifikation		
E2a	2	10,00%
E2b	2	10,00%
E3a	4	20,00%
E3b	3	15,00%
E3c	3	15,00%
E4a	2	10,00%
E4b	2	10,00%
E4c	2	10,00%
<hr/>		
Dysmenorrhoe	16	80,00%
<hr/>		
Unterbauchschmerzen	17	85,00%
Keine Schmerzen	3	15,00%
Leichte Schmerzen	11	64,70%
Starke Schmerzen	6	35,30%

2.2.4 Auswahl der Peritonealfüssigkeiten für die Western-Blot Analyse und den Neuronalen Wachstums-Assay

Für die Western Blot-Analysen wurden insgesamt 44 PF ausgewählt. Davon 33 von Patientinnen mit histologisch gesicherter pEL und 11 von Patientinnen ohne EM. Im Rahmen der Auswertung wurden die Patientinnen auch nach Hormoneinnahme, Zyklusphasen, klinischem Stadium und Symptomatik unterteilt (Tab. 7).

Material und Methoden

Tabelle 7: Übersicht der PF für die Western-Blot Analyse

Gesamtzahl verwendeter PF: 44	Anzahl	Prozent
EM-Patientinnen	33	75,00%
<u>Patientinnen ohne EM</u>	11	25,00%
Hormone	10	22,70%
<u>ohne Hormone</u>	34	77,30%
Proliferationsphase	16	41,00%
<u>Sekretionsphase</u>	23	59,00%
<u>Klinische Klassifikation</u>		
rASRM 1	8	27,60%
rASRM 2	12	41,40%
rASRM 3	4	13,80%
<u>rASRM 4</u>	5	17,24%
<u>Dysmenorrhoe</u>	21	47,70%
<u>Unterbauchschmerzen</u>	28	63,60%
Keine Schmerzen	8	18,20%
Leichte Schmerzen	11	39,30%
Starke Schmerzen	17	60,70%

2.2.5 Auswahl der Peritonealfüssigkeiten zur Inkubation von PC12-Zellen

Für die Inkubation der PC12-Zellen wurden insgesamt 35 PF ausgewählt. 30 PF von EM-Patientinnen und 5 von Patientinnen mit ausgeschlossener EM und ohne Schmerzen. Kriterien wie eine mögliche Hormoneinnahme, Zyklusphasen und das klinische Stadium sowie Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe wurden ebenfalls berücksichtigt (Tab. 8).

Material und Methoden

Tabelle 8: Übersicht der PF zur Inkubation der PC12-Zellen

Gesamtzahl verwendeter PF: 35	Anzahl	Prozent
EM-Patientinnen	30	85,70%
Patientinnen ohne EM	5	14,28%
Hormone	4	11,40%
ohne Hormone	31	88,60%
Proliferationsphase	16	47,10%
Sekretionsphase	18	52,90%
Klinische Klassifikation		
rASRM I	2	10,50%
rASRM II	8	42,10%
rASRM III	5	26,30%
rASRM IV	4	21,10%
Dysmenorrhoe	21	60,00%
Unterbauchschmerzen	20	57,10%
Keine Schmerzen	15	42,90%
Leichte Schmerzen	10	50,00%
Starke Schmerzen	10	50,00%

2.3 Immunhistochemische Färbungen

2.3.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Mit einem Mikrotom wurden die ausgewählten Paraffinblöcke auf 1-2 µm dicke Paraffinschnitte zurechtgeschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37° C getrocknet und konnten anschließend bei 4° C gelagert oder direkt weiter verwendet werden.

2.3.2 Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Vorerst wurden die zu verwendenden Paraffinschnitte zur Entfaltung der Antikörperbindungsstellen für 2-16 Stunden bei 60° C im Backofen inkubiert. Die Entparaffinierung erfolgte für je 10 Minuten in zwei Xylol- Schritten einer absteigenden Alkoholreihe von 100-70 % und Tris-Puffer. (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4)

2.3.3 Antigendemaskierung

Die Antigendemaskierung wurde im Anschluss an die Entparaffinierung durchgeführt. Die auf Objektträger aufgebrachten Schnitte wurden in Küvetten gestellt und abhängig vom Etablierungsergebnis der einzelnen Antikörper erfolgte die Antigendemaskierung in Citratpuffer (pH 6) oder Target-Retrieval-Lösung (pH 9) in einem Dampfgerät bei 95° C für 30-40 Minuten. Die Antigendemaskierung dient der Lösung der im Rahmen der Paraffinierung entstandenen Quervernetzungen der Proteine, so dass eine Erkennung der Epitope durch Antikörper wieder möglich wird. Nach 20 minütigem Abkühlen und weiteren 10 Minuten Einwirkzeit in Tris-Puffer konnte mit dem Färbevorgang begonnen werden (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4).

2.3.4 Immunhistochemische Färbungen gegen die Calcium-bindenden Proteine S100B, Calbindin, Calretinin, Calmodulin, Parvalbumin und die neuronalen Marker PGP 9.5 und GAP 43

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, erfolgte vorerst für 10-15 Minuten eine Blockierung mittels Antibody Diluent. Kamen HRP-konjugierte Anti-

Material und Methoden

körper zur Anwendung, wurde zusätzlich die Peroxidase-Aktivität blockiert, da viele Zellen endogene Peroxidase enthalten und es zu störendem Hintergrund kommen kann. Die primären Antikörper wirkten bei Raumtemperatur je eine Stunde ein und haben im Gewebe das entsprechende Antigen gebunden (Tab. 9).

Tabelle 9: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
S 100	1:1000	Polyklonaler Kaninchen-AK	Dako Corporation,USA
Calbindin	1:200	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
Calretinin (N-18)	1:500	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
Calmodulin (N-19)	1:500	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
Parvalbumin	1:1000	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
PGP 9.5	1:600	Polyklonaler Kaninchen-AK	Dako Corporation,USA
GAP 43	1:10000	Polyklonaler Maus-AK	Sigma-Aldrich Co., USA

Die biotinylierten sekundären Antikörper haben sich während der 45 minütigen Einwirkzeit an den primären Antikörper, gegen den sie gerichtet sind, gebunden und markieren so den Antigen-Primärantikörper-Sekundärantikörper-Komplex (Tab 10).

Tabelle 10: In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
Biotin-SP-konjugierter Affinipure Maus anti-Kaninchen IgG	1:400	Maus-AK	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Biotin SP konjugierter Affinipure Kaninchen anti-Ziege IgG	1:400	Kaninchen-AK	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Biotin SP konjugierter Affinipure Kaninchen anti-Maus IgG	1:400	Kaninchen-AK	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK

Das darauf folgende farbgebende Streptavidin bildete während der 40 Minuten Einwirkzeit mit dem Biotin eine sehr starke Verbindung und dient in der Reaktionskette der Signalverstärkung. Die Antikörper und die Streptavidine wurden vorab mit einem Antibody Diluent auf die für die Antikörper optimalen Kon-

Material und Methoden

zentrationen verdünnt. Zwischen allen Schritten erfolgten Spülschritte mittels Tris-Puffer. Die Färbungen wurden je nach Eignung der zu färbenden Antikörper im Fuchsin-Substrate-Chromogen-System oder 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Färbesystem durchgeführt. Die Einwirkzeiten lagen zwischen 8-15 Minuten. Beide unterscheiden sich hinsichtlich des im Verlauf des Färbeprozesses benötigten Färbungssubstrats. Antikörper, die mit Fuchsin gefärbt werden, benötigen Phosphatase (AP)-Streptavidin, während Antikörper, die über das DAB-System angefärbt werden Horseradish Peroxidase (HRP)- Streptavidin bedürfen.

Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für ca. 20 Sekunden. Nach ausgiebigem Spülen in Aqua dest. trockneten die Schnitte und konnten mittels Glycerin und Deckgläsern eingedeckelt werden, um anschließend mikroskopisch ausgewertet zu werden.

Die Etablierung der einzelnen Färbungen erfolgt anhand von ausgewählten Positivkontrollen wie Dünndarm, Niere, Uterus, Hoden und Pankreas.

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurden bei jedem Färbedurchgang Negativkontrollen mit gefärbt. Dazu wurde der Primärantikörper durch Tris-Puffer ersetzt. Des Weiteren wurden in jedem Färbedurchgang die ebenfalls zur Etablierung verwendeten Positivkontrollen mitgeführt (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4).

2.3.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die gefärbten Präparate wurden einzeln unter dem Axiophot Lichtmikroskop analysiert und zur Dokumentation mit der Canon Powershot G5 fotografiert. Mittels Hot-Spot-Methode (Weidner et al., 1991) wurden in 20 pEL-Präparaten und 20 rEM-Präparaten die positiven NF-Dichten nahe EM-Läsionen und in der Peripherie, die definitionsgemäß mindestens 4 mm von einer Läsion entfernt liegen muss, ausgezählt. Nach einer ersten Begutachtung des auszuwertenden Präparates in einer niedrigen Vergrößerung (100 fach), wird der Bereich mit der scheinbar größten NF-Dichte (Hot-Spot) aufgesucht. In mehreren Hot-Spots wird die Dichte der NF pro mm² ausgezählt. Zum Vergleich wurden 10 Präparate gesunden Peritoneums und je 7 Präparate gesunden Darms und Vagina nach selbiger Methode ausgewertet. Die Präparate der rEM wurden ebenfalls mittels Hot-Spot-Methode, aber zusätzlich zur genaueren Klassifizierung nach den anatomischen Schichten des Darms, die

Material und Methoden

ebenfalls in den Präparaten der rEM nachweisbar waren, unterteilt. Die Einteilung erfolgte nach Submucosa, Muscularis und Mesocolon und wurde auch im Rahmen der statistischen Auswertungen beibehalten. Selbige Schichten fanden in der Auswertung des gesunden Darms Berücksichtigung.

Das Zählen positiver NF in der rEM bedurfte die Berücksichtigung der sich in der Submucosa und Muscularis des Darms befindenden enterischen Plexus. Um nicht mögliche Ausläufer der für alle gefärbten Antikörper positiven Plexus zu zählen, wurde ein Sicherheitsabstand von 2 mm eingehalten. Im Anschluss wurden die ermittelten NF-Dichten nahe den Läsionen und in der Peripherie der pEL- und rEM-Präparate statistisch ausgewertet.

2.4 Kultivierung und Inkubation von Phäochromozytomzellen

Als Modell humaner Nervenzellen dienten Phäochromozytomzellen (PC12-Zellen), die aus der Arbeitsgruppe um Dr. Kontou aus dem Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin bezogen wurden. PC12-Zellen sind Zellen eines benignen hormonell aktiven Tumors des Nebennierenmarks oder der sympathischen Paraganglien. Mit der Inkubation dieser Zellen in PF von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM sollte festgestellt werden, ob durch die Inkubation der PC-12 Zellen eine endogene Expression von CaBP in den PC-12 Zellen provoziert werden kann bzw. ob die PF der EM-Patientinnen Einfluss auf die Expression der CaBP nimmt. Hierzu wurden die ausgewählten Patientinnen in 4 Gruppen gepoolt (Tab. 11). Die Zellreihen und die im Rahmen der Western-Blot Analyse dieser Arbeit verwendeten Pools wurde von der Diplomandin Frau Stefanie Helbig und der medizinischen Doktorandin Frau Nina Pauly, die ebenfalls im Endometrioselabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin tätig sind, her- und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle Arbeiten im Rahmen der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

2.4.1 Ansetzen der Zellkultur

In einem ersten Schritt wurde das benötigte Medium angesetzt. Hierbei handelte es sich um das Nährmedium DMEM unter Zugabe von 10 % Pferdeserum, 5 % fetalem Kälberserum sowie 1 % Penicillin/Streptomycin. Während die zu verwendende Zellkultur aufgetaut wurde, wurden vier Tubes á 10 ml des Mediums im Wasserbad bei

Material und Methoden

37° C erwärmt. In das erste der vier Tubes wurden die aufgetauten Zellen gegeben. Um das im Einfriermedium enthaltene, toxisch wirkende DMSO auszuwaschen, wurden die Zellen zentrifugiert und das entstandene Pellet abgesaugt und in ein weiteres mit Medium gefülltes Tube überführt. Diese Wasch- und Überführungsschritte wurden in allen vier Tubes wiederholt. Anschließend wurde die Suspension in eine Kulturflasche gegeben und unter dem Mikroskop kontrolliert. (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4)

2.4.2 Zellpassagierung

Erneut wurde frisches Medium im Wasserbad bei 37° C erwärmt. Währenddessen wurden die konfluent gewachsenen Zellen bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, so dass anschließend das überstehende Medium abgezogen werden konnte. Mittels einer Spritze mit Kanüle wurden die in der Kulturflasche verbliebenen Zellen vereinzelt und in eine mit frischem Medium gefüllte Kulturflasche überführt. Es erfolgte erneut eine mikroskopische Kontrolle.

2.4.3 Kryokonservierung

Um die bis zu 80-90 % konfluent gewachsenen Zellen einzufrieren, wurden die Zellen bei 900 rpm 15 Minuten lang zentrifugiert und anschließend das Medium abgesaugt. Je nach Größe des Zellpellets wurden die Zellen verteilt auf 3-5 Kryoröhrchen in je 1,5 ml Einfriermedium bestehend aus 10 % DMSO, 20 % FCS und 70 % des Nährmediums DMEM resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst für 2-3 Tage bei -80° C gelagert und anschließend bei -150° C gelagert.

2.4.4 Inkubation der Phäochromozytomzellen in Peritonealfüssigkeiten von Endometriosepatientinnen und Patientinnen ohne Endometriose

Um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten wurden 2 Kulturflaschen in je ein Tube von 24 ml zusammengeführt. Bei 25° C wurde das Tube für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend das Medium bis auf 7,5 ml entnommen. Nach Erwärmung wurden erneut 4,5 ml frisches Medium dazugegeben. Nach Resuspension des Pellets über eine Spritze mit Kanüle konnten die Wells einer 12-Well Platte mit 900 µl bzw. 1000 µl für die Negativkontrolle gefüllt werden. Pro Well wurden 100 µl

Material und Methoden

der ausgewählten PF dazugegeben und für 5 Tage inkubiert. Es wurden je 10 PF von EM-Patientinnen ohne, mit leichten und mit starken Schmerzen ausgewählt. Als Kontrollgruppe dienten vier PF von Patientinnen ohne EM und ohne Schmerzen. Die Negativkontrolle bestand aus reiner Zellsuspension. Der Positivkontrolle wurde zusätzlich 100 µl NGF (0,1 ng/ml NGF) zugegeben. Durch das Zusammenführen der Kulturflaschen und das genaue Auffüllen auf 12 ml, konnte davon ausgegangen werden, dass sich in jedem Well die gleiche Zellmenge befindet.

2.4.5 Vorbereitung der in Peritonealflüssigkeiten inkubierten PC12-Zellen für die Western-Blot Analyse

Für die Western Blot-Analyse wurden die vorab in verschiedenen PF inkubierten Zelllysate in vier Gruppen gepoolt (Tab. 11). Die Bildung der Pools erfolgte für die symptomatische EM nach leichter und starker Schmerzintensität. Zwei weitere Pools standen für EM ohne Schmerzen und dem Fehlen von EM ohne Schmerzen. Drei der vier Pools setzten sich jeweils aus zehn verschiedenen Zelllysaten zusammen, die in zehn verschiedenen PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden. Für den Pool ohne EM wurden fünf Zelllysate in fünf verschiedenen PF inkubiert. Die Versuchsdurchführung entsprach der unter 2.3 beschriebenen Western-Blot Analyse.

Tabelle 11: Übersicht der gepoolten PC12-Zellen, die in PF von EM-Patientinnen (EM) und Patientinnen ohne EM (kEM) inkubiert wurden

Pool	Schmerzintensität
1	kEM ohne Schmerzen
2	EM ohne Schmerzen
3	EM mit leichten Schmerzen
4	EM mit starken Schmerzen

2.4.6 Bestimmung der Zellzahl

Mittels Trypanblaufärbung erfolgte die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer (0,1 µl). Somit wurde die Zählung der avitalen, blau gefärbten Zellen mikroskopisch möglich. Die Gesamtzellzahl wurde mit folgender Gleichung berechnet.

$$Cz = X \cdot 10^4 \cdot V$$

CZ: Zellzahl

X: Zellzahl in 0,1 µl

V: Verdünnungsfaktor

2.5 Western-Blot Analysen

2.5.1 Proteinextraktion aus Mausgehirngewebe

Als Positivkontrolle der in der Western-Blot Analyse untersuchten CaBP diente ein Mausgehirnlysat. Es erfolgte die Präparation der Mausgehirne, Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80° C. Zur Extraktion der Proteine wurde das Gehirngewebe in 2 ml Lysepuffer inkubiert, auf Eis homogenisiert und das Homogenisat anschließend für 30 Minuten bei 14000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, darin die Proteinkonzentration mittels des BCA Protein Assay Reagentkit ermitteln und anschließend in Aliquots á 1 ml gefühlt und bei -80° C gelagert.

2.5.2 Proteinbestimmung

Vorab wurden mittels BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Reagentkit dreimalig die Proteinkonzentrationen der ausgewählten PF nach Herstellerangaben bestimmt. Als Referenzstandard wurde Rinderserumalbumin eingesetzt. Die Extinktion der Proben wurde bei 562 nm unter Einsatz eines Photometers bestimmt. (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4)

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

In Abhängigkeit des Molekulargewichts der zu analysierenden Proteine wurden in einer entsprechenden Glasspacer-Vorrichtung ein 12 % Polyacrylamid-Trenngel und ein 5 % Polyacrylamid-Sammelgel hergestellt (Tab. 12). Bevor die PF bzw. die vorab in PF inkubierten PC12-Zellysate aufgetragen werden konnten, wurden sie zur

Material und Methoden

Denaturierung ihrer Proteine für 3-5 Minuten bei 95° C in einem Thermomixer gekocht und anschließend mit einem 4x Ladepuffer verdünnt (0,25 µg/µl). Leere Taschen wurden mit 10x Ladepuffer beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte innerhalb 45-60 Minuten im Elektrophoresekommer Mini-Protean® 3 Cell System unter Verwendung eines Elektrodenpuffers zunächst bei 80 V durch das Sammelgel und anschließend bei 120 V durch das Trenngel. Als molekularer Massenstandard diente der Proteinstandard Prestained Protein Ladder. Für die Analyse der CaBP diente verdünntes Mausgehirnlysate als Positivkontrolle (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4).

Tabelle 12: Zusammensetzung der in den Western-Blot Analysen verwendeten Polyacrylamidgele

12 % Trenngel	für 10ml	5 % Sammelgel	für 3 ml
Aqua dest.	3,28 ml	Aqua dest.	1,57 ml
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	2,5 ml	0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	0,83 ml
30 % Acrylamid	4,0 ml	30 % Acrylamid	0,53 ml
10 % SDS	100 µl	10 % SDS	33,3 µl
10 % APS	100 µl	10 % APS	33,3 µl
TEMED	13,4 µl	TEMED	6,7 µl

2.5.4 Western-Blot Analyse der Calcium-bindenden Proteine S100B, Calbindin und Calretinin

Zur Immunodetektion wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine vorab mit einem 1:2 Ethanol-H₂O-Gemisch behandelte und für 10 Minuten in einem Tankpuffer äquilibrierte PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen. Die Übertragung erfolgte in einem sogenannten „Sandwich“ bestehend aus Schwämmen, Whatman-Papier, Polyacrylamidgel, PVDF-Membran und weiterem Whatman-Papier sowie Schwämmen. Das Blotting erfolgte in einer mit Tankpuffer befüllten und gekühlten Blotting-Einheit für 30-40 Minuten bei 100 V.

Der stattgefunden Proteinttransfer vom Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran wurde anschließend mittels Coomassie-Färbung der Gele und Ponceau-Färbung der PVDF-Membran kontrolliert. Bei erfolgreichem Transfer wurde die PVDF-Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4° C in 1x TST-Puffer inkubiert und nach 16 Stunden mit den regelrecht verdünnten Primärantikörpern für je 60 Minuten (Tab. 13) und anschließend mit den entsprechenden Peroxidase-

Material und Methoden

konjugierten Sekundärantikörpern (Tab. 14) für ebenfalls 60 Minuten behandelt. Zwischen den Antikörperinkubationen wurde die PVDF-Membran 3x je für 10 Minuten mit TST-Puffer gespült und abschließend für mindestens 1 Stunde in TST-Puffer gewaschen (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen Tab. 4).

Tabelle 13: In der Western-Blot Analyse verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
S 100	1:1000	Polyklonaler Kaninchen-AK	Dako Corporation, USA
Calbindin	1:1000	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
Calretinin (N-18)	1:1000	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
Beta-Actin	1:1000	Monoklonaler Maus-AK	Abcam, USA

Tabelle 14: In der Western-Blot Analyse verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
Peroxidase konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	1:10000	Ziegen-AK	Jackson Immuno Research, UK
Peroxidase konjugierter Kaninchen anti-Ziege IgG	1:10000	Kaninchen-AK	Jackson Immuno Research, UK
Peroxidase konjugierter Kaninchen anti-Maus	1:10000	Kaninchen-AK	Jackson Immuno Research, UK

Die verwendeten Antikörper wurden mit 1x TST-Puffer auf die, im Rahmen der Etablierung ermittelten, optimalen Konzentration verdünnt. Des Weiteren wurden die Membranen in jedem Versuchsdurchgang zusätzlich mit dem Anti-Beta-Actin Antikörper behandelt. Als ein in allen Zellen vorkommendes Protein des Zytoskeletts, das auch nach Zelllyse im Lysat in relativ konstanten Konzentrationen vorliegt, eignet sich Beta-Actin als ideale Ladungskontrolle. Die Verwendung des Anti-Beta-Actin Antikörpers ermöglichte damit eine Normalisierung der Intensität der Proteinbanden im Rahmen der Auswertung. Somit wurden auch mögliche Fehler bei der Proteinauftragung berücksichtigt.

Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde die PVDF-Membran für 2-3 Minuten mit

Material und Methoden

einer nach Herstellerangaben gemischten ECL (enhanced chemiluminescence)-Belichtungslösung behandelt. In einer Dunkelkammer wurde anschließend ein Röntgenfilm auf die sich in einer Filmkassette befindende Membran gelegt. Je nach Intensität der Signale geschah dies für mindestens 10 Sekunden bis maximal 5 Minuten. Der Film wurde anschließend in einer automatisierten Entwicklermaschine entwickelt und mit Hilfe der ImageJSoftware ausgewertet (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4).

2.6 Neuronaler Wachstums-Assay sensibler Hinterwurzelganglien

2.6.1 Vorbereitung der Eier

Bevor die sensiblen Hinterwurzelganglien per Präparation gewonnen werden konnten, mussten die befruchteten Valo SPF Eier für 9-11 Tage in der Brutmaschine Modell 3000 bei 37° C und 60 % Luftfeuchtigkeit bebrütet werden.

2.6.2 Präparation der sensiblen Hinterwurzelganglien

Nach abgeschlossener Bebrütung wurden die Eier vor Präparation alkoholisch desinfiziert und mit einer Pinzette vom stumpfen Ende her eröffnet. Die Hühnerembryonen wurden mittels einer sterilen Pinzette entnommen und sofort dekapitiert. Die Körper wurden in eine eisgekühlte und PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gefüllte Petrischale überführt und zur Freilegung der sensiblen Hinterwurzelganglien unter dem Binokular Wild M8 längs eröffnet. Um Sicht auf die Wirbelsäule zu erhalten wurden die Organe kopfwärts geschoben. So konnten die sich an den Wirbelkörperanlagen befindlichen sensiblen Hinterwurzelganglien erreicht und mit einer feinen Pinzette präpariert werden. Die gewonnenen Hinterwurzelganglien wurden in einer weiteren mit PBS gefüllten Petrischale gesammelt und gegebenenfalls von Bindegewebsresten befreit.

2.6.3 Inkubation sensibler Hinterwurzelganglien in Peritonealfüssigkeiten von Endometriosepatientinnen und Patientinnen ohne Endometriose

Zur Kultivierung der gewonnenen sensiblen Hinterwurzelganglien wurden diese in ein achtkammeriges Lab-Tek® Chamber Slide™ System überführt. Je 2-3 Hinter-

Material und Methoden

wurzelganglien wurden in die vorab zur besseren Haftung der Hinterwurzelganglien mit Kollagen IV (Verdünnung 1:50) beschichteten Kammern gegeben. In jede Kammer wurde die PF einer EM-Patientin oder Patientin ohne EM sowie das Nährmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-F12 im Verhältnis 1:1 gegeben. In jedem Kultivierungsdurchgang wurden eine Positivkontrolle, dessen Kammer mit 0,1 ng/ml NGF 2.5S in 250 µl DMEM-F12 gefüllt wurde und eine Negativkontrolle, in deren Kammer das reine Nährmedium DMEM-F12 gegeben wurde, mitgeführt. Anschließend wurden die Lab-Tek® Chamber Slide™ Systeme für 48 Stunden im Brutschrank bei 37° C unter 5 % Co₂ Begasung kultiviert. Um einen Mittelwert errechnen zu können, wurde der Versuch für die verwendeten PF dreimal wiederholt (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4).

2.6.4 Auswertung der Nervenfaseraussprossung

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die in den PF inkubierten sensiblen Hinterwurzelganglien unter dem Axiovert 25 Lichtmikroskop hinsichtlich der während der Inkubation stattgefundenen Nervenassprossung beurteilt und fotografiert. Die Bewertung erfolgte anhand eines neuronalen Wachstums-Scores (NWS) von 0-3, wobei 0 keine Nervenassprossung, eine 1 die Assprossung einzelner neuer NF, der Wert 2 ein Assprossungssaum von ungefähr einem Viertel des Gangliendurchmessers und die 3 eine Assprossung neuer NF um mehr als die Hälfte des Gangliendurchmessers bedeutete.

2.6.5 Fixierung der sensiblen Hinterwurzelganglien

Nach Auswertung der NF-Assprossung der Hinterwurzelganglien wurden die Versuchsmedien in den Kammern des Lab-Tek® Chamber Slide™ Systems vorsichtig abgesaugt und je 2x mit PBS-Lösung gespült. Daraufhin wurden die Ganglien in den Kammern in je 200 µl 4 % Paraformaldehydlösung ca. 8 Minuten lang inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS-Lösung erfolgte eine weitere Inkubation der Ganglien mit je 200 µl 0,2 % Triton-X-100-Lösung für 10 Minuten. Dieser Schritt führte eine Permeabilität der Zellmembran für die zu färbenden Antikörper herbei. Abschließend wurde erneut mit PBS-Lösung gewaschen und das

Material und Methoden

Lab-Tek® Chamber Slide™ System mit den fixierten Ganglien bei -20° C gelagert. (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4)

2.6.6 Immunfluoreszenzfärbung sensibler Hinterwurzelganglien gegen die Calcium-bindenden Proteine S100B, Calbindin, Calretinin und Parvalbumin

Zum qualitativen Nachweis der CaBP-Expression in sensiblen Hinterwurzelganglien erfolgte direkt im Anschluss der Fixierung bzw. direkt nach dem Auftauen der zu färbenden Ganglien die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit FCS für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Nach Absaugen des FCS konnte der Primärantikörper (Tab. 15) in seiner entsprechenden Verdünnung für 1 Stunde bei RT aufgetragen werden. Nach zwei Waschschritten mit Tris-Puffer erfolgte im Dunkeln die Inkubation des Sekundärantikörpers (Tab. 16) für 1 Stunde bei RT. Es folgten zwei abschließende Waschschrritte mit Tris-Puffer und das Auftragen von Dapi Fluoromount G.

Tabelle 15: Für die Immunfluoreszenz verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
S 100B	1:400	Polyklonaler Kaninchen-AK	Dako Corporation, USA
Calbindin	1:10000	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
Calretinin (N-18)	1:10000	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland
Parvalbumin	1:10000	Polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology, INC., Deutschland

Tabelle 16: Für die Immunfluoreszenz verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
Rhodamine Red X anti-Ziege IgG	Polyklonaler Esel 1:100	Esel-AK	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Polyklonaler Ziege anti-Kaninchen (H&L), Cy2	IgG 1:100	Ziegen-AK	Koma Biotech, Korea
Polyclonaler Esel anti-Ziege IgG, Cy2	1:100	Esel-AK	Lifespan Biosciences

Material und Methoden

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse aufgrund unspezifischer Antikörperbindungen wurde in jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle mitgeführt, in dem der Primärantikörper durch PBS-Lösung ersetzt wurde. (Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen s. Tab. 4)

Zur Auswertungen wurden die Ganglien unter dem Axiophot Fluoreszenzmikroskop analysiert und mit der Canon Powershot G5 fotografiert. Alle Antikörper wurden mit einem Background Reducing Antibody Diluent verdünnt angesetzt.

2.7 Statistische Auswertungen

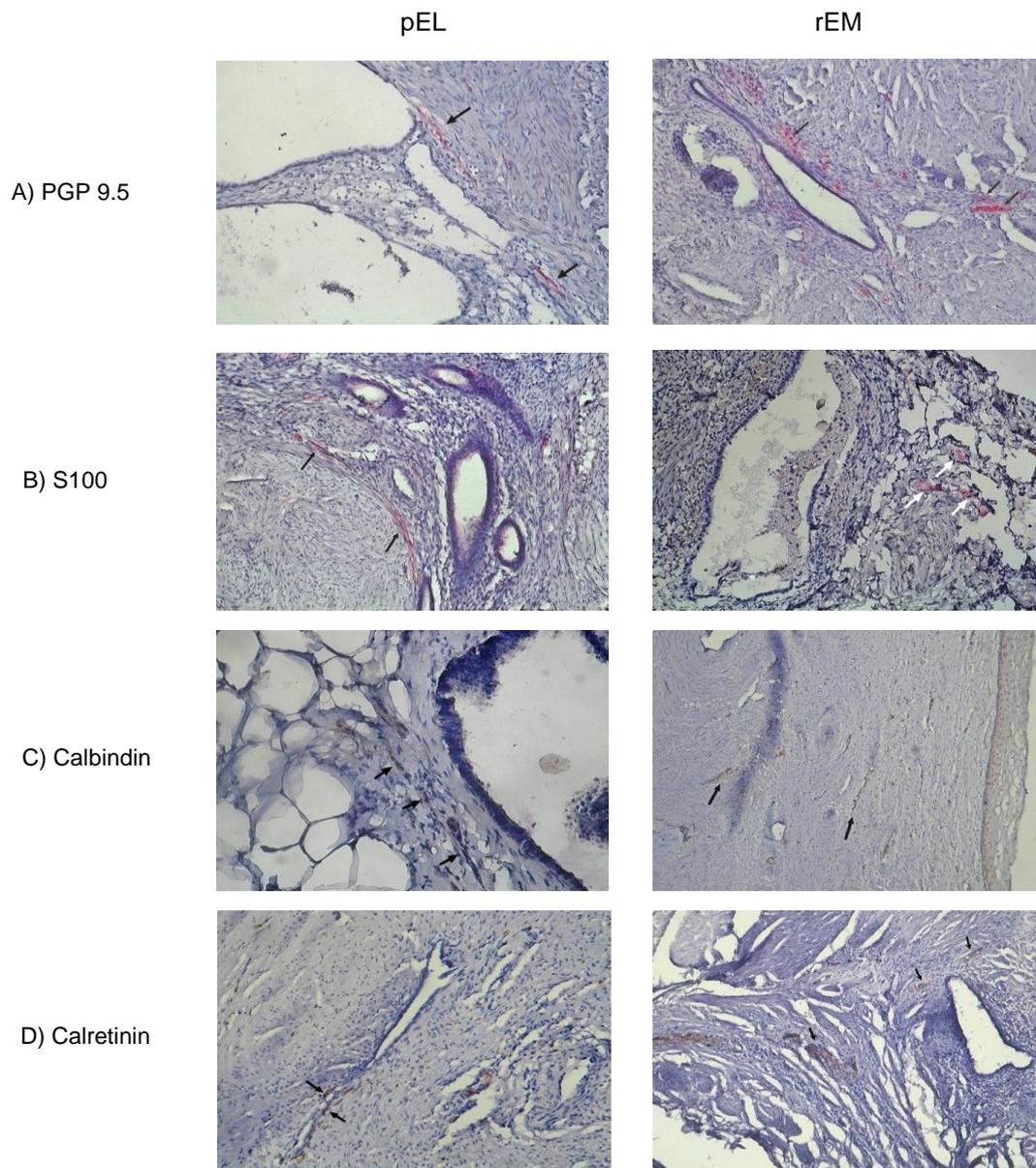
Die im Rahmen der Western-Blot Analyse, des Neuronalen Wachstums-Assays und der Immunhistochemie ermittelten Daten wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, 2003, San Diego, USA) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung bzw. bei fehlender Normalverteilung der zu analysierenden Daten als Mediane angegeben. Zur statistischen Auswertung der Daten kamen verschiedene statistische Testverfahren zur Anwendung. Ergebnisse mit einem $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant festgelegt.

Grundlegend kam zur Auswertung zweier unabhängiger Variablen der Mann-Whitney Test als nichtparametrischer Test zum Einsatz. Zum Vergleich von mehr als zwei unabhängige Variablen wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Post Hoc Test nach Dunn (Dunn`s Multiple Comparison Test) angewandt. Galt es mehrere Gruppen zu vergleichen, wurden die Daten nach Überprüfung auf Normalverteilung der zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two-way ANOVA) mit einem Signifikanzniveau von 95 % unterzogen. Mittels des Post Hoc Tests nach Bonferroni (Bonferroni Multiple Comparison Test) erfolgte anschließend ein paarweiser Datenvergleich.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Charakterisierung Endometriose-assoziierter Nervenfasern

Da das Vorkommen von CaBP hauptsächlich in NF beschrieben ist, wurden im Rahmen der mikroskopischen Auswertung der Immunhistochemie nur die NF berücksichtigt. Es stellten sich EM-assoziierte NF dar. In Epithel- und Stromazellen der Endometrioseläsionen zeigte sich ein gering positives und eher unspezifisches Färbesignal. Abbildung 2 zeigt exemplarisch das Färbeverhalten der verwendeten Antikörper in NF der pEL und rEM nahe Endometrioseläsionen im Überblick.



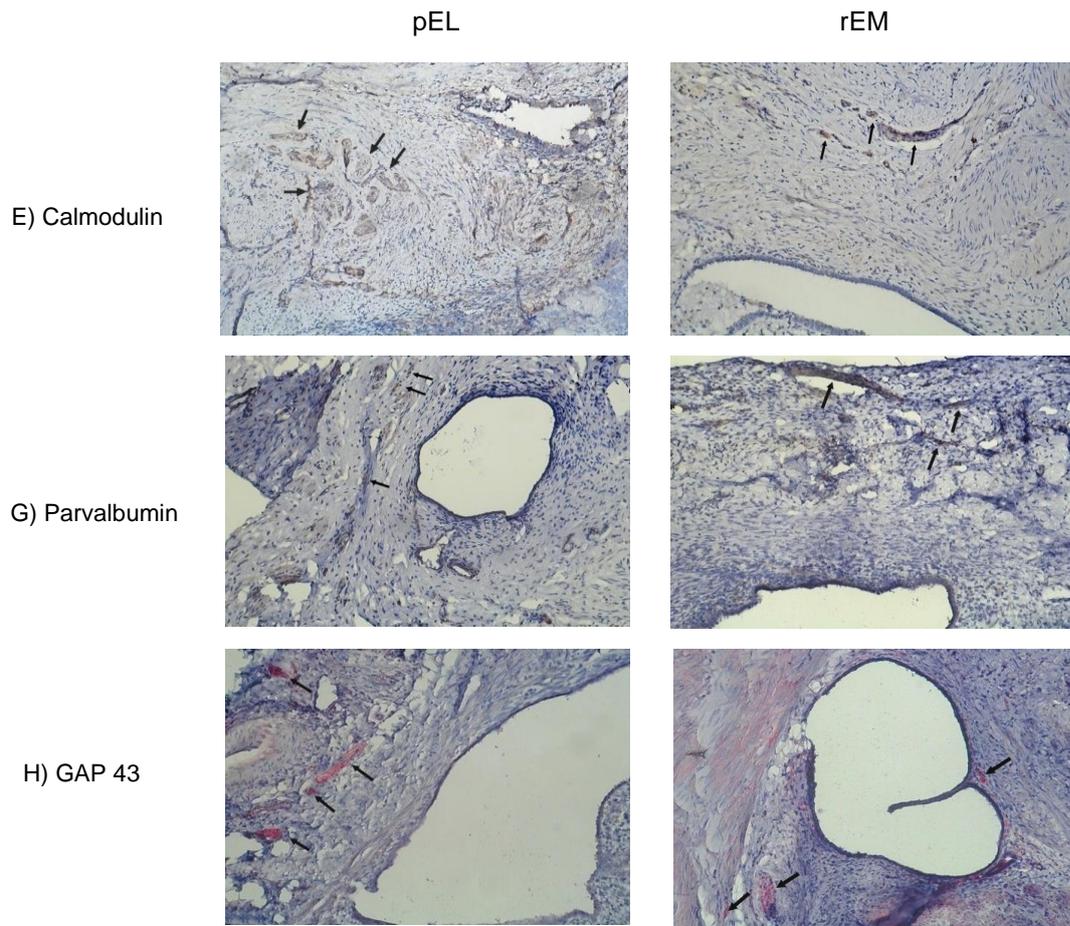


Abbildung 2: Überblick der verwendeten Antikörper PGP 9.5, der Calcium-bindenden Proteine und GAP 43 in der pEL und rEM. Die Pfeile zeigen auf jeweils für die verschiedenen Antikörper positive Nervenfasern in pEL und rEM nahe Endometrioseläsionen.

Ergebnisse

Die mikroskopische Auswertung ergab, dass mit dem Panmarker PGP 9.5 (für intakte NF) insgesamt in 39 der 40 verwendeten EM-Präparate Nervenfasern nachweisbar waren. Mit dem Marker S100B (für myelinisierte NF) konnten in 37 der 40 EM-Präparate Nervenfasern nachgewiesen werden. Jedoch waren nicht alle dieser NF positiv für die CaBP. Tabelle 17 zeigt die Anzahl der gefärbten EM-Präparate, in denen CaBP-positive NF nachgewiesen werden konnten aufgelistet nach Art der EM.

Tabelle 17: Charakterisierung CaBP-positiver Endometriose-assoziiierter Nervenfasern

Patientinnen mit positiven Nervenfasern (in %)			
	Endometriose (n=40)	pEL (n=20)	rEM (n=20)
PGP 9.5	39 (97,5%)	20 (100.0%)	19 (95.0%)
S 100	37 (92,5%)	18 (90.0%)	19 (95.0%)
Calbindin	20 (50%)	11 (55.0%)	9 (45.0%)
Calretinin	24 (60%)	10 (50.0%)	14 (70.0%)
Calmodulin	38 (95%)	19 (95.0%)	19 (95.0%)
Parvalbumin	17 (42,5%)	9 (45.0%)	8 (40.0%)
	Endometriose (n=34)	pEL (n=15)	rEM (n=19)
GAP 43	29 (72,5%)	14 (93.3%)	15 (78.9%)

3.2 Nervenfaserdichte intakter Nerven in peritonealer und rectovaginaler Endometriose

Zur Quantifizierung der reinen NF-Dichte in den verwendeten Präparaten von EM-Patientinnen sowie des gesunden Peritoneums, Darms und Vagina, wurden die Präparate mit dem Panmarker PGP 9.5 gefärbt. Somit konnte eine Aussage über die Dichte intakter Nervenfasern in den Präparaten getroffen werden.

3.2.1 Expression von PGP 9.5 in Nervenfasern der peritonealen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 20 von 20 (100 %) Präparaten der pEL PGP 9.5-positive NF nachweisen (Abb. 3). Im Rahmen der PGP 9.5-Auswertung ergab sich für den direkten Vergleich der NF-Dichten der pEL ($5,39 \pm 1,91$ NF/mm²) und dem gesunden Peritoneum von Patientinnen ohne Endometriose ($6,92 \pm 1,18$ NF/mm²) kein signifikanter Unterschied, $p > 0,05$. Betrachtet man die Läsionen und die Peripherie der Präparate separat, dann ließ sich in der Peripherie von pEL ($4,80 \pm 1,28$ NF/mm²) eine signifikant niedrigere Nervenfaserdichte als im gesunden Peritoneum ($6,93 \pm 1,53$ NF/mm²) nachweisen (Abb. 4).

Hinsichtlich der die Läsionen umgebenden NF ($6,58 \pm 2,95$ NF/mm²) ergab sich nahe den Läsionen eine signifikant höhere PGP 9.5-positive Nervenfaserdichte als in der Peripherie ($4,80 \pm 1,28$ NF/mm²), $p < 0,05$ (Abb. 4).

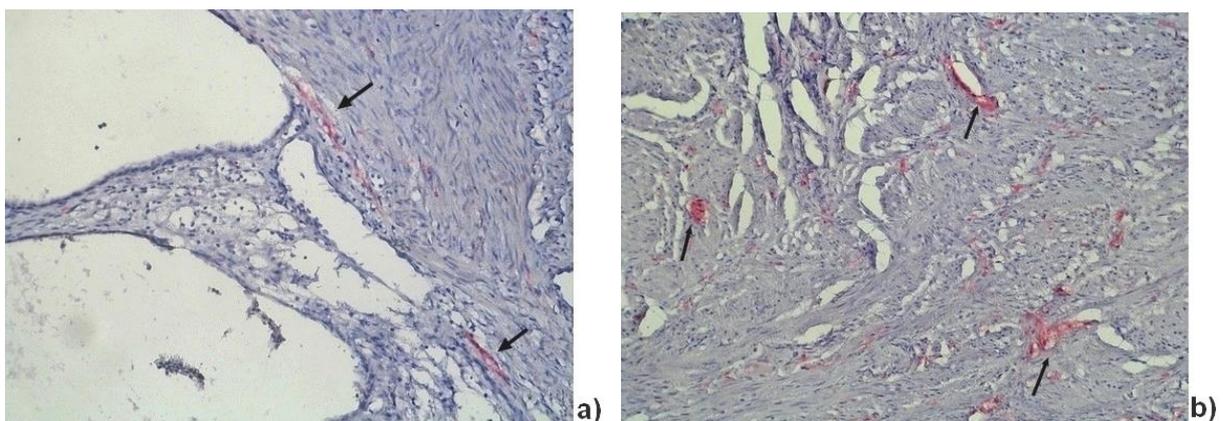


Abbildung 3: Immunhistochemische Darstellung PGP 9.5-positiver NF in pEL. Positive NF nahe einer Läsion in pEL a) und in der Peripherie von pEL b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 100 und 200 fache Vergrößerung.

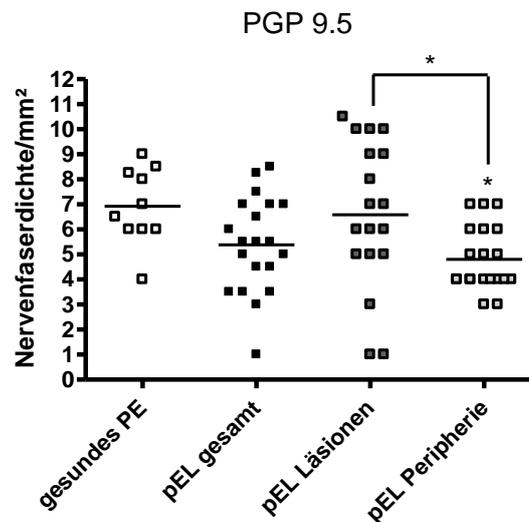


Abbildung 4: PGP 9.5-positive NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum. Es erfolgte ein Vergleich der pEL (n=20) und des gesunden Peritoneums (n=10) sowie der Läsionen (n=18) und der Peripherie der pEL (n=20) und des gesunden Peritoneums (n=10). *= $p < 0,05$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Test und anschließendem Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

3.2.2 Expression von PGP 9.5 in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 19 von 20 (95 %) Präparaten der rEM PGP 9.5-positive NF nachweisen (Abb. 5). Für die rEM ergaben sich zwischen den anatomischen Schichten der rEM, dem gesunden Darm und der gesunden Vagina keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$ (Abb. 6). Insgesamt ließen sich NF in einer geringeren Zahl als in der pEL und dem gesunden Peritoneum nachweisen. Auch zwischen den Läsionen und der Peripherie der rEM fanden sich keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$. (Abb. 6).

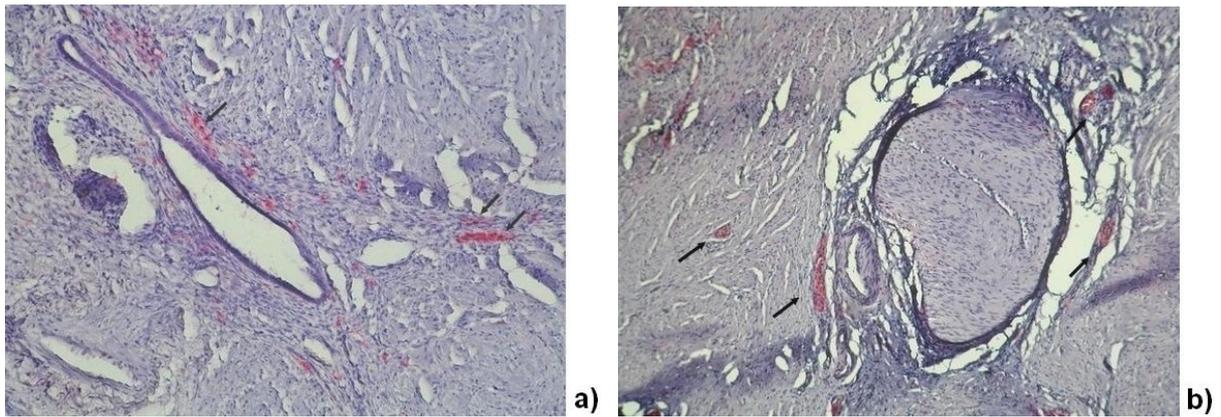


Abbildung 5: Immunhistochemische Darstellung PGP 9.5-positiver NF in rEM. Positive NF nahe einer Läsion in rEM a) und in der Peripherie von rEM b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 100fache Vergrößerung.

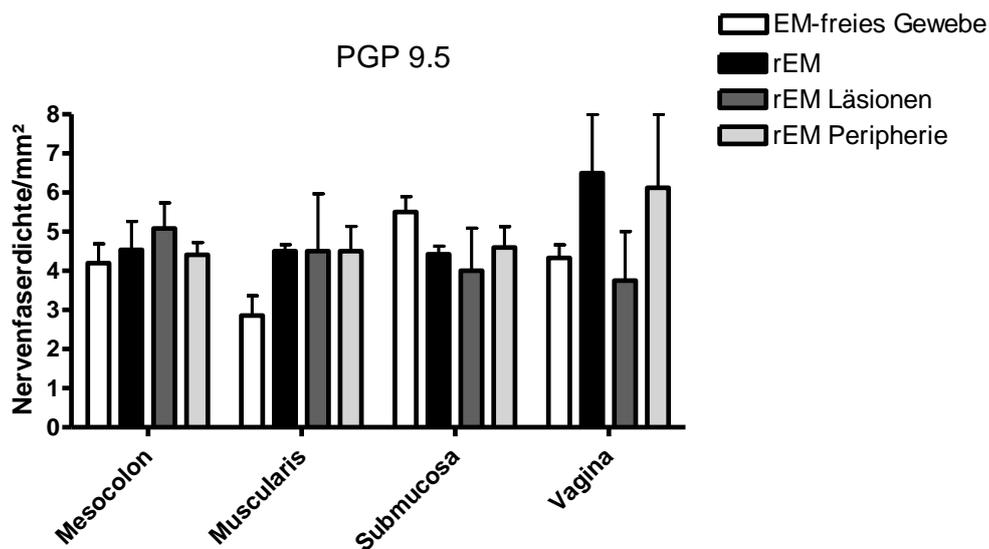


Abbildung 6: PGP 9.5-pos. NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den anatomischen Schichten der rEM (n=19) sowie den läsionsnahen und peripheren Anteilen (n=19) und denen des gesunden Darm (n=10) sowie der gesunden Vagina. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.3 Nervenfaserdichte myelinisierter Nerven in peritonealer und rectovaginaler Endometriose

3.3.1 Expression von S100B in Nervenfasern der peritonealen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 18 von 20 (90 %) Präparaten der pEL S100B-positive NF nachweisen (Abb. 7). Für S100B ergaben sich in der IHC zwischen pEL ($3,69 \pm 1,96$ NF/mm²) und dem gesunden Peritoneum ($3,10 \pm 1,79$ NF/mm²) keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$. Auch betrachtet nach Läsionen ($3,95 \pm 2,41$ NF/mm²) und Peripherie der pEL ($3,43 \pm 1,40$ NF/mm²) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, $p > 0,05$ (Abb. 8).

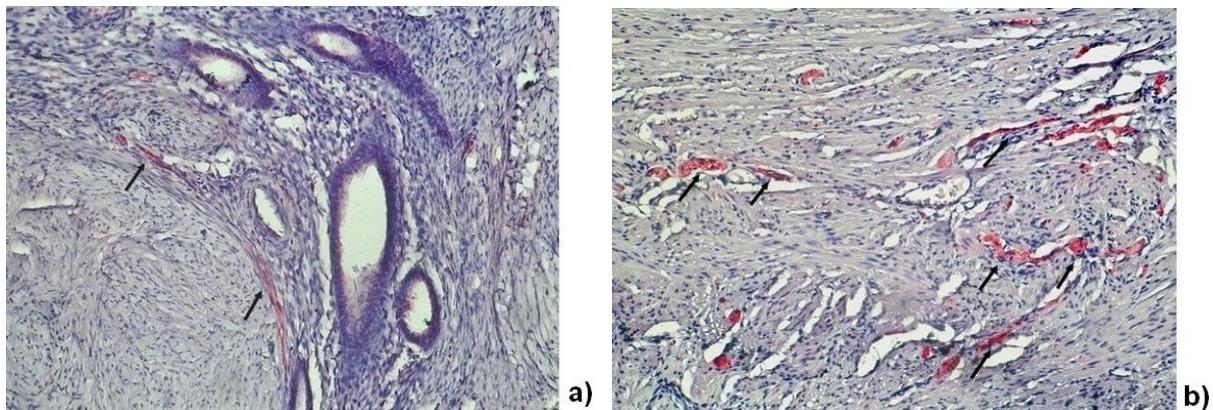


Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung S100B-positiver NF in pEL. Positive NF nahe einer Läsion in pEL a) und in der Peripherie von pEL b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 100 und 200 fache Vergrößerung.

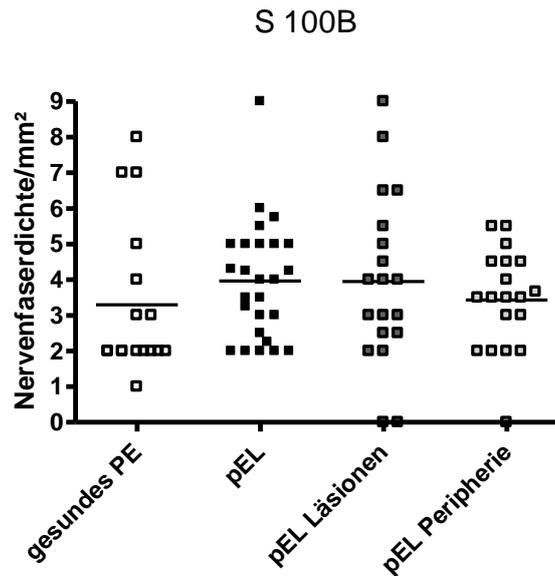


Abbildung 8: S100B-pos. NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum. Es erfolgte ein Vergleich der pEL (n=18) und des gesunden Peritoneum (n=10) sowie der Läsionen (n=17) und der Peripherie der pEL (n=18) und des gesunden Peritoneums (n=10). Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Test und anschließend dem Post-Hoc test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

3.3.2 Expression von S100B in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 19 von 20 (95 %) Präparaten der rEM S100B-positive NF nachweisen (Abb 9). In der rEM ergaben sich signifikant höhere S100B-positive NF-Dichten im Mesocolon der rEM ($4,32 \pm 0,04$ NF/mm²) im Vergleich zu jenen des gesunden Darms ($2,72 \pm 1,88$ NF/mm²), $p < 0,05$ sowie in der Muscularis der rEM ($4,00 \pm 0,32$ NF/mm²) im Vergleich zu der des gesunden Darms ($2,29 \pm 1,25$ NF/mm²), $p < 0,05$ (Abb. 10). In den anderen Schichten ergaben sich im Vergleich zu jenen des gesunden Darms und der gesunden Vagina keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$ (Abb. 10). Getrennt nach Peripherie und Läsionen betrachtet ergab sich in den mesocolischen Läsionen ($4,45 \pm 0,78$ NF/mm²) eine signifikant höhere S100B-positive NF-Dichte, als in dem Mesocolon des gesunden Darmes ($2,72 \pm 1,88$ NF/mm²), $p < 0,05$. Ebenso in der muskulären Peripherie ($4,50 \pm 0,55$ NF/mm²) im Vergleich zur Muscularis des gesunden Darms ($2,29 \pm 1,25$ NF/mm²), $p < 0,05$. In den anderen Schichten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$ (Abb. 10).

Ergebnisse

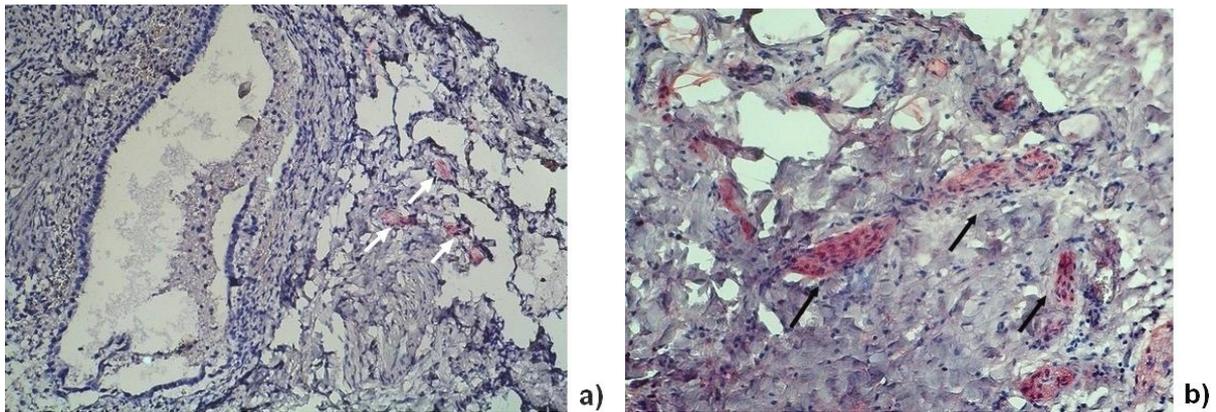


Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung S100B-positiver NF in rEM. Positive NF nahe einer Läsion in rEM a) und in der Peripherie von rEM b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 100 fache und 200 fache Vergrößerung.

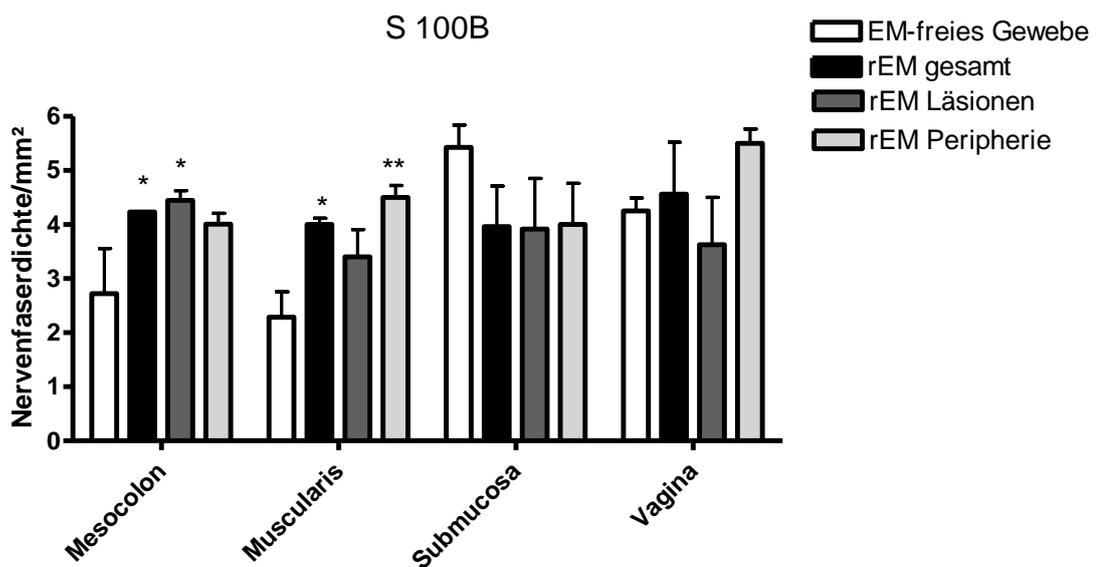


Abbildung 10: S100B-pos. NF-Dichte/mm² läSIONSNAH und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den anatomischen Schichten der rEM (n=19) sowie den läSIONSNAHEN und peripheren Anteilen (n=19) und denen des gesunden Darm (n=10) sowie der gesunden Vagina, *=p<0,05, **=p<0,01. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.4 Expression von Calcium-bindenden Proteinen in Nervenfasern der peritonealen und rectovaginalen Endometriose

3.4.1 Calbindin

3.4.1.1 Expression von Calbindin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 11 von 20 (55 %) Präparaten der pEL CB-positive NF nachweisen (Abb. 11). In der pEL ließ sich insgesamt eine signifikant höhere CB-positive NF-Dichte ($2,71 \pm 1,23$ NF/mm²) nachweisen als im gesunden Peritoneum ($0,1 \pm 0,32$ NF/mm²), $p < 0,001$ (Abb. 12). Separat betrachtet enthielt die Peripherie der pEL ($2,68 \pm 1,52$ NF/mm²) ebenfalls eine signifikant höhere CB-positive NF-Dichte im Vergleich zum gesunden Peritoneum. Zwischen den Läsionen der pEL ($0,68 \pm 1,52$ NF/mm²) und dem gesunden Peritoneum ergab sich kein signifikanter Unterschied, $p > 0,05$. Zwischen den Läsionen ($0,68 \pm 1,52$ NF/mm²) und der Peripherie ($2,68 \pm 1,52$ NF/mm²) der pEL ergab sich eine signifikant höhere CB-positive NF-Dichte in der Peripherie, $p < 0,01$ (Abb. 12).

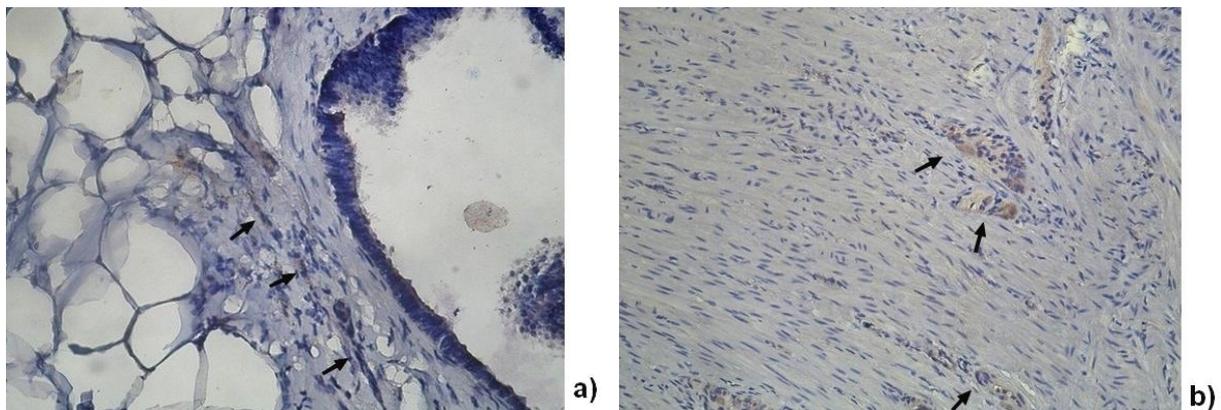


Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung CB-positiver NF in pEL. Positive NF nahe einer Läsion in pEL (a) und in der Peripherie von pEL (b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 200 fache Vergrößerung.

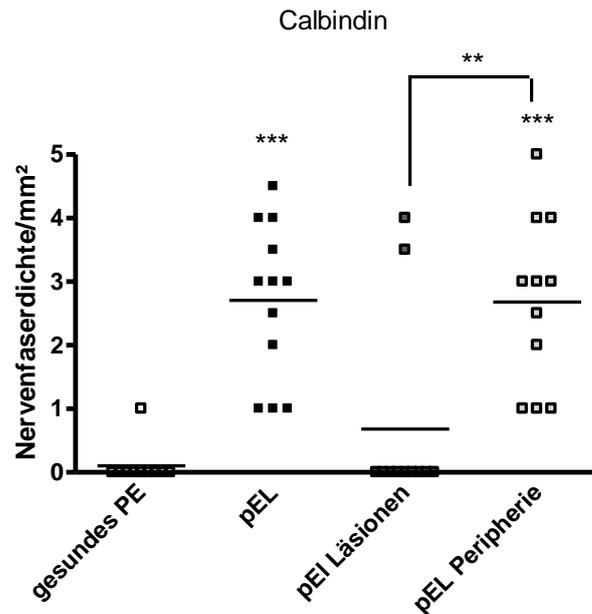


Abbildung 12: CB-pos. NF-Dichte/mm² läSIONSNAHE und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum. Es erfolgte ein Vergleich der pEL (n=11) und des gesunden Peritoneum (n=10) sowie der Läsionen (n=2) und Peripherie der pEL (n=11) und des gesunden Peritoneum (n=10). , ***=p<0,001, **=p<0,01. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Test und anschließend dem Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

3.4.1.2 Expression von Calbindin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 9 von 20 (45 %) Präparaten der rEM CB-positive NF nachweisen (Abb. 13). Es ergaben sich signifikant größere CB-positive NF-Dichten im Mesocolons ($2,00 \pm 0,82$ NF/mm², p<0,001) und der Muscularis ($1,63 \pm 0,18$ NF/mm², p<0,01) der rEM im Vergleich zum Mesocolon ($0,25 \pm 0,50$ NF/mm²) und der Muscularis ($0,00 \pm 0,00$ NF/mm²) des EM-freien Darms (Abb. 14). In den vaginalen Anteilen ($1,00 \pm 0,53$ NF/mm²) der rEM ergaben sich im Vergleich zur gesunden Vagina ($0,54 \pm 0,60$ NF/mm²) keine signifikanten Unterschiede, p>0,05 (Abb. 14).

Getrennt nach Peripherie und Läsionen betrachtet, ergaben sich signifikante Unterschiede für die CB-positiven NF-Dichten in der mesocolischen ($2,00 \pm 0,82$ NF/mm², p<0,001), muskulären ($1,50 \pm 0,71$ NF/mm², p<0,001) und submucösen ($1,50 \pm 0,58$ NF/mm², p<0,05) Peripherie der rEM zu selbigen Schichten im gesunden Darm (Mesocolon: $0,25 \pm 0,55$ NF/mm², Muscularis: $0,00 \pm 0,00$ NF-

Ergebnisse

Dichte/mm², Submucosa: $0,63 \pm 0,74$ NF/mm²). Die mesocolische ($2,00 \pm 0,82$ NF/mm²) und submucöse ($1,50 \pm 0,58$ NF/mm²) Peripherie zeigte außerdem im Vergleich zu den Läsionen der rEM eine signifikant höhere CB-positive NF-Dichte, da nahe den Läsionen keine positiven NF nachweisbar waren, $p < 0,001$. In der rEM ergab sich für CB eine Besonderheit in Bezug auf die CB-positiven NF-Dichten nahe den Läsionen in der rEM und dem EM-freien Darm. Die Läsionen der Muscularis der rEM wiesen eine signifikant höherer CB-positive NF-Dichte ($1,75 \pm 1,10$ NF-Dichte/mm²) auf als im gesunden Darm ($0,00 \pm 0,00$ NF-Dichte/mm²), $p < 0,001$. Zwischen den anatomischen Schichten der rEM ergaben sich für CB keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$ (Abb. 14).

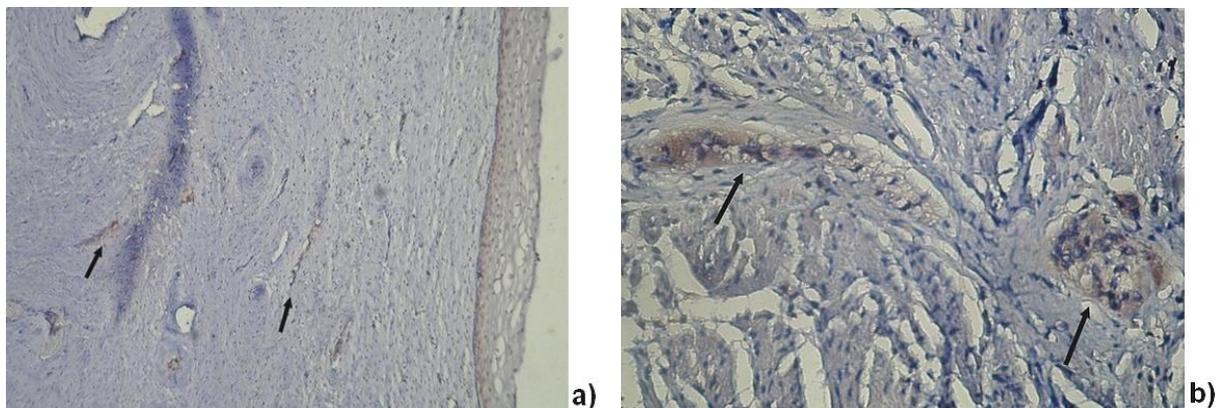


Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung CB-positiver NF in rEM. Positive NF nahe einer Läsion in rEM a) und in der Peripherie von rEM b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 200 fache und 400 fache Vergrößerung.

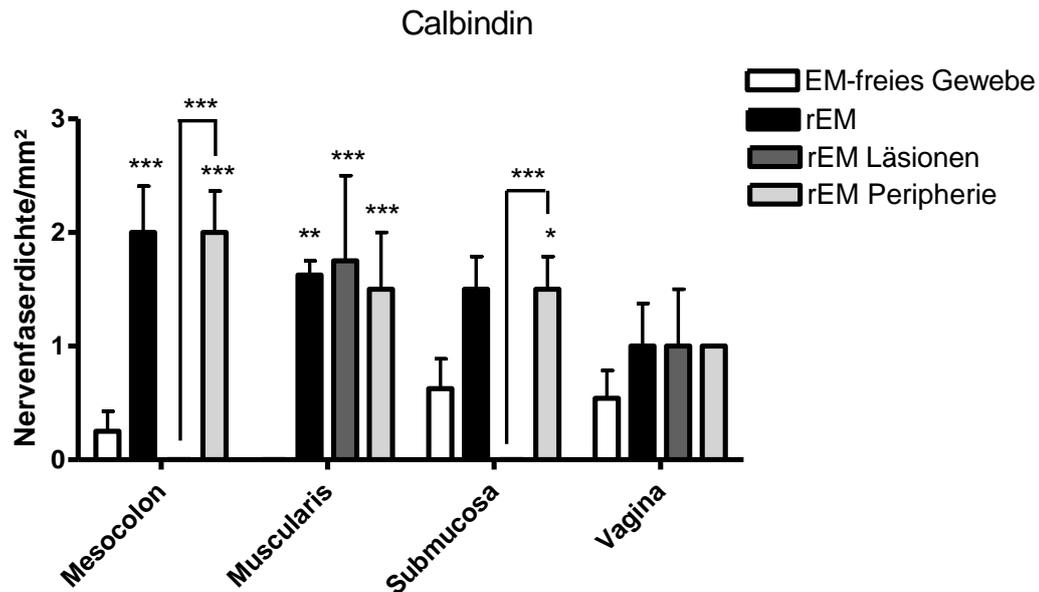


Abbildung 14: CB-pos. NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den anatomischen Schichten der rEM (n=10) sowie den läsionsnahen (n=3) und peripheren Anteilen (n=9) und denen des gesunden Darm (n=10) sowie der gesunden Vagina, **p*<0,05, ***=0,001. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.4.2 Calretinin

3.4.2.1 Expression von Calretinin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose
 Mikroskopisch ließen sich in 10 von 20 (50 %) Präparaten der pEL CR-positive NF nachweisen (Abb. 15). Für CR ergab sich in der pEL ($2,00 \pm 0,91$ NF/mm²) eine signifikant höhere CR-positive NF-Dichte als im gesunden Peritoneum ($0,44 \pm 0,73$ NF/mm²), *p*<0,01.

Für die Peripherie und Läsionen in der pEL ergaben sich für CR ebenfalls Signifikanzen. Die Peripherie ($2,00 \pm 0,91$ NF/mm²) und Läsionen ($2,25 \pm 0,89$ NF/mm²) der pEL wiesen je eine signifikant höhere CR-positive NF-Dichte auf als im gesunden Peritoneum ($0,44 \pm 0,73$ NF/mm²), *p*<0,01 (Abb. 16). Zwischen den Läsionen und der Peripherie der pEL ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen, *p*>0,05 (Abb. 16)

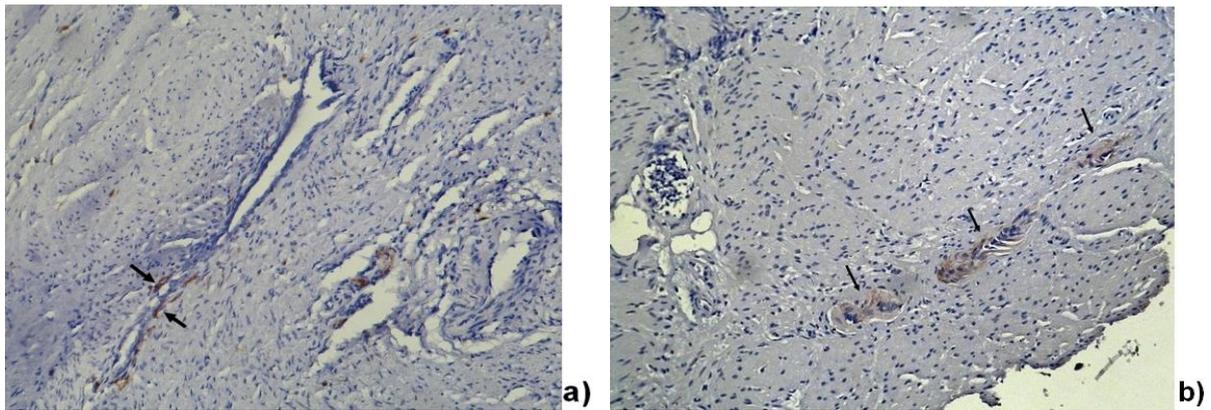


Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung CR-positiver NF in pEL. Positive NF nahe einer Läsion in pEL a) und in der Peripherie von pEL b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 100 fache und 200 fache Vergrößerung.

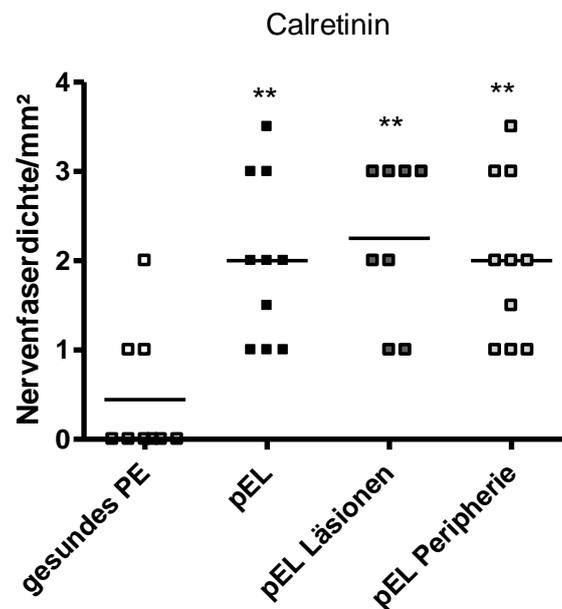


Abbildung 16: CR-pos. NF-Dichte/mm² läSIONSNAHE und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum. Es erfolgte ein Vergleich der pEL (n=10) und des gesunden Peritoneum (n=10) sowie der Läsionen (n=4) und Peripherie der pEL (n=10) und des gesunden Peritoneums (n=10). **=p<0,01. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Test und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

Ergebnisse

3.4.2.2 Expression von Calretinin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 14 von 20 (70 %) Präparaten der rEM CR-positive NF nachweisen (Abb. 17). Es ließen sich in allen Schichten signifikant höhere CR-positive NF-Dichten nachweisen. Im Mesocolon ($2,10 \pm 0,94$ NF/mm², $p < 0,05$), der Muscularis ($2,50 \pm 0,35$ NF/mm², $p < 0,001$) und der Submucosa ($4,00 \pm 1,86$ NF/mm², $p < 0,05$) der rEM waren höhere CR-positive NF-Dichten nachweisen als im Mesocolon ($0,90 \pm 0,55$ NF/mm²), der Muscularis ($0,71 \pm 0,91$ NF/mm²) und der Submucosa ($1,81 \pm 0,84$ NF/mm²) des gesunden Darms (Abb. 18). Ebenso ergab sich in den vaginalen Anteilen der rEM ($1,88 \pm 0,48$ NF/mm²) eine signifikant höhere CR-positive NF-Dichte als in der gesunden Vagina ($0,84 \pm 0,12$ NF/mm²), $p < 0,01$. Zwischen den anatomischen Schichten der rEM ergab sich in der Submucosa ($4,00 \pm 1,86$ NF/mm²) eine signifikant höhere CR-positive NF-Dichte als im Mesocolon ($2,10 \pm 0,94$ NF/mm², $p < 0,05$) und als in der Vagina ($1,88 \pm 0,48$ NF/mm², $p < 0,01$) (Abb. 18). In der Betrachtung der Läsionen und Peripherie der rEM ergaben sich signifikant größere CR-positive NF-Dichten in der musculären Peripherie ($2,75 \pm 0,76$ NF/mm²) im Vergleich zur Muscularis des gesunden Darms ($0,71 \pm 0,91$ NF/mm²) ($p < 0,01$) sowie nahe den submukösen Läsionen ($3,42 \pm 2,11$ NF/mm², $p < 0,05$) und der Peripherie ($4,57 \pm 1,59$ NF/mm², $p < 0,001$) im Vergleich zur Submucosa des gesunden Darms ($1,81 \pm 0,84$ NF/mm²). In den anderen Schichten ergaben sich weder hinsichtlich der Läsionen noch der Peripherie signifikante Unterschiede, $p > 0,05$ (Abb. 18).

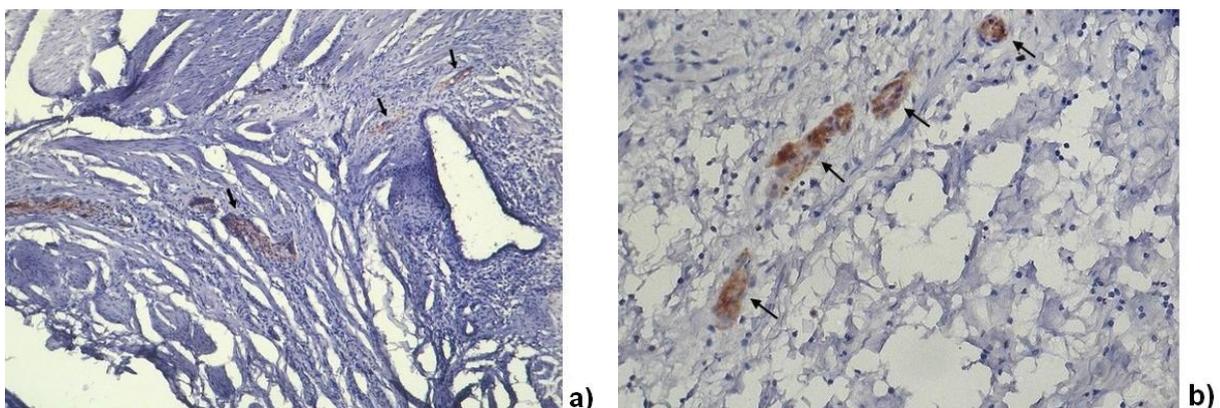


Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung CR-positiver NF in rEM. Positive NF nahe einer Läsion in rEM a) und in der Peripherie von rEM b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 200 fache und 400 fache Vergrößerung.

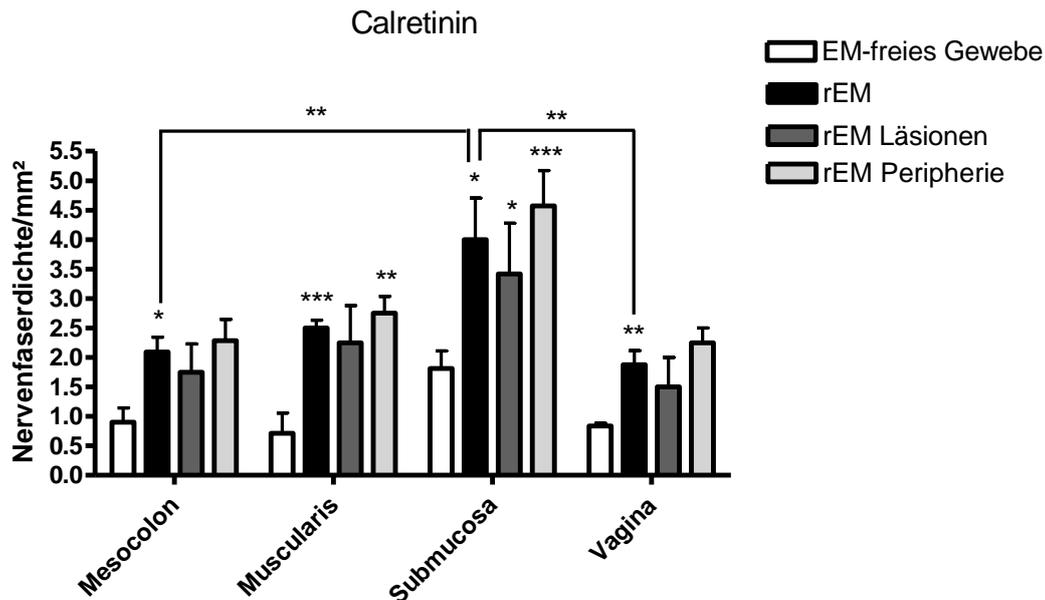


Abbildung 18: CR-pos. NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den anatomischen Schichten der rEM (n=14) sowie den läsionsnahen (n=12) und peripheren Anteilen (n=14) und denen des gesunden Darm (n=10) sowie der gesunden Vagina, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.4.3 Calmodulin

3.4.3.1 Expression von Calmodulin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 19 von 20 (95 %) Präparaten der pEL CM-positive NF nachweisen (Abb. 19). Im Rahmen der Auswertung ergab sich für CM ein signifikant höhere Dichte CM-positiver NF in der pEL ($2,42 \pm 1,14$ NF/mm²) als im gesunden Peritoneum ($1,15 \pm 0,88$ NF/mm²), p<0,01. Separat betrachtet ergab sich in der Peripherie der pEL ($2,33 \pm 1,09$ NF/mm²) eine signifikant höhere CM-positive NF-Dichte als im gesunden Peritoneum ($1,15 \pm 0,88$ NF/mm²), p<0,05 (Abb. 20).

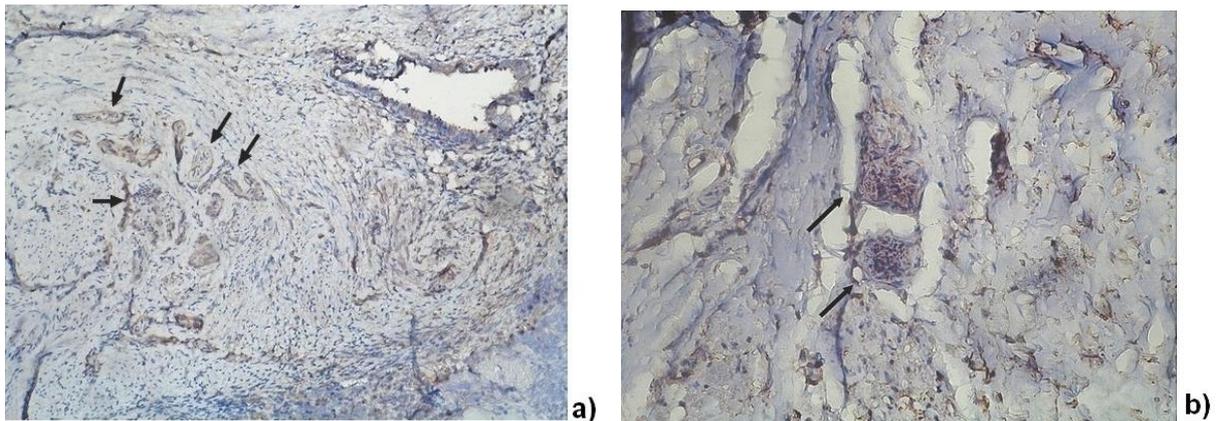


Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung CM-positiver NF in pEL. Positive NF nahe einer Läsion in pEL a) und in der Peripherie von pEL b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 100 fache und 400 fache Vergrößerung.

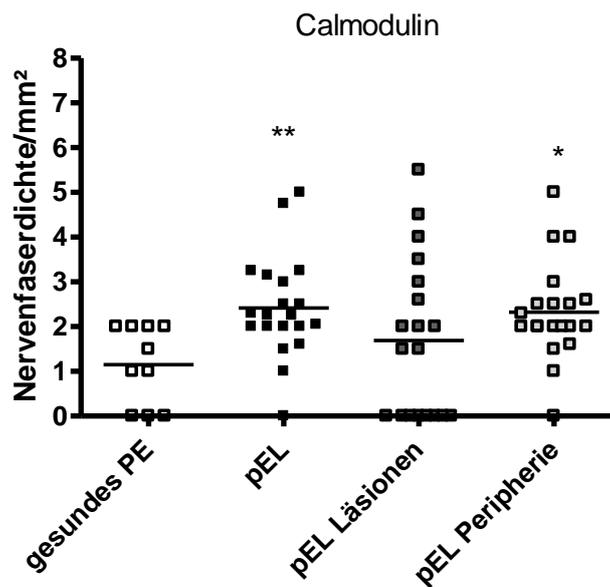


Abbildung 20: CM-pos. NF-Dichte/mm² läSIONSNAHE und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum. Es erfolgte ein Vergleich der pEL (n=19) und des gesunden Peritoneum (n=10) sowie der Läsionen (n=11) und Peripherie der pEL (n=19) und des gesunden Peritoneums (n=10). *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Test und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

Ergebnisse

3.4.3.2 Expression von Calmodulin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 19 von 20 (95 %) Präparaten der rEM CM-positive NF nachweisen (Abb 21). Im Mesocolon ($2,44 \pm 0,85$ NF/mm², $p < 0,01$) und der Muscularis ($3,00 \pm 1,47$ NF/mm², $p < 0,001$) der rEM konnte eine signifikant höhere CM-positive NF-Dichte als im Mesocolon ($0,58 \pm 0,66$ NF/mm²) und der Muscularis ($0,00 \pm 0,00$ NF/mm²) des gesunden Darms ermittelt werden (Abb. 22). Des Weiteren ergaben sich signifikant höhere Dichten CM-positiver NF in der mesocolischen ($2,40 \pm 0,14$ NF/mm², $p < 0,01$) und muskulären Peripherie ($3,00 \pm 0,82$ NF/mm², $p < 0,001$) im Vergleich zum Mesocolon ($0,58 \pm 0,66$ NF/mm²) und Muscularis ($0,00 \pm 0,00$ NF/mm²) des gesunden Darms sowie nahe der mesocolischen ($2,45 \pm 0,00$ NF/mm², $p < 0,01$) und muskulären ($3,00 \pm 2,65$ NF/mm², $p < 0,001$) Läsionen zu selbigen Schichten im gesunden Darm (Abb. 22). In der Submucosa ($3,07 \pm 2,06$ NF/mm²) und Vagina ($1,38 \pm 0,75$ NF/mm²) der rEM ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu jenen Schichten im gesunden Darm, $p > 0,05$ (Abb. 22).

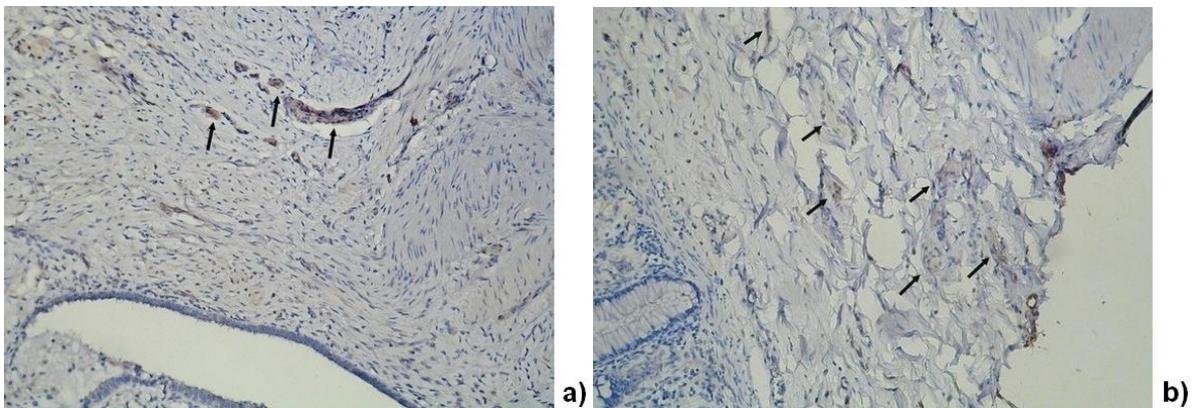


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung CM-positiver NF in rEM. Positive NF nahe einer Läsion in rEM a) und in der Peripherie von rEM b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 200 fache und 400 fache Vergrößerung.

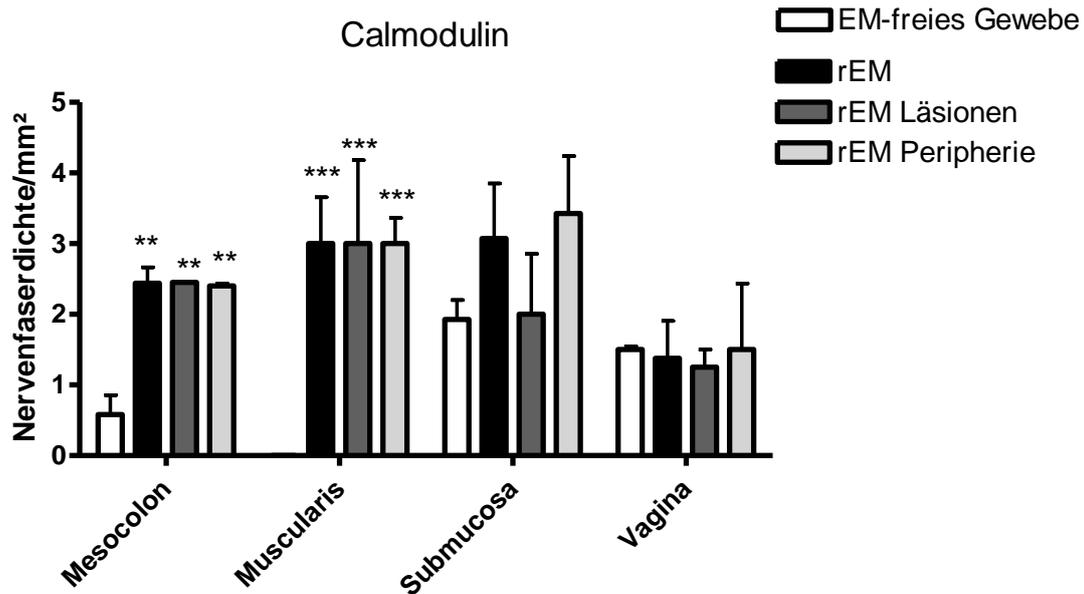


Abbildung 22: CM-pos. NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den anatomischen Schichten der rEM (n=19) sowie den läsionsnahen (n=15) und peripheren Anteilen (n=19) und denen des gesunden Darm (n=10) sowie der gesunden Vagina, **=p<0,01, ***=p<0,001. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.4.4 Parvalbumin

3.4.4.1 Expression von Parvalbumin in Nervenfasern der peritonealen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 9 von 20 (45 %) Präparaten der pEL PV-positive NF nachweisen (Abb. 23). In der pEL ergab sich eine signifikant höhere PV-positive NF-Dichte ($1,98 \pm 0,63$ NF/mm²) als im gesunden Peritoneum, p<0,001. Im gesunden Peritoneum ließen sich bei vorhandenen NF (s. PGP 9.5-Ergebnisse) keine PV-positiven NF nachweisen. Getrennt nach Peripherie und Läsionen betrachtet, ergab sich in der pEL eine signifikant höhere PV-positive NF-Dichte nahe den Läsionen ($1,94 \pm 0,95$ NF/mm²) und auch in der Peripherie ($2,00 \pm 0,71$ NF/mm²) ließ sich im Vergleich zum gesunden Peritoneum eine höhere PV-positive NF-Dichte nachweisen, p<0,001 (Abb. 24).

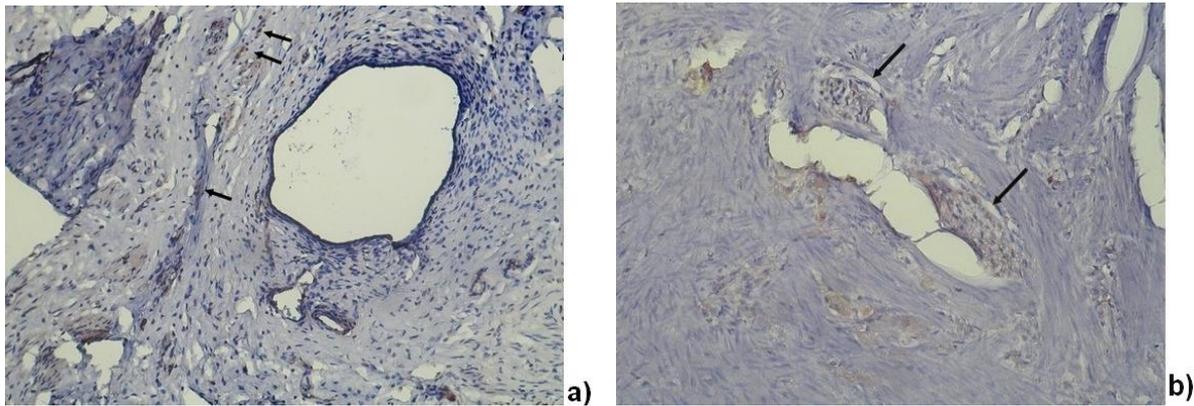


Abbildung 23: Immunhistochemische Darstellung PV-positiver NF in pEL. Positive NF nahe einer Läsion in pEL a) und in der Peripherie von pEL b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 100 fache und 200 fache Vergrößerung.

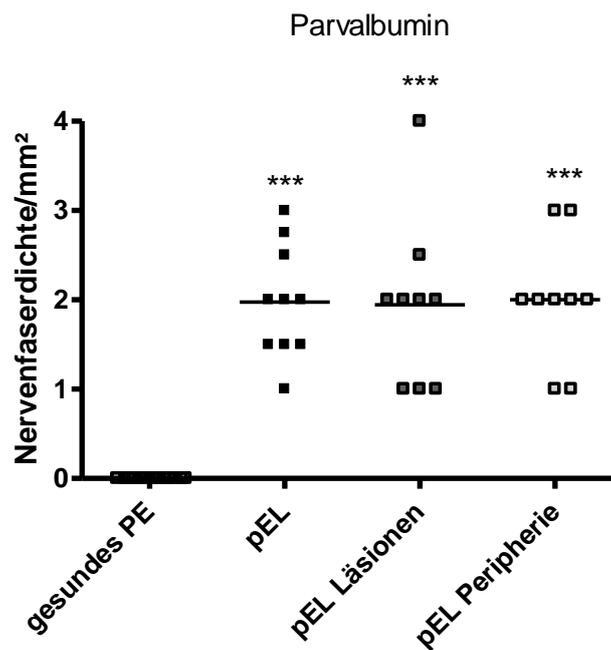


Abbildung 24: PV-pos. NF-Dichte/mm² läSIONsnah und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum. Es erfolgte ein Vergleich der pEL (n=9) und des gesunden Peritoneum (n=10) sowie der Läsionen (n=9) und Peripherie der pEL (n=9) und des gesunden Peritoneums (n=10). ***=p<0,001. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Test und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

Ergebnisse

3.4.4.2 Expression von Parvalbumin in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 8 von 20 (40 %) Präparaten der rEM PV-positive NF nachweisen (Abb. 25). In der rEM ergab sich eine signifikant höhere PV-positive NF-Dichte im Mesocolon der rEM ($1,22 \pm 0,71$ NF/mm²) im Vergleich zu jenem des gesunden Darms ($0,33 \pm 0,52$ NF/mm²), $p < 0,001$ (Abb. 26). Die mesocolische Peripherie ($1,22 \pm 0,54$ NF/mm²) verhielt sich separat betrachtet ebenfalls signifikant zum Mesocolon des gesunden Darms ($0,33 \pm 0,52$ NF/mm²), $p < 0,05$ und auch zu den mesocolischen Läsionen der rEM ($0,25 \pm 0,87$ NF/mm²), $p < 0,001$ (Abb. 26). In beiden Fällen ließ sich in der Peripherie der rEM eine signifikant höhere PV-positive NF-Dichte feststellen (Abb. 26). In der Muscularis der rEM konnten bei vorhandenen NF keine PV-positiven NF ermittelt werden. In der Submucosa des gesunden Darmes fanden sich signifikant mehr PV-positive NF ($1,29 \pm 0,70$ NF/mm²) als in den submucösen Läsionen der rEM, da auch hier keine PV-positiven NF bei vorhandenen NF (s. PGP 9.5 Ergebnisse) nachgewiesen werden konnten, $p < 0,05$. In den anderen Schichten ergaben sich keine Signifikanzen, $p > 0,05$ (Abb. 26).

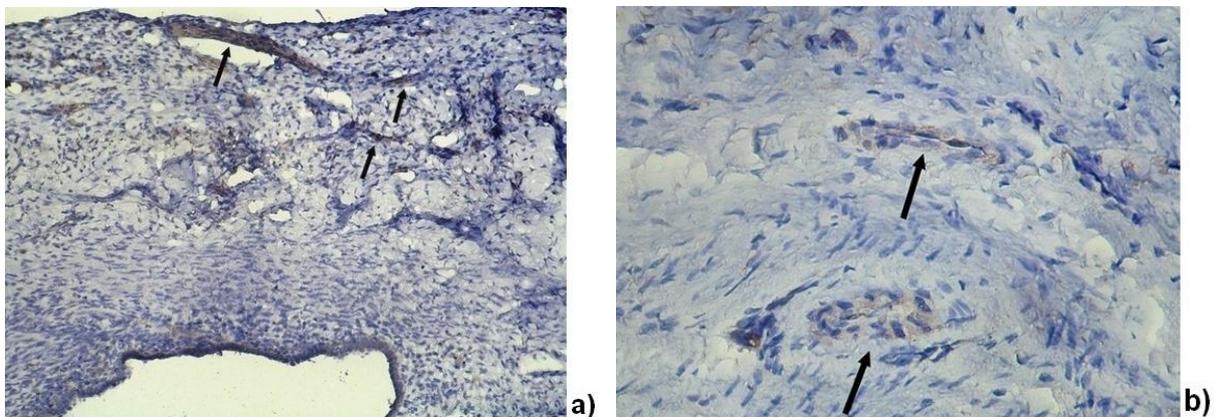


Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung PV-positiver NF in rEM. Positive NF nahe einer Läsion in rEM a) und in der Peripherie von rEM b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 200 fache und 400 fache Vergrößerung.

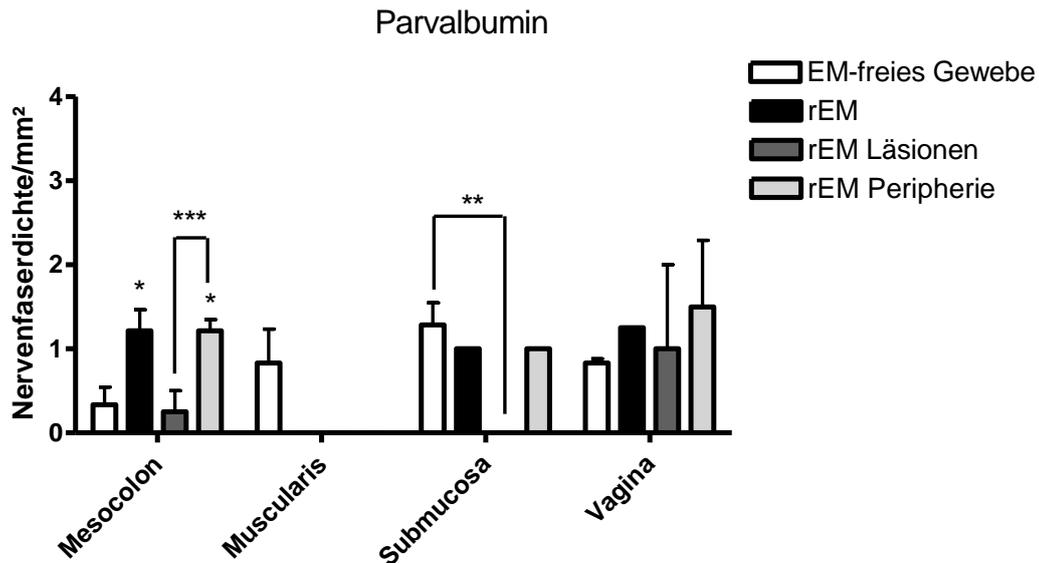


Abbildung 26: PV-pos. NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den anatomischen Schichten der rEM (n=5) sowie den läsionsnahen (n=1) und peripheren Anteilen (n=5) und denen des gesunden Darm (n=10) sowie der gesunden Vagina, *=p<0,05, **= p<0,01, ***=p<0,001. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.4.5 GAP 43

GAP 43 wurde als neuronaler Wachstumsmarker, der im Rahmen der Neurogenese und Neuroregeneration beteiligt ist, verwendet. Die GAP 43-positiven NF konnten somit als neu ausgesprossene bzw. regenerativ aktive NF charakterisiert werden.

3.4.5.1 Expression von GAP 43 in Nervenfasern der peritonealen Endometriose

Mikroskopisch ließen sich in 14 von 15 (93,3 %) Präparaten der pEL GAP 43-positiv NF nachweisen (Abb. 27). Für GAP 43 ergab sich in der pEL eine signifikant höhere GAP 43-positiv NF-Dichte in der pEL ($1,36 \pm 0,88$ NF/mm²) als im gesunden Peritoneum ($0,50 \pm 0,76$ NF/mm²), $p < 0,05$ (Abb. 27) bzw. eine höhere Dichte GAP43-positiver Nervenfasern in der Peripherie der pEL ($1,57 \pm 0,68$ NF/mm²) im Vergleich zum gesunden Peritoneum, $p < 0,05$ (Abb. 28).

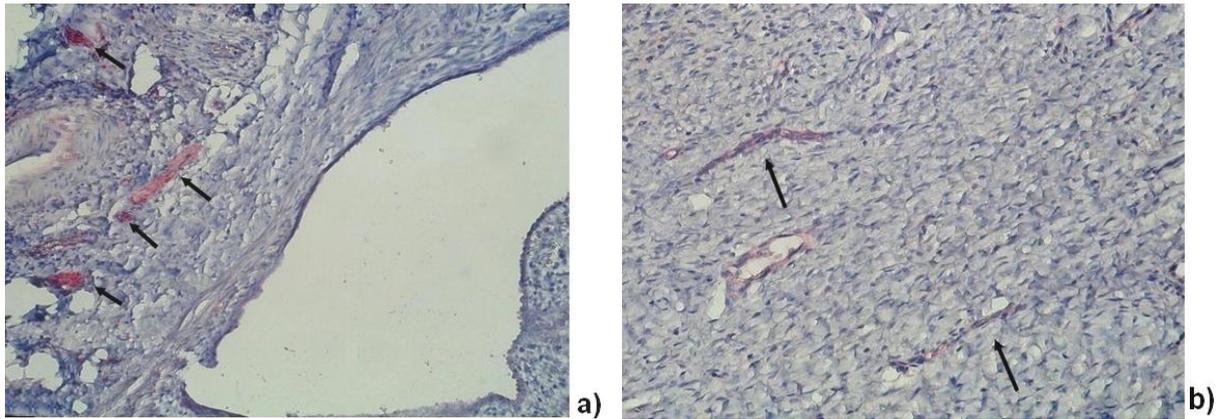


Abbildung 27: Immunhistochemische Darstellung GAP 43-positiver NF in pEL. Positive NF nahe einer Läsion in pEL a) und in der Peripherie von pEL b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 200 fache Vergrößerung.

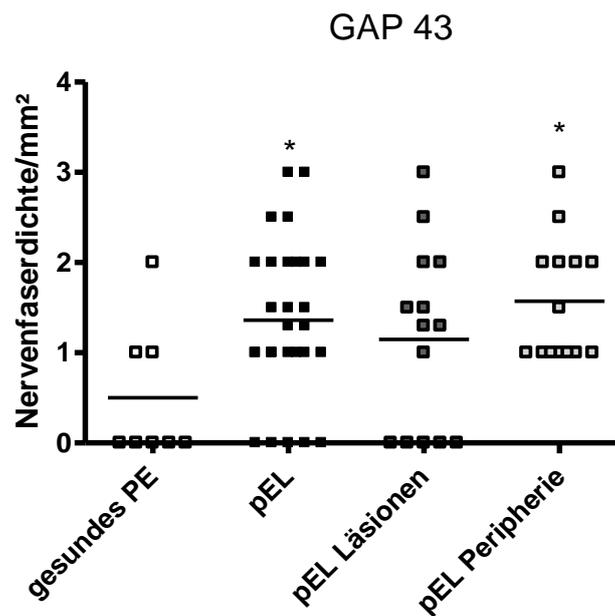


Abbildung 28: GAP43-pos. NF-Dichte/mm² läSIONSnah und in der Peripherie der pEL sowie im gesunden Peritoneum. Es erfolgte ein Vergleich der pEL (n=14) und des gesunden Peritoneum (n=10) sowie der Läsionen (n=9) und Peripherie der pEL (n=14) und des gesunden Peritoneums (n=10). *=p<0,05. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Test und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

Ergebnisse

3.4.5.2 Expression von GAP 43 in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose
Mikroskopisch ließen sich in 15 von 19 (78,9 %) Präparaten der rEM GAP 43-positive NF nachweisen (Abb. 29). In der rEM ließen sich weder in der Peripherie noch nahe der Läsionen der einzelnen Schichten signifikante Unterschiede zu selbigen Schichten des gesunden Darms feststellen, $p > 0,05$ (Abb. 30). Allerdings ergaben sich für GAP 43 in verschiedenen Schichten auffällig niedrige GAP 43-positive NF-Dichten, wenn man diese im Vergleich zu jenen von S100B oder PGP 9.5 betrachtet (Abb. 30).

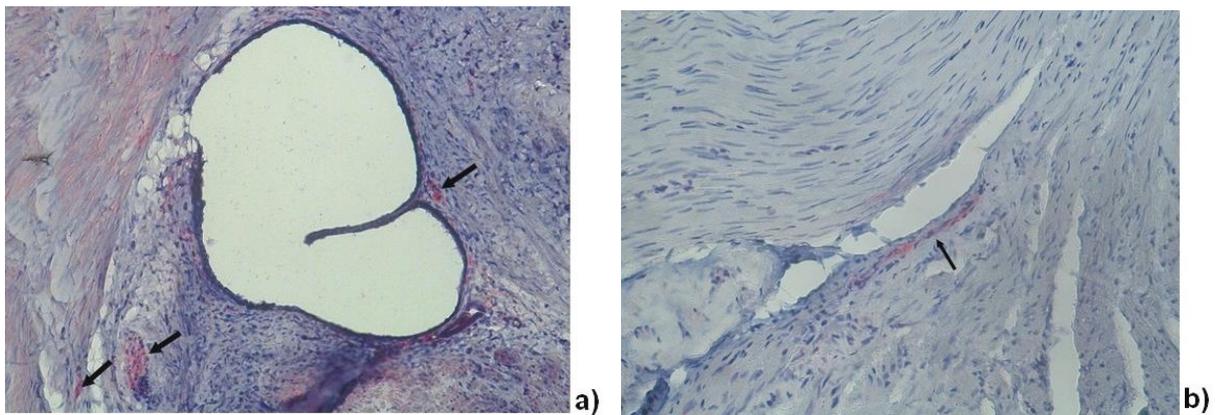


Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung GAP43-positiver NF in rEM. Positive NF nahe einer Läsion in rEM a) und in der Peripherie von rEM b). Die Pfeile zeigen auf immunhistochemisch positive NF. 200 fache Vergrößerung.

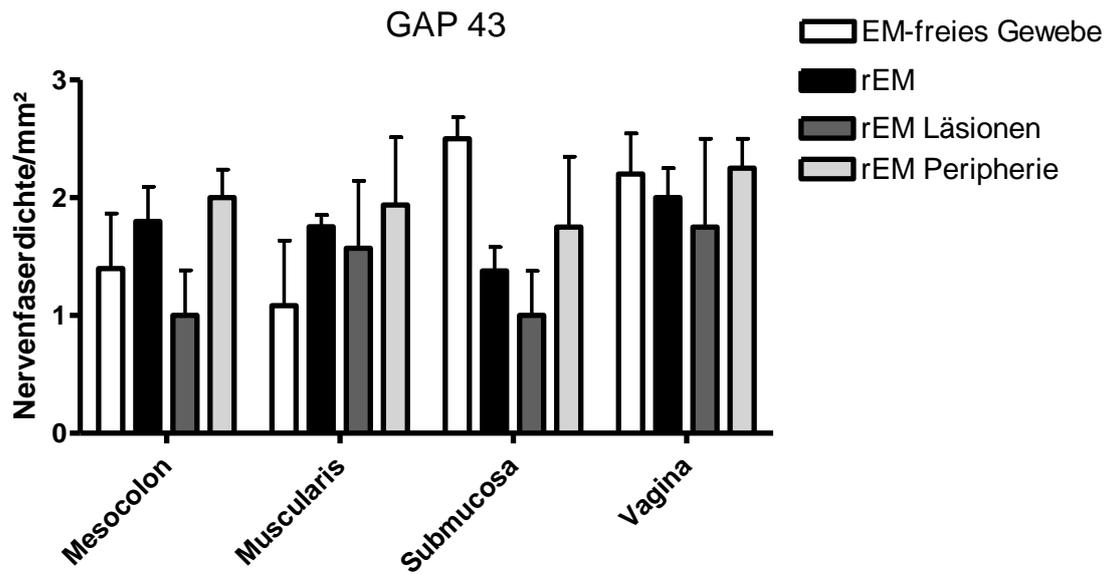


Abbildung 30: GAP 43-pos. NF-Dichte/mm² läsionsnah und in der Peripherie in den anatomischen Schichten der rEM, des gesunden Darms und der Vagina. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den anatomischen Schichten der rEM (n=5) sowie den läsionsnahen (n=11) und peripheren Anteilen (n=15) und denen des gesunden Darm (n=10) sowie der gesunden Vagina. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.4.6 Expression der Calcium-bindenden Proteine in Endometriose-assoziierten Nervenfasern hinsichtlich der Schmerzintensität, klinischer Parameter und Relation der Calcium-bindenden Proteine zueinander

Die statistische Auswertung hinsichtlich der Zyklusphasen, einer möglichen Hormoneinnahme und des klinischen Stadiums der EM ergab keine signifikanten Unterschiede (Tab. 18). Diese Parameter scheinen demnach keinen Einfluss auf die Expression der CaBP in den NF der pEL und rEM zu haben.

Tabelle 18: NF-Dichte/mm² ermittelt mit anti- a) PGP 9.5, S100B und GAP 43 und b) CB, CR, CM und PV in peritonealer und rectovaginaler Endometriose in Abhängigkeit zur Zyklusphase, Hormoneinnahme und des Stadiums der pEL und rEM

a)

		Nervenfaserdichte in pEL und rEM (NF/mm ²)		
		PGP 9.5	S 100B	GAP 43
Peritoneale EM		5.40 ± 1.91	3.98 ± 1.28	1.36 ± 0.87
Rectovaginale EM		4.99 ± 1.00	3.88 ± 0.32	1.73 ± 0.26
Proliferationsphase		5.29 ± 0.99	4.30 ± 1,40	1.86 ± 0.51
Sekretionsphase		4.37 ± 3.50	3.70 ± 1.10	2.00 ± 0.82
Hormoneinnahme		5.75 ± 1.57	4.06 ± 1.66	2.20 ± 0.83
keine Hormoneinnahme		4.38 ± 1.16	3.99 ± 0,60	1.68 ± 0.40
Klinische Klassifikation (pEL)	rASRM I	7.25 ± 1.77	3.38 ± 1.11	1.15 ± 0.17
	rASRM II	5.16 ± 2.32	3.50 ± 2.60	2.00 ± 0.50
	rASRM III	4.83 ± 1.53	3.80 ± 0.57	1.00 ± 1.15
	rASRM IV	3.75 ± 1.06	4.00 ± 2.53	1.17 ± 0.29
Klinische Klassifikation (rEM)	E2a	3.25 ± 1.26	3.75 ± 1.50	2.33 ± 2.52
	E2b	3.25 ± 1.37	3.38± 0.49	1.50 ± 0.58
	E3a	4.00 ± 2.48	4.42 ± 1.69	2.00 ± 1.41
	E3b	2.94 ± 2.16	2.60 ± 1.56	1.20 ± 0.84
	E3c	5.30 ± 3.15	4.50 ± 1.05	1.60 ± 1.44
	E4a	5.28 ± 2.14	4.67 ± 1.78	3.08 ± 0.14
	E4b	4.83 ± 1.94	3.50 ± 1.73	2.00 ± 1.22
E4c	4.40 ± 1.34	4.17 ± 1.17	2.00 ± 0.00	

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

b)

		Nervenfaserdichte in pEL und rEM (NF/mm ²)			
		Calbindin	Calretinin	Calmodulin	Parvalbumin
Peritoneale EM		2.68 ± 1.27	2.00 ± 0.91	2.42 ± 1.14	1.98 ± 0.63
Rectovaginale EM		1.53 ± 0.41	2.62 ± 0.96	2.50 ± 0.79	1.20 ± 0.14
Proliferationsphase		2.60 ± 1.49	2.47 ± 1.17	2.71 ± 1.17	2.10 ± 1.02
Sekretionsphase		1.83 ± 0.98	2.30 ± 0.45	2.90 ± 1.42	2.70 ± 0.47
Hormoneinnahme		2.56 ± 1.26	2.60 ± 1.49	1.95 ± 0.57	1.83 ± 0.76
keine Hormoneinnahme		2.30 ± 1.48	2.40 ± 1.36	2.33 ± 0.66	2.10 ± 0.63
Klinische Klassifikation (pEL)	rASRM I	2.00 ± 2.83	1.66 ± 1.15	2.58 ± 0.63	1.25 ± 0.96
	rASRM II	0.50 ± 0.71	0.66 ± 1.15	2.75 ± 2.05	1.83 ± 1.61
	rASRM III	2.50 ± 1.78	1.00 ± 1.00	2.92 ± 1.66	1.33 ± 1.21
	rASRM IV	1.00 ± 1.41	1.50 ± 1.50	2.60 ± 0.56	2.00 ± 1.41
Klinische Klassifikation (rEM)	E2a	0.00 ± 0.00	2.10 ± 2.66	2.00 ± 0.00	1.00 ± 1.41
	E2b	0.25 ± 0.50	1.42 ± 2.45	2.75 ± 0.90	0.67 ± 1.15
	E3a	1.17 ± 1.17	2.08 ± 0.38	2.42 ± 1.66	0.00 ± 0.00
	E3b	1.17 ± 1.33	2.00 ± 0.50	2.00 ± 1.15	1.33 ± 1.53
	E3c	0.50 ± 0.55	3.63 ± 2.15	2.36 ± 0.54	1.33 ± 2.31
	E4a	0.50 ± 0.58	1.75 ± 1.71	2.50 ± 0.57	1.00 ± 0.00
	E4b	1.38 ± 1.11	2.63 ± 1.25	2.00 ± 1.15	0.00 ± 0.00
	E4c	1.00 ± 1.15	4.25 ± 0.50	4.30 ± 1.30	2.00 ± 0.82

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

3.4.6.1 Expression der Calcium-bindenden Proteine sowie PGP 9.5 und GAP 43 in Nervenfasern der peritonealen Endometriose in Korrelation zur Schmerzintensität

Für S100, PV und GAP 43 ergaben sich zwischen den EM-Patientinnen verschiedener Schmerzintensitäten keine signifikanten Unterschiede in den CaBP-positiven NF-Dichten/mm², $p > 0,05$ (Tab. 19). Aufgrund eines zu kleinen Patientinnenkollektivs für die einzelnen Schmerzintensitäten ließen sich im Rahmen der Auswertung der einzelnen CaBP nicht immer alle Gruppen vergleichen (Tab. 19). Für PGP 9.5 wiesen die EM-Patientinnen mit starken Schmerzen ($4,63 \pm 1,83$ NF/mm²) im Vergleich zu jenen EM-Patientinnen ohne Schmerzen ($7,00 \pm 2,12$ NF/mm²) zwar eine geringere PGP 9.5-positive NF-Dichte auf, dieser Unterschied verhielt sich jedoch nicht signifikant. Für CB ergab sich bei den EM-Patientinnen mit leichten Schmerzen ($3,63 \pm 0,75$ NF/mm²) eine höhere Dichte CB-positiver NF als bei jenen mit starker Schmerzintensität ($2,14 \pm 1,21$ NF/mm²), $p = 0,056$ (Tab. 19). Die EM-

Ergebnisse

Patientinnen mit starken Schmerzen ($1,93 \pm 0,48$ NF/mm²) wiesen für CM eine signifikant niedrigere CM-positive NF-Dichte/mm² auf als jene EM-Patientinnen ohne Schmerzen ($4,33 \pm 0,95$ NF/mm²), $p < 0,01$ (Tab. 19).

Tabelle 19: NF-Dichte/mm² peritonealer EM in Korrelation zur Schmerzintensität

pEL	PGP 9.5	S100	GAP 43	Calbindin	Calretinin	Calmodulin	Parvalbumin
Ohne Schmerzen	$7,00 \pm 2,12$	$3,33 \pm 1,53$	n < 3	n < 3	$2,00 \pm 1,00$	$4,33 \pm 0,95$	$2,08 \pm 0,63$
Leichte Schmerzen	$5,84 \pm 1,70$	$4,40 \pm 0,97$	$1,78 \pm 0,78$	$3,63 \pm 0,75$	$1,69 \pm 1,07$	$2,6 \pm 0,56$	$1,60 \pm 0,42$
Starke Schmerzen	$4,64 \pm 1,83$	$3,94 \pm 1,43$	$1,40 \pm 0,78$	$2,14 \pm 1,21$	$2,16 \pm 0,76$	$1,93 \pm 0,48$	$2,75 \pm 0,35$

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

3.4.6.2 Expression der Calcium-bindenden Proteine sowie PGP 9.5 und GAP 43 in Nervenfasern der rectovaginalen Endometriose in Korrelation zur Schmerzintensität

Im Rahmen der rEM ergab sich zwischen den EM-Patientinnen verschiedener Schmerzintensitäten für keines der getesteten CaBP ein signifikanter Unterschied in den CaBP-positiven NF-Dichten/mm², $p > 0,05$ (Tab. 20). Aufgrund eines zu kleinen Patientinnenkollektivs für die einzelnen Schmerzintensitäten ließen sich im Rahmen der Auswertung der einzelnen CaBP nicht alle der Gruppen vergleichen (Tab. 20).

Tabelle 20: NF-Dichte/mm² rectovaginaler EM in Korrelation zur Schmerzintensität

rEM	PGP 9.5	S100	GAP 43	Calbindin	Calretinin	Calmodulin	Parvalbumin
Ohne Schmerzen	$7,83 \pm 2,57$	n < 3	$2,50 \pm 0,87$	$1,93 \pm 0,12$	n < 3	n < 3	$2,00 \pm 2,00$
Leichte Schmerzen	$4,06 \pm 1,91$	$4,48 \pm 1,21$	$2,42 \pm 0,62$	$2,00 \pm 1,00$	$2,71 \pm 0,80$	$2,6 \pm 1,13$	$2,00 \pm 0,82$
Starke Schmerzen	$4,68 \pm 1,71$	$4,45 \pm 0,59$	$2,21 \pm 0,51$	$1,25 \pm 0,43$	$2,71 \pm 1,23$	$2,88 \pm 1,36$	$2,17 \pm 0,29$

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

3.4.6.3 Gegenüberstellung der Expression Calcium-bindender Proteine in Endometriose-assoziierten Nervenfasern in der peritonealen Endometriose

Mittels des Panmarkers PGP 9.5 für intakte NF und des CaBP S100B, das ebenfalls ein Marker für myelinisierte NF ist, stellt sich die eigentliche Nervenfaserdichte des Gewebes dar. Im Vergleich dazu zeigt sich, dass die CaBP Calbindin, Calretinin, Calmodulin und Parvalbumin sowie GAP 43 im gesunden Peritoneum kaum exprimiert werden. Die Expression der CaBP und GAP43 in den peritonealen

Ergebnisse

Endometrioseläsionen im Vergleich zum gesunden Peritoneum aber signifikant hochreguliert wird. Die CaBP scheinen sich dabei basierend auf ihren Eigenschaften (s. Material & Methoden) ähnlich zu verhalten.

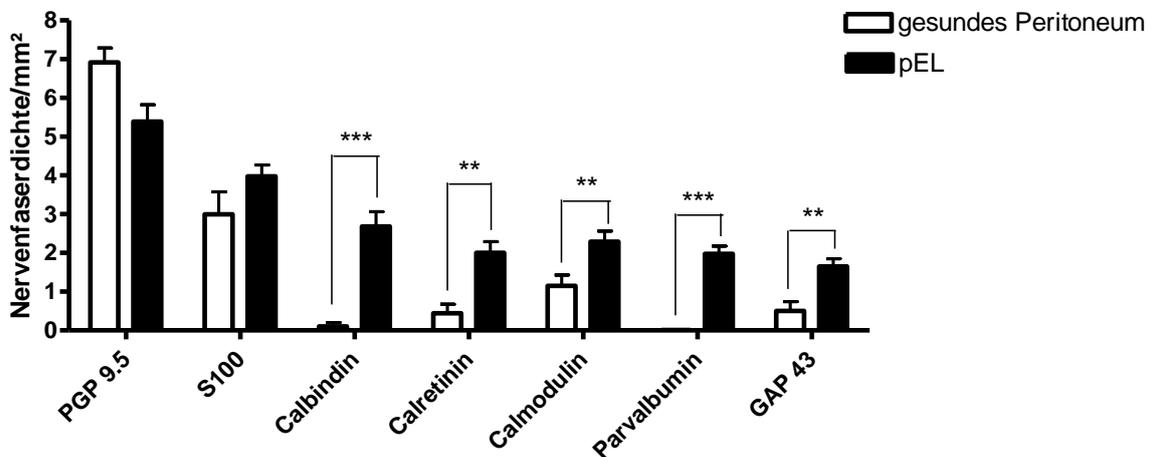


Abbildung 31: Expression der CaBP, PGP 9.5 und GAP 43 in der pEL und im gesunden Peritoneum. Für Calbindin (** $p < 0,001$), Calretinin (** $p = 0,0015$), Calmodulin (** $p = 0,0025$), Parvalbumin (** $p < 0,0001$) und GAP 43 (** $p = 0,0033$) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der pEL und dem gesunden Peritoneum. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen.

3.4.6.4 Gegenüberstellung der Expression Calcium-bindender Proteine in Endometriose-assoziierten Nervenfasern in der rectovaginalen Endometriose

In der rEM entsprach die Verteilung der Antikörper nicht ganz dem gleichmäßigen Erscheinungsbild der pEL. Zwar zeigte sich eine ähnliche Relation der positiven NF-Dichten von PGP 9.5 und S100B zu den CaBP und GAP 43, die Expression CaBP-positiver NF verhielt sich in der rEM jedoch inhomogener als in der pEL. Trotzdem zeigten sich auch in der rEM vereinzelt signifikant höhere CaBP-positive NF-Dichten als im gesunden Peritoneum (detaillierte Ergebnisse s. in der Auswertung der jeweiligen CaBP).

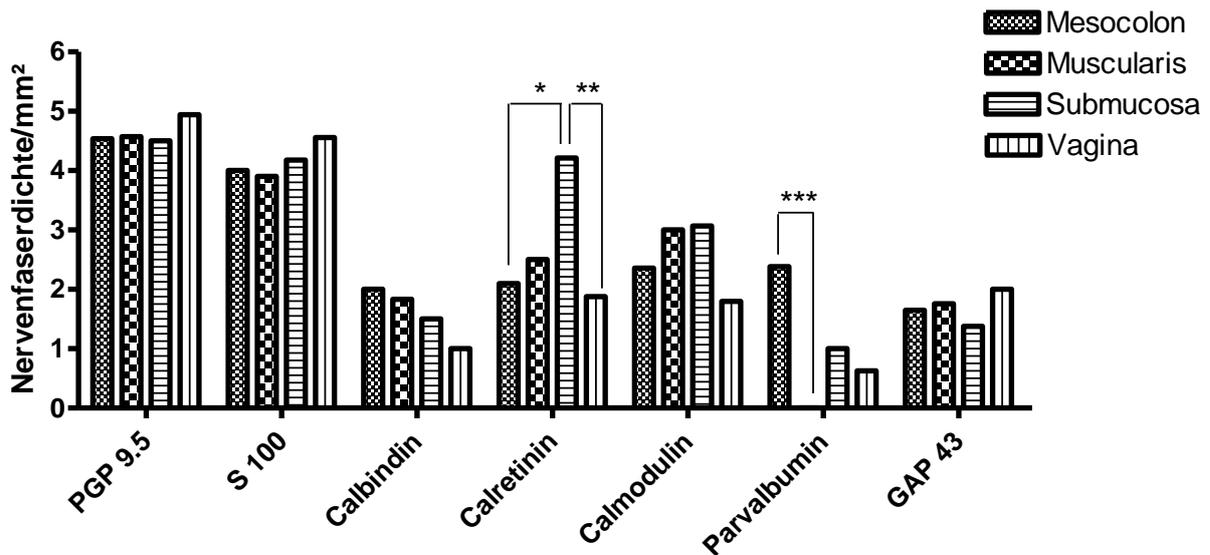


Abbildung 32: Expression der CaBP, PGP 9.5 und GAP 43 in den anatomischen Schichten der rEM. Für Calretinin ergab sich zwischen der Submucosa und dem Mesocolon sowie der Vagina der rEM (n=14) ein signifikanter Unterschied. Ebenso ergab sich für Parvalbumin ein signifikanter Unterschied zwischen dem Mesocolon und der Muscularis der rEM (n=9).

3.5 Expression der CaBP in Peritonealflüssigkeiten

3.5.1 Expressionsanalyse von S100B, Calbindin und Calretinin in Peritonealflüssigkeiten von Endometriosepatientinnen und Patientinnen ohne Endometriose

Zunächst sollte mittels Western-Blot Analyse die Expression der CaBP in der PF nachgewiesen werden. Dazu wurden Proben von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM analysiert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten weitere Versuche zur genaueren Quantifizierung der CaBP durchgeführt werden. Im Folgenden sind die Mittelwerte der ermittelten relativen Expressionen angegeben (mRE). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Es folgt eine exemplarische Darstellung der positiven Banden (Abb. 33) sowie eine tabellarische Darstellung der relativen Expressionen der einzelnen CaBP (Tab.34).

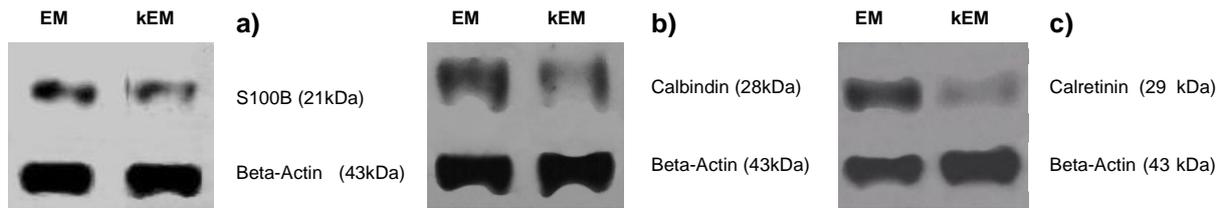


Abbildung 33: Expression der CaBP in der PF. Expression von S100B **a)**, CB **b)** und CR **c)** in der PF einer EM-Patientin und der PF einer Patientin ohne EM. Darunter jeweils die Ladungskontrolle mit Beta-Actin.

Es ließen sich die getesteten CaBP S100B, Calbindin und Calretinin in den untersuchten PF nachweisen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke zwischen Patientinnen mit und ohne EM. Für S100B ließ sich in den getesteten PF von EM-Patientinnen ($1,19 \pm 0,45$ mRE) und Patientinnen ohne EM ($1,00 \pm 0,30$ mRE) kein signifikanter Unterschied nachweisen, $p > 0,05$ (Abb. 33a und 34a). CB ließ sich gleichermaßen in den PF von Patientinnen mit ($1,93 \pm 1,30$ mRE) und ohne EM ($1,00 \pm 0,90$) nachweisen, $p > 0,05$ (Abb. 33b und 34b). Auch für CR ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den PF von EM-Patientinnen ($2,14 \pm 1,55$ mRE) und Patientinnen ohne EM ($1,00 \pm 0,75$ mRE), $p > 0,05$. Jedoch zeigte sich mit $p = 0,0827$ die Tendenz einer leicht höheren Expression von CR in den PF von EM-Patientinnen (Abb. 33c und 34c).

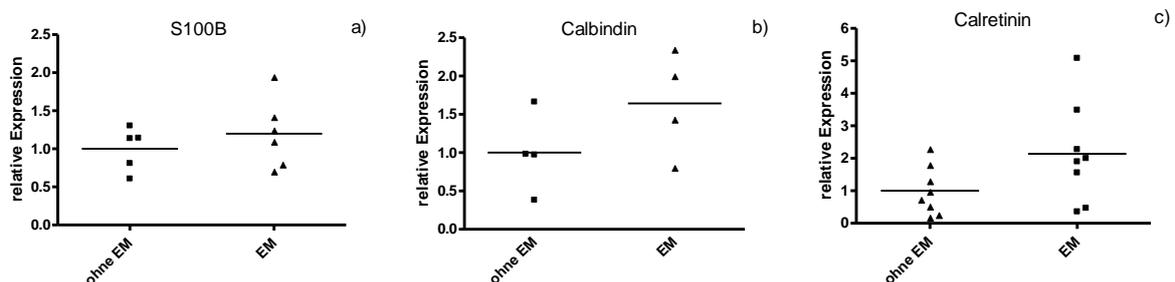


Abbildung 34: Relative Expression von S100B, CB und CR in der PF. Es erfolgte ein Vergleich der Expression von S100B **a)**, CB **b)** und CR **c)** in den PF von Patientinnen ohne EM (n=8) und der PF von EM-Patientinnen (n=8). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.5.2 Expressionsanalyse von S100B, Calbindin und Calretinin in Peritonealflüssigkeiten in Korrelation zur Schmerzintensität

Nach statistischem Vergleich ergab sich für die EM-Patientinnen mit leichten Schmerzen ($1,26 \pm 0,04$ mRE) eine signifikant höhere Expression von S100B als bei EM-Patientinnen mit starken Schmerzen ($0,82 \pm 0,02$ mRE), $p < 0,05$ (Abb. 35a). Für die EM-Patientinnen ohne Schmerzen ($1,00 \pm 0,00$ mRE) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$. Für CB ergaben sich zwischen den EM-Patientinnen ohne Schmerzen ($1,00 \pm 0,00$ mRE), leichter ($1,05 \pm 0,09$ mRE) sowie starker ($1,07 \pm 0,09$ mRE) Schmerzintensität keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$ (Abb. 35b). Für CR zeigte sich im Vergleich der Schmerzintensitäten ein signifikanter Unterschied zwischen den schmerzfreen EM-Patientinnen ($1,00 \pm 0,00$ mRE) und den EM-Patientinnen mit leichten Schmerzen ($1,62 \pm 0,015$ mRE). In der PF von EM-Patientinnen mit leichten Schmerzen ließ sich eine signifikant höhere CR-Expression nachweisen, $p < 0,05$ (Abb. 35c). Zwischen den EM-Patientinnen mit starken Schmerzen ($1,18 \pm 0,14$ mRE) sowie den EM-Patientinnen ohne Schmerzen ($1,00 \pm 0,00$ mRE) ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen, $p > 0,05$ (Abb. 35c).

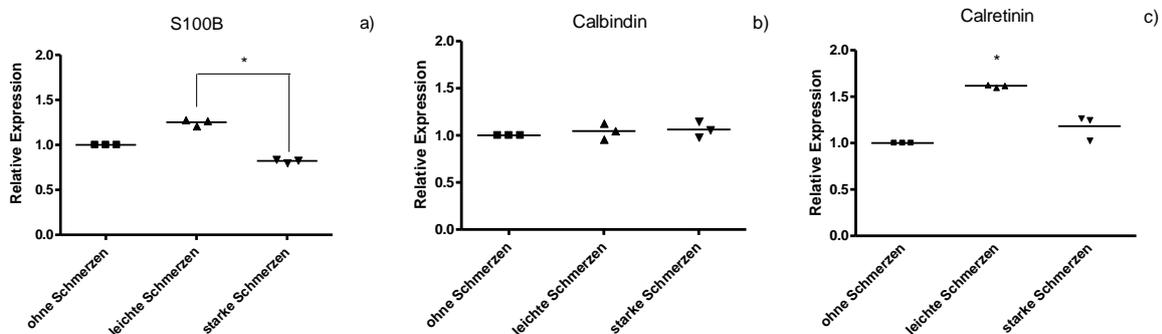


Abbildung 35: Relative Expression von S100B, CB und CR in den PF von EM-Patientinnen ohne, mit leichten und starken Schmerzen: Die EM-Patientinnen leichter ($n=4$) und starker ($n=4$) Schmerzintensität sowie ohne Schmerzen ($n=4$) wurden jeweils miteinander verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane. $*=p < 0,05$, US= Unterbauchschmerzen.

3.5.3 Expressionsanalyse von S100B, Calbindin und Calretinin in PC12-Zellen in Korrelation zur Schmerzintensität

Um festzustellen, ob die PF von EM-Patientinnen auch Einfluss auf die Expression der CaBP in neuronalem Gewebe hat, wurden neuronale PC-12-Zellen in der PF von Patientinnen mit und ohne (Kontrollgruppe) pEL inkubiert. Um auch einen möglichen Einfluss auf die Schmerzintensität zu ermitteln, erfolgte die Inkubation der PC12-Zellen in den PF von EM-Patientinnen mit unterschiedlicher Schmerzausprägung. Andere Studien wiesen bereits nach, dass PC-12-Zellen, die in der PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden eine höhere Proliferationsrate und ein stärkeres Neuritenwachstum zeigten als die PC12-Zellen, die in der PF der Kontrollgruppe inkubiert wurden (Barcena de Arellano et al, 2012; Barcena de Arellano et al, 2011). Nach Inkubation in der PF von Patientinnen mit ($1,18 \pm 0,16$ mRE) und ohne ($1,00 \pm 0,03$ mRE) EM zeigten sich keine signifikanten Änderungen der S100B Expression in den PC12-Zellen. PC12-Zellen, die in den PF von EM-Patientinnen ohne ($1,29 \pm 0,02$ mRE), leichter ($0,97 \pm 0,05$ mRE) und starker Schmerzintensität ($1,29 \pm 0,04$ mRE) inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$ (Tab. 21). Für CB hingegen ergab sich nach Inkubation in den PF von EM-Patientinnen ($1,95 \pm 0,54$ mRE) eine signifikant höhere CB-Expression als in den PF von Patientinnen ohne EM ($1,00 \pm 0,01$ mRE), $p < 0,05$ (Tab. 21). Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Expression in jenen PC12-Zellen, die in den PF von EM-Patientinnen mit leichten Schmerzen ($2,57 \pm 0,07$ mRE) inkubiert wurden im Vergleich zu denen, die in den PF von EM-Patientinnen ohne ($1,64 \pm 0,05$ mRE) und starker ($1,63 \pm 0,13$ mRE) Schmerzen inkubiert wurden, $p < 0,05$ (Tab. 21). Gegenständig dazu ließ sich eine signifikant niedrigere CR-Expression in den PC 12-Zellen nachweisen, die in der PF von EM-Patientinnen ($0,58 \pm 0,24$ mRE) inkubiert wurden im Vergleich zu jenen PC 12-Zellen, die in den PF von Patientinnen ohne EM ($1,00 \pm 0,03$ mRE) inkubiert wurden, $p < 0,05$ (Tab. 21). Hinsichtlich der Schmerzintensitäten ergaben sich für CR keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 21: Relative Expressionen der PC12-Zellen, die in PF von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM inkubiert wurden

Pool	relative Expression		
	S 100	Calbindin (CB)	Calretinin (CR)
keine EM	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,03
EM gesamt	1,18 ± 0,19	1,95 ± 0,54 (p<0,05)	0,58 ± 0,24 (p<0,05)
EM ohne Schmerzen	1,29 ± 0,02	1,64 ± 0,05	0,90 ± 0,07
EM mit leichten Schmerzen	0,96 ± 0,05	2,57 ± 0,07 (p<0,05)	0,43 ± 0,05
EM mit starken Schmerzen	1,29 ± 0,04	1,63 ± 0,13	0,42 ± 0,01

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionen (=mRE)

3.6 Induktion der Expression Calcium-bindender Proteine im Neuronalen Wachstums-Assay

3.6.1 Das Neuritenwachstum sensibler Hinterwurzelganglien

Ergänzend zu den Ergebnissen der Immunhistochemie erfolgte eine Analyse des Neuritenwachstums sensibler Hinterwurzelganglien. Sensible Hinterwurzelganglien wurden in der PF von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM inkubiert und hinsichtlich ihrer Nervenfaseraussprossung mit einem neuronalen Wachstums-Score von 0-3 bewertet. Die mikroskopische Auswertung der in 30 PF von EM-Patientinnen inkubierten sensiblen Hinterwurzelganglien ergab für 6,6 % den Aussprossungsgrad 1. 50 % erhielten den Aussprossungsgrad 2 und 43,3 % den Aussprossungsgrad 3. Die Aussprossung der sensiblen Hinterwurzelganglien, die in PF von Patientinnen ohne EM inkubiert wurden, erhielten zu 40 % den Aussprossungsgrad 0 für keine NF-Aussprossung. 50 % wurden mit dem Aussprossungsgrad 1 bewertet und 10 % mit dem Aussprossungsgrad 2 (Abb. 36 und 37).

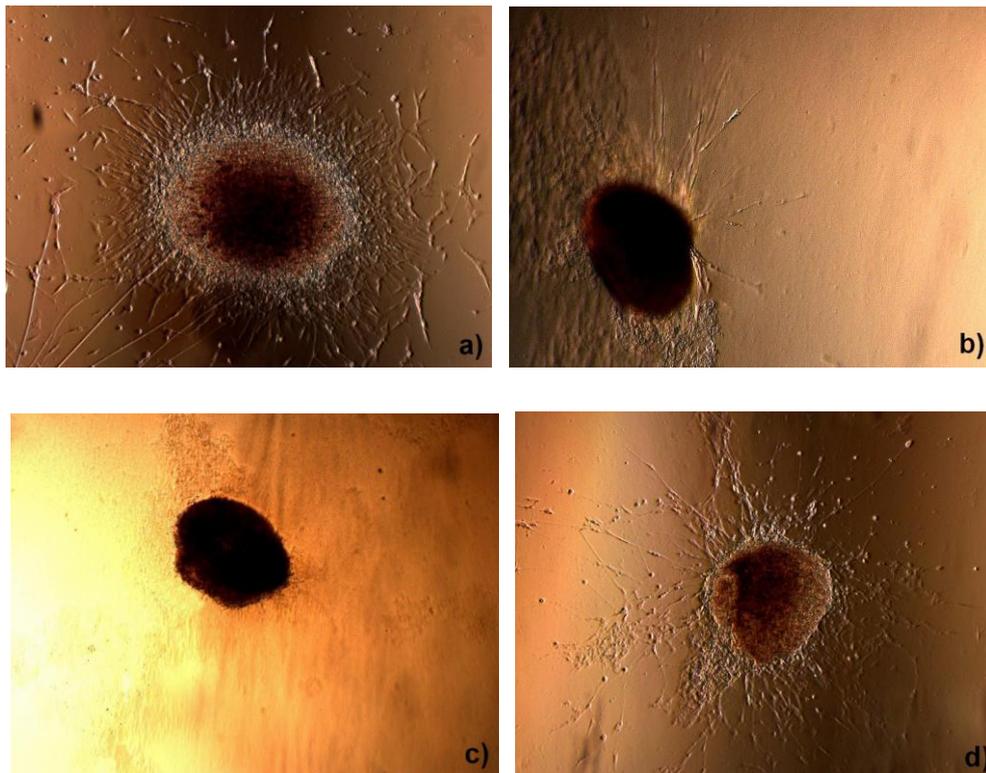


Abbildung 36: Nervenaustritt aus sensiblen Hinterwurzelganglien (DRG). Dargestellt sind a) die Nervenaustrittsstrukturen eines in PF von einer EM-Patientin inkubierten DRG, b) eines DRG, das in der PF einer Patientin ohne EM inkubiert wurde sowie c) das Fehlen von Nervenaustrittsstrukturen der Negativkontrolle und d) Nervenaustrittsstrukturen der Positivkontrolle. 200 fache Vergrößerung.

Die sensiblen Hinterwurzelganglien, die in PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden ($2,37 \pm 0,61$ NWS), erreichten einen signifikant höheren Nervenaustrittsgrad als jene, die in den PF von Patientinnen ohne EM inkubiert wurden ($0,70 \pm 0,67$ NWS), $p < 0,001$ (Abb. 37). Das alleinige Kultivieren der sensiblen Hinterwurzelganglien in Medium (Negativkontrolle) führte zu keiner NF-Austrittsstruktur, während jene sensiblen Hinterwurzelganglien, die in NGF inkubiert wurden (Positivkontrolle) einen signifikant größeren Nervenaustrittsgrad erreichten ($3,00 \pm 0,00$ NWS) als die Negativkontrolle ($0,00 \pm 0,00$ NWS), $p < 0,001$ (Abb. 37).

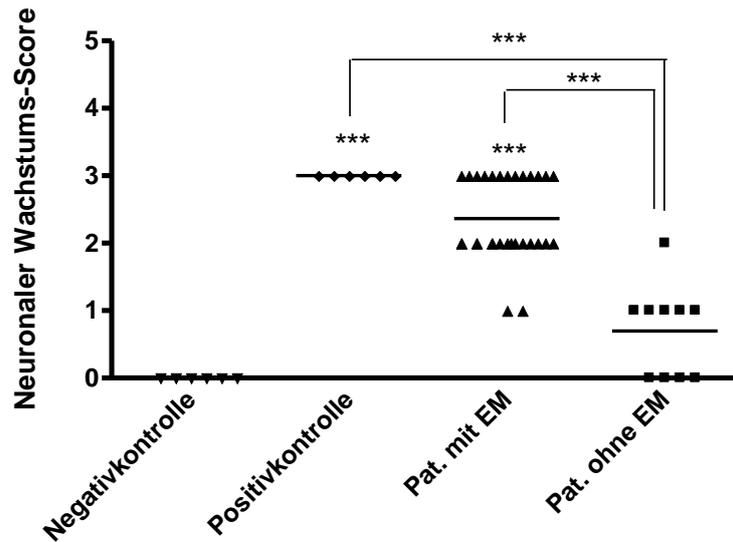


Abbildung 37: Nervenaußsprössung von in PF inkubierten Hinterwurzelganglien. Quantifizierung der Nervenaußsprössungsgrade von in PF von EM-Patientinnen (n=30) und PF von Pat. ohne EM (n=10) inkubierten Hinterwurzelganglien. *** = $p < 0,001$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und anschließendem Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die Mediane.

3.6.2 Das Neuritenwachstum sensibler Hinterwurzelganglien unter Berücksichtigung klinischer Parameter

Um mögliche Rückschlüsse der Nervenaußsprössung auf die durch die Patientinnen angegebenen Schmerzintensitäten ziehen zu können, wurden die Nervenaußsprössungsgrade für die einzelnen Schmerzintensitäten ermittelt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Nervenaußsprössungsgrade der sensiblen Hinterwurzelganglien, die in den PF von EM-Patientinnen ohne, leichter und starker Schmerzen inkubiert wurden, $p > 0,05$ (Abb. 38)

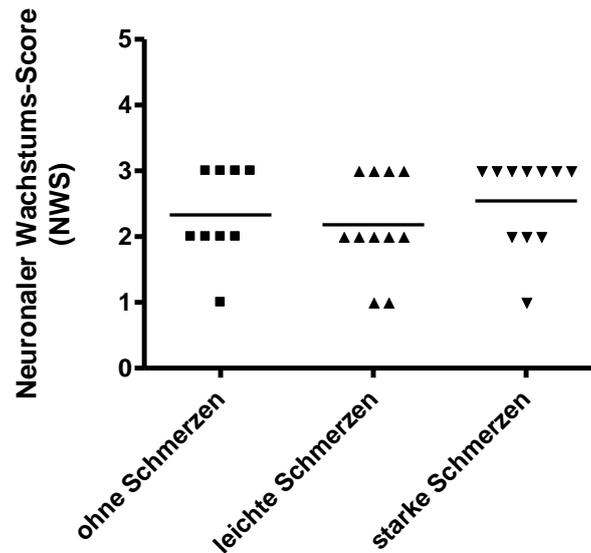


Abbildung 38: Quantifizierung der Nervenaussprossung von in PF von EM-Patientinnen unterschiedlicher Schmerzintensitäten inkubierten Hinterwurzelganglien. Vergleich der Nerven-
aussprossung von DRG in PF von EM-Patientinnen ohne Schmerzen (n=4), mit leichten (n=9) und
starken Schmerzen (n=17). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, $p > 0,05$. Die statistische
Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und Post-Hoc Test nach Dunn. Dargestellt sind die
Mediane.

Für die Zyklusphasen, in denen sich die Patientinnen zur Zeit der Probenentnahme befanden sowie für eine mögliche Hormoneinnahme ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen, $p > 0,05$ (Tab. 22).

Tabelle 22: Neuronaler Wachstums-Score der DRG, die in PF von symptomatischen EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM inkubiert wurden.

EM-Patientinnen	Neuronaler Wachstums-Score
mit Hormoneinnahme	2,00 ± 0,53 (n=8)
ohne Hormoneinnahme	2,26 ± 0,73 (n=19)
Proliferative Zyklusphase	1,80 ± 0,84 (n=5)
Sekretorische Zyklusphase	2,33 ± 0,87 (n=9)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ($p > 0,05$)

3.6.3 Expression der CaBP in sensiblen Hinterwurzelganglien

Die Expression der CaBP wurden im Anschluss an den NWA mittels Immunfluoreszenz untersucht. Sowohl die sensiblen Hinterwurzelganglien als auch ihre Nervenfaseraussprossungen zeigten eine Expression der CaBP, wenn sie in der PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden (Abb. 39). Hingegen blieben die sensiblen Hinterwurzelganglien und Nervenfaseraussprossungen negativ für die CaBP, wenn sie in der PF von Patientinnen ohne EM inkubiert wurden.

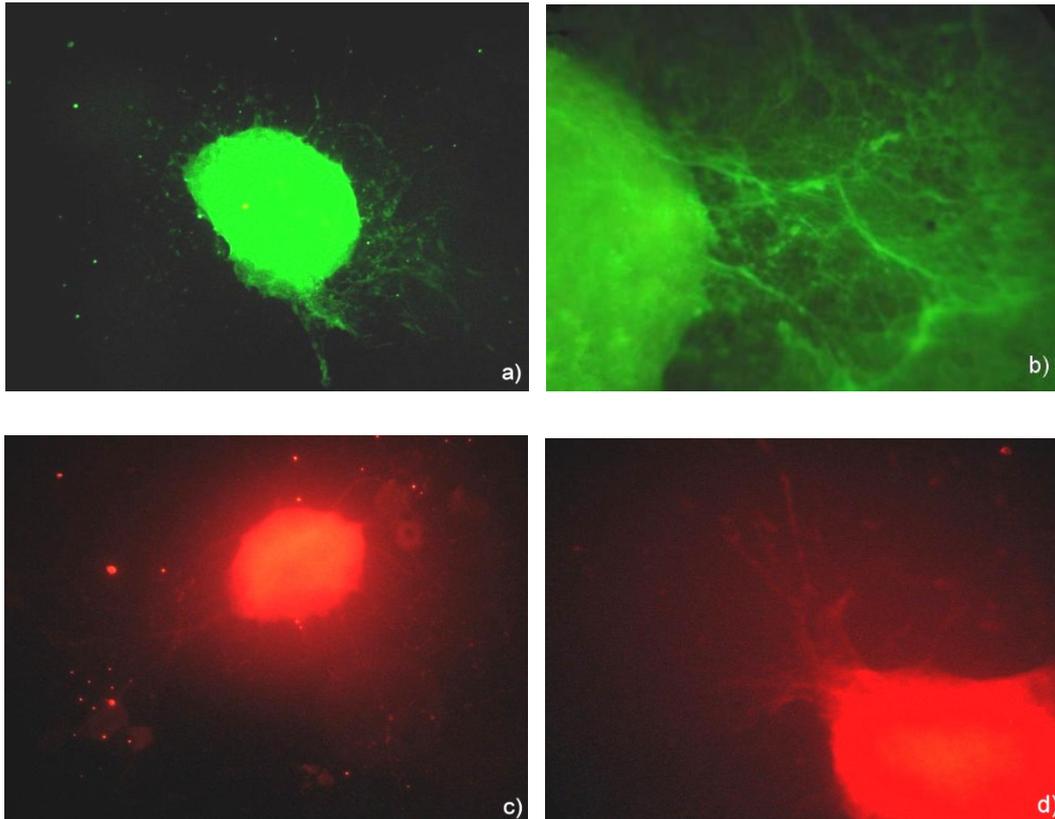


Abbildung 39: Immunfluoreszenzfärbung der in den PF von EM-Patientinnen inkubierten Hinterwurzelganglien mit Anti-S100, Anti-CB, Anti-CR und Anti-PV. a) In der PF einer EM-Patientin inkubiertes DRG mit S100-pos. NF-Aussprossungen, **b)** mit CB-pos. sowie **c)** mit CR-pos. und **d)** mit PV-pos. NF-Aussprossungen. 200 und 400 fache Vergrößerung.

4 Diskussion

Endometrioseläsionen besitzen neurotrophe Eigenschaften und führen zu Innervationsveränderungen, die sehr wahrscheinlich mit an der Pathogenese der Endometriose-assoziierten Schmerzen beteiligt sind (Anaf et al., 2002; Mechsner et al., 2007). Die Beteiligung der sensiblen und sympathischen Nervensysteme im Rahmen entzündlicher Prozesse (Lorton et al., 1999; Straub, 2007), die möglichen Interaktionen von Neurotrophinen und CaBP (Egea et al., 2000; Fiumelli et al., 2000) sowie deren möglicher Einfluss auf chronische Inflammationen veranlassten dazu die Beteiligung der CaBP an den chronischen Entzündungsprozessen und der neurogenen Schmerzpathogenese der EM zu analysieren. In dieser Arbeit wurde daher das Vorkommen von CaBP-positiven NF läsionsnah und in der Peripherie der pEL und rEM, im gesunden Peritoneum sowie im Darm und Vagina von Patientinnen ohne EM analysiert. Calcium spielt als intrazellulärer second-messenger eine tragende Rolle in Entzündungsprozessen und ist an Signaltransduktionen verschiedener Zellen, einschließlich Neuronen, Lymphozyten, Muskelzellen und Leukozyten beteiligt (Gronski et al., 2009). Ein Calciumanstieg durch Aktivierung von Oberflächenrezeptoren immunologischer Zellen aktiviert verschiedenste Signalwege, die die Aktivierung, Proliferation und vielseitige Effektorfunktionen im Rahmen von Entzündungsprozessen beeinflussen (Lewis, 2001). Auch hinsichtlich der Beteiligung des proinflammatorisch wirkenden sensiblen Nervensystems in der EM muss die Freisetzung von intrazellulärem Calcium berücksichtigt werden. Ausgehend von der Hypothese, dass Vitamin D als Modulator des Immunsystems potenziell an der Pathogenese der EM beteiligt sein könnte, wurde bereits gezeigt, dass die Calcium- und Vitamin D-Konzentrationen im Serum von EM-Patientinnen höher liegen als bei Frauen ohne EM, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Somigliana et al., 2007).

Das Ziel dieser Arbeit liegt darin jene Faktoren zu betrachten, die im Rahmen entzündlicher Prozesse direkt auf die ansteigenden intrazellulären Calciumkonzentrationen wirken.

4.1 Der Einfluss der Calcium-bindenden Proteine auf die Endometriose-assoziierte Innervation und die Schmerzpathogenese der Endometriose

Wie Arnold et al. bereits zeigten, konnte auch im Rahmen dieser Arbeit in den peripheren Anteilen peritonealer Endometriose eine signifikant reduzierte Anzahl intakter Nervenfasern im Vergleich zu den läsionsnahen Anteilen und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dieser signifikant niedrigere Anteil ist assoziiert mit dem geringeren Vorkommen sympathischer NF in der pEL im Vergleich zum gesunden Peritoneum von Patientinnen ohne EM, was abnormale neuronale Prozesse im läsionsfreien Peritoneum von EM-Patientinnen vermuten lässt (Arnold et al., 2013). Jedoch zeigten Arnold et al. auch, dass die Anzahl sympathischer Nervenfasern in der Peripherie signifikant höher ist als jene nahe den Läsionen peritonealer EM. Die Tatsache der generell verminderten NF-Dichte in der Peripherie peritonealer EM, aber gleichzeitig peripher erhöhten Dichte sympathischer NF, lässt in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass es eine Relation zwischen sympathischen NF und CaBP-positiven NF, die vor allem in der Peripherie peritonealer und teilweise auch rectovaginaler EM verstärkt exprimiert werden, gibt. Es ist bekannt, dass das sympathische Nervensystem pro- und im Verlauf einer entzündlichen Reaktion antiinflammatorisch wirkt (Härle et al., 2005). In Bezug auf die Rolle der CaBP in der Schmerzpathogenese der EM gilt es in Zukunft herauszufinden, ob selbiges auch für die CaBP gelten könnte. Diese Veränderungen im peripheren Nervensystem im Rahmen der chronischen Entzündung der EM scheinen laut Arnold et al. nicht nur auf die Läsionen peritonealer Endometriose bezogen zu sein, sondern auch auf das peripher scheinbar EM-freie Peritoneum von EM-Patientinnen. Diese Tatsache bedingt die Betrachtung weiterer Faktoren wie der CaBP, die in der Peripherie peritonealer EM eine Rolle spielen könnten. In der rEM ergaben sich für die Dichte intakter Nervenfasern keine signifikanten Unterschiede. Die Quantität der EM-assoziierten Innervation scheint keine Auswirkungen auf die Schmerzintensität der betroffenen Patientinnen zu haben, da sich hinsichtlich der verschiedenen Schmerzintensitäten keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Um den Einfluss der Quantität der EM-assoziierten Innervation auf die Schmerzintensität in der Endometriose genauer darzustellen, bedarf es künftig weiterer Untersuchungen vor allem an einem größeren Patientinnenkollektiv.

Diskussion

Hinsichtlich der myelinisierten NF zeigten sich innerhalb der pEL keine signifikanten Unterschiede. Während mit PGP 9.5 der Nachweis intakter NF erfolgte, lassen sich mit S100B intakte und nicht intakte myelinisierte NF nachweisen. Die Tatsache, dass es für S100B im Rahmen der pEL keinen signifikanten Unterschied gibt, lässt sich dahingehend begründen, dass der Unterschied für PGP 9.5 in der pEL auf einer unterschiedlichen Verteilung rein intakter NF beruht, während mit S100B auch die nicht intakten NF mit in das Ergebnis einfließen. In der rEM hingegen ließen sich im Mesocolon und der Muscularis der rEM signifikant mehr S100B-positive NF nachweisen als in der Kontrollgruppe. Im zentralen Nervensystem konnte bereits beobachtet werden, dass S100B abhängig von seiner Konzentration trophische oder toxische Einflüsse nehmen kann (Van Eldik et al., 2003). Während neuro-inflammatorischer Prozesse erreicht S100B toxische Konzentrationen und stimuliert dadurch die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (Griffin et al., 1998; Petrova et al., 2000; Adami et al., 2001). Auch in enterischen Gliazellen des humanen Intestinaltrakt konnten Cirillo et al. eine Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse durch eine S100B Überexpression nachweisen. Möglicherweise nimmt S100B also Einfluss auf die chronisch entzündlichen Prozesse in der rectovaginalen EM.

Im Vergleich der Expression von S100B in den PF von EM-Patientinnen verschiedener Schmerzintensität zeigte sich in der PF von EM-Patientinnen mit leichter Schmerzsymptomatik eine signifikant höhere S100B Expression als in PF von EM-Patientinnen mit starker Schmerzsymptomatik. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass aus neutrophilen Granulozyten freigesetztes S100A9 in der Lage ist, im Rahmen einer durch Glykogen oder Carrageen induzierten neutrophilen Peritonitis, die entzündliche Schmerzsymptomatik zu reduzieren (Giorgi et al., 1998; Pagano et al., 2002). Möglicherweise lassen sich auch dem S100B solche Eigenschaften zusprechen, so dass auch S100B in der PF von EM-Patientinnen eine ähnlich schmerzreduzierende Wirkung ausübt und die erhöhte Expression von S100B in der PF von Patientinnen mit leichter Schmerzsymptomatik im Vergleich zu jenen mit starker Schmerzsymptomatik somit erklärt werden kann. Allerdings blieb das Ausmaß der S100B-Expression im Rahmen der EM, vor allem der pEL, hinter den in dieser Arbeit erwarteten Ergebnissen zurück, so dass die Rolle des S100B weiterhin schwer einzuschätzen ist. Zwar konnte in der bisherigen Literatur mehrfach eine Beteiligung von S100B an ähnlichen entzündlichen Prozessen wie sie in der EM

Diskussion

stattfinden gezeigt werden, jedoch ließen sich im Rahmen dieser Arbeit selbige Ergebnisse nicht in ausreichendem Maße reproduzieren.

Die CaBP Calbindin, Calretinin, Calmodulin und Parvalbumin ließen sich in der pEL und den rEM alle in einer signifikant höhere Expression in den Endometriose-assoziierten Nervenfasern nachweisen. Da es bisher jedoch an Literatur mangelt, die alle CaBP zusammenhängend und überhaupt ihre Rolle in der Schmerzpathogenese der EM betrachtet, erfolgt im weiteren Verlauf eine getrennte und detaillierte Diskussion der Rolle der einzelnen Calcium-bindenden Proteine in der Endometriose-assoziierten Innervation.

Für Calbindin konnte in der pEL und rEM ein erhöhtes Vorkommen CB-positiver NF nachgewiesen werden. CB-positive NF konnten in den peripheren Anteilen der pEL und in der rEM erhöht nachgewiesen werden. In der rEM ergab sich in den peripheren Anteilen des Mesocolons und der Submucosa eine signifikant höhere CB-Dichte als nahe der Läsionen. Eine Erhöhung CB-positiver NF konnte auch in einem Modell chemisch induzierter Colitis nachgewiesen werden (Wojtkiewicz et al., 2012), so dass eine Beteiligung von CB am chronisch entzündlichen Charakter der peritonealen und rectovaginalen Endometriose, vor allem in den peripheren EM-freien Anteilen, angenommen werden kann. Möglicherweise ist CB effektiv an neuronalen Prozessen beteiligt, die scheinbar auch in den peripheren Anteilen der EM stattfinden. In Hinblick auf die verschiedenen Schmerzintensitäten der EM-Patientinnen zeigte sich in der pEL, dass bei Patientinnen mit leichten Schmerzen eine höhere CB-positive NF-Dichte nachweisbar war. In einem Modell induzierten neuropathischen und inflammatorischen Schmerzes konnte gezeigt werden welche aktive Rolle CB-positive Neuronen in nozizeptiven sensorischen Übertragungen spielen (Egea et al., 2012). Um eine Reaktion auf neurogenen und inflammatorischen Schmerz zu erzeugen, wurde CB-Knock-out Mäusen und Wildtypmäusen Formalin, Glutamat und Essigsäure injiziert. Die CB-Knock-out Mäuse reagierten auf jede der Injektionen signifikant später mit einer Schmerzreaktion als die Wildtypmäuse (Egea et al., 2012). Laut Egea et al. scheint das Vorkommen von CB zu einem schnellen und stärkeren Ansprechen auf Schmerzreize zu führen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CB eher einen schmerzfördernden Charakter hat.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass eine höhere CB-positive NF-Dichte mit leichten Schmerzen einhergeht und EM-Patientinnen mit starken Schmerzen eine geringere Dichte CB-positiver NF aufweisen, so dass die Ergebnisse von Egea et al. nicht vollständig reproduziert werden konnten. Möglicherweise ist die besagte schmerzfördernde Rolle des CB in der EM limitiert, so dass einhergehend mit einer stärkeren Schmerzintensität der Einfluss anderer Faktoren überwiegt und die Rolle des CB in den Hintergrund rückt. CB scheint eine Rolle im Rahmen entzündlicher Prozesse und der Schmerzpathogenese der EM zu spielen, um diese jedoch vollständig zu verstehen bedarf es weiterer Untersuchungen. In der rEM ergaben sich zwischen den Schmerzintensitäten keine signifikanten Unterschiede für CB. Auch in den PF von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM sowie in den PF verschiedener Schmerzintensität ließ sich CB gleichermaßen nachweisen.

Die Dichte CR-positiver NF liegt in den läsionsnahen und peripheren Anteilen der pEL und in allen Schichten der rEM signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Sojka et al. zeigten in einem Modell induzierter akuter Gonarthritits jedoch, dass die CR-Expression unter inflammatorischen Bedingungen nicht signifikant ansteigt (Sojka et al., 2010). In den PF von Endometriosepatientinnen mit leichter Schmerzsymptomatik konnte eine signifikant stärkere CR-Expression nachgewiesen werden als bei Endometriosepatientinnen ohne Schmerzen. Im zentralen Nervensystem ist CR in der Lage die durch Plasmaproteine und intrazelluläre Calciumkanäle regulierten Calciumsignale zu beeinflussen (Dargan et al., 2004). In Kulturen neokortikaler Neuronen von Ratten konnte bereits nachgewiesen werden, dass CR exprimierende Neuronen induzierten Störungen der Calciumhomöostase besser standhalten als jene Neuronen, die kein CR exprimieren (Lukas et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Arbeit für CR entsprechen nicht denen der bereits bekannten Studien (Sojka et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit verhielt sich die Expression von CR in der EM anders als in den nicht entzündlichen Kontrollen, so dass sich die Frage stellt, ob CR in der entzündlichen Pathogenese der EM nicht ähnlich protektiv auf die EM-assoziierten NF wirken könnte, wie es im zentralen Nervensystem nachgewiesen wurde (Lukas et al., 1994). Die Rolle des CR bedarf hinsichtlich des inflammatorischen Charakters der EM in jedem Fall weiterer Untersuchungen.

CM-positive NF konnten in der pEL sowie in den mesocolischen und musculären Anteilen der rEM in einer signifikant höheren Dichte nachgewiesen werden. In einem

Diskussion

Tiermodell neuropathischen Schmerzes konnte gezeigt werden, dass die Ca^{2+} /CM-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) maßgeblich an der Aktivierung der cytosolischen Phospholipase A2 (cPLA2) beteiligt ist (Hasegawa et al., 2009). Die cPLA2 wird durch exogene Stimuli aktiviert und beispielsweise bei induzierten Nervenschädigungen freigesetzt (Hasegawa et al., 2009). Durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-konzentration kann die Aktivität der cPLA2 gesteigert werden (Hirabayashi et al., 2004). Als direkter Calciumsensor kann Calmodulin im Rahmen der entzündlichen Prozesse in der Endometriose auf die zur cPLA2-Aktivierung nötigen Calcium-konzentrationen Einfluss nehmen. Im Vergleich der EM-Patientinnen verschiedener Schmerzintensität ergab sich für CM in der pEL eine signifikant niedrigere Dichte CM-positiver NF bei EM-Patientinnen mit starken Schmerzen im Vergleich zu jenen ohne Schmerzen. In der rEM ergaben sich zwischen den Schmerzintensitäten keine signifikanten Unterschiede. In einem Mausmodell induzierter neurogener Zystitis konnte nach Analyse der Schmerzweiterleitungswege des Dorsalhorns nachgewiesen werden, dass die CaMKII überexprimiert wird und zum pelvinen Schmerz in Folge einer neurogenen Zystitis beiträgt (Yang et al., 2012). CM scheint im Rahmen der Schmerzweiterleitung eine wichtige Rolle zu spielen, denn es wurde auch die Beteiligung von Calcium und CM an der Desensibilisierung des molekularen Schmerzrezeptors Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) nachgewiesen (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004; Lishko et al., 2007). Da die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen bisheriger Studien gewissermaßen konform gehen, erscheint eine Beteiligung des CM im Rahmen des in der EM diskutierten neuropathischen Schmerzes möglich.

PV-positive NF ließen sich signifikant erhöht in der pEL sowie im Mesocolon der rEM nachweisen. Signifikant erniedrigt fand sich PV in den läsionsnahen submucösen Anteilen der rEM. Die Downregulation von PV wurde bereits von Zacharova et al. 2008 im Rahmen einer in einem Rattenmodell induzierten Gonarthritits beschrieben. Nach peripherer Inflammation ließ sich PV im superficialen Dorsalhorn ipsilateral zur induzierten Gonarthritits signifikant reduziert nachweisen. Diese Reduktion reflektiert eine reduzierte Expression von PV in inhibitorischen GABAergen Neuronen. Die verminderte PV-Konzentration in prä-synaptischen GABAergen Bereichen kann zu einer Potenzierung inhibitorischer Transmissionen im Rückenmark führen und auf diese Weise die nozizeptive Transmission modulieren (Zacharova et al., 2008). Möglicherweise wirkt PV im Rahmen der EM ähnlich modulierend auf nozizeptive

Diskussion

Transmissionen. 2010 wies Zacharova zusammen mit Sojka et al. in einer anderen PV-Studie jedoch nach, dass PV im Rahmen einer induzierten Gonarthritits hochreguliert würde (Sojka et al., 2010). Hinsichtlich der verschiedenen Schmerzintensitäten der EM-Patientinnen ergaben sich für PV keine signifikanten Unterschiede in der pEL und rEM. PV nimmt in Hinblick auf seine Rolle im Rahmen der Endometriose-assoziierten Innervation eine eher eigenwilligere Rolle ein. Für PV konnte in einem Tiermodell zwar gezeigt werden, dass es als intrazellulärer Calciumpuffer effektiv auf lokale Entzündungsreaktionen nach akuter Verletzung einwirken kann (Paizs et al., 2004), die Rolle des PV scheint im Rahmen der EM jedoch schwer klassifizierbar. Während sich eine reduzierte Expression, ähnlich in der bisherigen Literatur beschrieben, möglicherweise positiv auf die Schmerzpathogenese der EM auswirkt, bleibt die Frage nach der Auswirkung einer erhöhten Expression von PV in der EM weiterhin klärungsbedürftig.

Mit dem Nachweis von GAP 43-positiven NF konnten neu aussprossende NF nachgewiesen werden. Es ergab sich eine signifikant erhöhte Anzahl GAP 43-positiver NF in den peripheren Anteilen der pEL. Bereits 2007 wiesen Mechsner et al. eine Colokalisation von unreifen NF und GAP 43 nach (Mechsner et al., 2007). Der Nachweis unreifer NF in den peripheren Anteilen peritonealer Endometriose lässt in Bezug auf die bisher diskutierte Verteilung CaBP-positiver NF annehmen, dass im Rahmen der Endometriose-assoziierten Innervation ein Zusammenhang zwischen den peripher neu aussprossenden NF und den CaBP besteht. Dieser mögliche Zusammenhang muss in weiteren Studien näher betrachtet werden. Hinsichtlich der verschiedenen Schmerzintensitäten der EM-Patientinnen ergaben sich für GAP 43 keine signifikanten Unterschiede in der pEL und rEM.

Die Gegenüberstellung der Expression Calcium-bindender Proteine in Endometriose-assoziierten Nervenfasern in der peritonealen und rectovaginalen EM ergab, dass sich die CaBP vor allem in der peritonealen EM sehr ähnlich verhalten. Dieses Verhalten deutet möglicherweise auf eine synergistische Wirkweise im Rahmen der chronischen Inflammation und des chronisch neuropathischen Schmerzes der EM hin. Im Rahmen der rectovaginalen EM verhielten sich die CaBP weniger homogen. Betrachtet man die peritoneale und rectovaginale Endometriose hinsichtlich ihres Schmerzcharakters, so erscheint eine unterschiedliche Ausprägung der Expression der CaBP logisch. Während bei der pEL vor allem ein chronischer Dauerschmerz

besteht, verursacht die rEM eher zyklische Schmerzen. Möglicherweise liegt in der unterschiedlichen Ausprägung der Schmerzen eine Ursache für die verschiedenen Expressionen CaBP in der pEL und rEM.

4.2 EM-abhängige Modulation der Expression Calcium-bindender Proteine in sensiblen Hinterwurzelganglien und PC12-Zellen

Um Kenntnisse darüber zu gewinnen, ob die PF von Endometriosepatientinnen Einfluss auf die Expression der CaBP in neuronalem Gewebe haben, wurden sensible Hinterwurzelganglien im Rahmen eines Neuronalen Wachstums-Assays (NWA) und neuronale PC12-Zellen in den PF von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM inkubiert. In sensiblen Hinterwurzelganglien, die in den PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden, ließ sich ein signifikant stärkeres Neuritenwachstum nachweisen als in jenen, die in den PF von Patientinnen ohne EM inkubiert wurden. Auch andere Studien zeigen, dass die PF von EM-Patientinnen Nerven-aussprossungen in sensible Ganglien induzieren können (Barcena de Arellano et al., 2011; Arnold et al., 2012). Ein qualitativer Nachweis der CaBP in den sensiblen Hinterwurzelganglien und ihren Nerven-aussprossungen konnte mittels Immunfluoreszenz erbracht werden. Nach Inkubation der sensiblen Hinterwurzelganglien in den PF von EM-Patientinnen konnte eine Expression der CaBP S100B, CB, CR und PV nachgewiesen werden. In jenen, die in den Peritonealflüssigkeiten von Patientinnen ohne Endometriose inkubiert wurden, hingegen nicht. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die PF von Endometriosepatientinnen modulierend auf die Expression der CaBP in den neuen Nerven-aussprossungen der sensiblen Hinterwurzelganglien wirken könnte.

Hinsichtlich der PC12-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die PC12-Zellen, die in den PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden, eine höhere Proliferationsrate aufweisen als jene, die in den PF der Kontrollgruppe inkubiert wurden (Barcena de Arellano et al., 2013). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die PF von EM-Patientinnen proliferative Prozesse in neuronalem Gewebe induzieren. In Einklang mit diesen Ergebnissen demonstrierten Bersinger et al., dass Neuroblastomzellen in Gegenwart von PF von EM-Patientinnen eher proliferieren (Bersinger et al., 2009). Zusätzlich wiesen die in den PF von EM-Patientinnen inkubierten PC12-Zellen

Diskussion

vermehrt Nervenausprossungen auf. Im Vergleich der Expressionen der CaBP in PC12-Zellen, die in den PF von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM (Kontrollgruppe) sowie in jenen PC12-Zellen, die in den PF von EM-Patientinnen verschiedener Schmerzintensität inkubiert wurden, konnte nur für CB ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. CB konnte in den PC12-Zellen, die in den PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden, signifikant erhöht nachgewiesen werden. Hinsichtlich der verschiedenen Schmerzintensitäten ergab sich für CB eine signifikant höhere Expression für EM-Patientinnen mit leichten Schmerzen im Vergleich zu jenen ohne und mit starken Schmerzen. Eine Veränderung der CB-Expression nach Inkubation in den PF von EM-Patientinnen deutet darauf hin, dass die Expression von CaBP wie CB durch die in den PF enthaltenen Faktoren moduliert werden könnte. Auch in PC12-Zelllinien selbst ist eine konstante CB-Expression bekannt (Qing et al., 1998). Im Rahmen einer Morbus Alzheimer Studie konnte anhand einer PC12-Zellkultur gezeigt werden, dass CB exprimierende neuronale Zellen resistenter gegenüber, durch eine Presenilin-1 Mutation ausgelöstem, oxidativem Stress und daraus resultierender Apoptose sind (Guo et al., 1998). Bezugnehmend auf die CB-Ergebnisse in Nervenfasern der pEL unter Berücksichtigung der Schmerzintensität, nimmt CB scheinbar auch im Rahmen seiner Expression in den PC12-Zellen in einem definierten Umfang Einfluss auf die Schmerzpathogenese der EM-Patientinnen. Mit steigender Schmerzintensität scheint die CB-Expression jedoch wieder abzunehmen und der Einfluss von CB auf die Schmerzpathogenese der EM an seine Grenzen zu stoßen. Eine Einflussnahme der PF von EM-Patientinnen auf die CB-Expression in PC12-Zellen erscheint möglich. Die Ergebnisse der CB-Expression in PC12-Zellen lassen jedoch ebenfalls eine mehrdeutige Rolle von CB vermuten, die es in weiteren Studien näher zu betrachten gilt.

Gegensätzlich zu den eben diskutierten Ergebnissen für CB konnte CR in den PC12-Zellen, die in den PF von EM-Patientinnen inkubiert wurden, signifikant erniedrigt nachgewiesen werden. D'Orlando et al. zeigten 2001 zwar anhand eines Modells Glutamat-sensitiver P19-Zellen, dass CR inhibierend auf fortschreitendem Zelluntergang wirken kann, da die Hyperaktivierung von Glutamatrezeptoren im Rahmen von Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer und Parkinson zu neuronalen Schädigungen führt (Lipton et al., 1994) und die Aktivität dieser Rezeptoren mit einem Calcium-Einstrom assoziiert ist, der als Initiator von Zellschädigungen bis hin

Diskussion

zum Zelltod gilt (Schanne et al., 1979), jedoch lassen sich diese Erkenntnisse nicht mit den Ergebnissen der PC12-Zellkultur dieser Arbeit in Einklang bringen.

Nach Inkubation in den PF von EM-Patientinnen weisen die PC12-Zellen Disruptionen in der Expression Calcium-bindender Proteine auf. Nichtsdestotrotz spielen die CaBP nicht nur im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle, auch in der Sensibilisierung von Neuronen des Hinterhorns, welches durch intrazellulär ansteigende Calciumkonzentrationen reguliert wird, scheinen sie involviert zu sein (Sojka et al., 2010).

5 Ausblick

Zu einem Großteil ergänzen die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse die bisher bekannten Daten zu dieser Thematik und bestätigen diese. Die Ergebnisse der gegebenen Literatur hinsichtlich der Rolle Calcium-bindender Proteine im Rahmen chronisch entzündlicher Prozesse sowie der Ausprägung von Schmerzen, auch neuropathischen Charakters, ließen sich in dieser Arbeit ebenfalls reproduzieren, so dass eine Beteiligung der CaBP auch im Rahmen der chronisch entzündlichen Prozesse und Schmerzpathogenese der EM möglich erscheint. Nichtsdestotrotz muss die Rolle der CaBP in der peritonealen und rectovaginalen EM weiter aufgearbeitet werden, um diese besser verstehen zu können. Es müssen weitere Studien zur Klärung ihrer endgültigen Funktion durchgeführt werden. Hier kann zum einen neben dem S100B ein weiterer Nachweis der im Text beschriebenen S100-Untertypen A8 und A9 vor allem in Bezug auf die Schmerzpathogenese der EM erfolgen. Der Nachweis einer Verbindung von CM und der CaMKII in der pEL und rEM kann in Bezug auf die gegebene CM-Expression mehr Klarheit über die Rolle des CM im Rahmen des neuropathischen Schmerzes in der EM erbringen. Eine mögliche Stickstoffmonoxid-Abhängigkeit im Rahmen der chronischen Entzündung in der EM sollte ebenfalls genauer untersucht werden. Des Weiteren wäre eine genauere Klassifizierung der Nerventypen der CaBP-positiven NF sinnvoll, um die Expression der CaBP in sensiblen, sympathischen sowie parasymphatischen NF und auch ihre Relation zu GAP 43-positiven NF besser einordnen und verstehen zu können. In dem gegebenen Ausblick wird deutlich, dass mit dieser Arbeit erst ein Grundstein zum besseren Verständnis der Rolle der CaBP in der EM-assoziierten Innervation gelegt wurde und weitere Studien nötig und sinnvoll sind, um die Beteiligung der CaBP an der Schmerzpathogenese und entzündlichen Komponente der EM verstehen zu können.

6 Zusammenfassung

Endometriose (EM) ist eine östrogenabhängige chronisch entzündliche Erkrankung, die mit chronischen Schmerzen assoziiert ist. Die Beteiligung Calcium-bindender Proteine (CaBP) im Rahmen entzündlicher Prozesse ist bereits bekannt und veranlasste dazu ihre Rolle in der EM-assoziierten Innervation und der Schmerzpathogenese sowie im Rahmen des chronisch entzündlichen Charakters der EM zu analysieren. Es erfolgte der immunhistochemische Nachweis (IHC) intakter Nervenfasern und von S100B, CB, CR, CM und PV sowie GAP 43 (neuronaler Wachstumsmarker) in Nervenfasern (NF) der läsionsnahen und peripheren Anteile peritonealer (n=20) und rectovaginaler (n=20) EM sowie in EM-freiem Peritoneum (n=10), gesundem Darm (n=7) und Vagina (n=7). Ebenso erfolgte der Nachweis CaBP per Immunfluoreszenz in sensiblen Hinterwurzelganglien, die in Peritonealflüssigkeiten (PF) von Patientinnen mit (n=33) und ohne EM (n=11) inkubiert wurden. Mittels Western-Blot Analyse erfolgte der Nachweis der CaBP in den PF von Patientinnen mit (n=33) und ohne (n=11) peritonealer EM (n=33) sowie in neuronalen PC12-Zellen, die in PF von Patientinnen mit (n=30) und ohne EM (n=5) inkubiert wurden. Die Schmerzintensitäten (SI), Zyklusphasen, das klinische Stadium und eine mögliche Hormoneinnahme wurden ebenfalls berücksichtigt. In den peripheren Anteilen der pEL ergab sich im Vergleich zu den läsionsnahen Anteilen sowie zum gesunden Peritoneum eine signifikant niedrigere Dichte intakter Nervenfasern. Alle CaBP ließen sich in einer signifikant höheren Expression in der pEL nachweisen. Für CB ergab sich unter Berücksichtigung der SI eine höhere CB-positive NF-Dichte im Rahmen leichter SI, für CM eine niedrigere CM-positive NF-Dichte für starke SI. Auch in der rEM zeigten sich für fast alle CaBP eine signifikant höhere Expression als im gesunden Kontrollgewebe. S100B, CB und CR ließen sich in den PF von Patientinnen mit und ohne EM gleichermaßen nachweisen. Unter Berücksichtigung der SI ergaben sich für S100B und CR signifikante erhöhte Expressionen für EM-Patientinnen mit leichter SI. In neuronalen PC12-Zellen ließ sich nach Inkubation in den PF von EM-Patientinnen eine signifikant erhöhte CB-Expression mit höchster Ausprägung im Rahmen leichter SI sowie eine insgesamt erniedrigte CR-Expression nachweisen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der CaBP in EM-assoziierten NF überexprimiert zu sein scheint. Ebenso scheint die PF von EM-Patientinnen Einfluss auf die Expression der CaBP in neuronalem Gewebe zu

Zusammenfassung

nehmen. Eine Beteiligung der CaBP im Rahmen der Schmerzpathogenese und des chronisch entzündlichen Charakters der EM erscheint anhand der Ergebnisse dieser Arbeit möglich.

7 Literaturverzeichnis

Abbott, J., J. Hawe, D. Hunter, M. Holmes, P. Finn and R. Garry (2004). "Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial." *Fertil Steril* 82(4): 878-884.

Adami, C., G. Sorci, E. Blasi, A. L. Agneletti, F. Bistoni and R. Donato (2001). "S100B expression in and effects on microglia." *Glia* 33(2): 131-142.

Allen, C., S. Hopewell, A. Prentice and D. Gregory (2009). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis." *Cochrane Database Syst Rev*(2): Cd004753.

Anaf, V., I. El Nakadi, V. De Moor, C. Chapron, G. Pistofidis and J. C. Noel (2011). "Increased nerve density in deep infiltrating endometriotic nodules." *Gynecol Obstet Invest* 71(2): 112-117.

Anaf, V., P. Simon, I. El Nakadi, I. Fayt, F. Buxant, T. Simonart, M. O. Peny and J. C. Noel (2000). "Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules." *Hum Reprod* 15(8): 1744-1750.

Anaf, V., P. Simon, I. El Nakadi, I. Fayt, T. Simonart, F. Buxant and J. C. Noel (2002). "Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis." *Hum Reprod* 17(7): 1895-1900.

Arnold, J., M. L. Barcena de Arellano, C. Ruster, G. F. Vercellino, V. Chiantera, A. Schneider and S. Mechsner (2012). "Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis." *Brain Behav Immun* 26(1): 132-141.

Arnold, J., G. F. Vercellino, V. Chiantera, A. Schneider, S. Mechsner and M. L. Barcena de Arellano (2013). "Neuroimmunomodulatory alterations in non-lesional peritoneum close to peritoneal endometriosis." *Neuroimmunomodulation* 20(1): 9-18.

ASRM (1996). "Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis." *Fertil Steril* 1997. 67(5): 817-21.

Auli, M., Y. Nasser, W. Ho, J. F. Burgueno, C. M. Keenan, C. Romero, K. A. Sharkey and E. Fernandez (2008). "Neuromuscular changes in a rat model of colitis." *Auton Neurosci* 141(1-2): 10-21.

Baimbridge, K. G., M. R. Celio and J. H. Rogers (1992). "Calcium-binding proteins in the nervous system." *Trends Neurosci* 15(8): 303-308.

Barcena de Arellano, M. L., J. Arnold, F. Vercellino, V. Chiantera, A. Schneider and S. Mechsner (2011). "Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions." *Fertil Steril* 95(3): 1123-1126.

Literaturverzeichnis

Barcena de Arellano, M. L., S. Munch, J. Arnold, S. Helbig, A. Schneider and S. Mechsner (2013). "Calcium-binding protein expression in peritoneal endometriosis-associated nerve fibres." *Eur J Pain*.

Berkley, K. J., N. Dmitrieva, K. S. Curtis and R. E. Papka (2004). "Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30): 11094-11098.

Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529.

Bersinger, N. A., M. H. Brodbeck, B. Jahns and M. D. Mueller (2009). "Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on neuroblastoma cells in culture." *Gynecol Endocrinol* 25(11): 707-712.

Borghese, B., D. Vaiman, F. Mondon, M. Mbaye, V. Anaf, J. C. Noel, D. de Ziegler and C. Chapron (2010). "[Neurotrophins and pain in endometriosis]." *Gynecol Obstet Fertil* 38(7-8): 442-446.

Brun, J. G., R. Jonsson and H. J. Haga (1994). "Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases." *J Rheumatol* 21(4): 733-738.

Bulun, S. E. (2009). "Endometriosis." *N Engl J Med* 360(3): 268-279.

Bulun, S. E., K. M. Zeitoun, K. Takayama, E. Simpson and H. Sasano (2000). "Aromatase as a therapeutic target in endometriosis." *Trends Endocrinol Metab* 11(1): 22-27.

Camagna, O., C. Dhainaut, O. Dupuis, E. Soncini, B. Martin, L. Palazzo, D. Chosidow and P. Madelenat (2004). "[Surgical management of rectovaginal septum endometriosis from a continuous series of 50 cases]." *Gynecol Obstet Fertil* 32(3): 199-209.

Choi, D. W. (1987). "Ionic dependence of glutamate neurotoxicity." *J Neurosci* 7(2): 369-379.

Cirillo, C., G. Sarnelli, G. Esposito, F. Turco, L. Steardo and R. Cuomo (2011). "S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation." *World J Gastroenterol* 17(10): 1261-1266.

Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol (Berl)* 181(3): 195-213.

D'Hooghe, T. M., S. Debrock, J. A. Hill and C. Meuleman (2003). "Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved?" *Semin Reprod Med* 21(2): 243-254.

Dale, C. S., N. Cenac, L. R. Britto, M. A. Juliano, L. Juliano, N. Vergnolle and R. Giorgi (2006). "The C-terminus of murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia induced by the agonist peptide of protease-activated receptor 2 (PAR2)." *Br J Pharmacol* 149(4): 374-384.

Literaturverzeichnis

Darai, E., I. Thomassin, E. Barranger, R. Detchev, A. Cortez, S. Houry and M. Bazot (2005). "Feasibility and clinical outcome of laparoscopic colorectal resection for endometriosis." *Am J Obstet Gynecol* 192(2): 394-400.

Dargan, S. L., B. Schwaller and I. Parker (2004). "Spatiotemporal patterning of IP3-mediated Ca²⁺ signals in *Xenopus* oocytes by Ca²⁺-binding proteins." *J Physiol* 556(Pt 2): 447-461.

Deavers, M. T., A. Malpica, J. Liu, R. Broaddus and E. G. Silva (2003). "Ovarian sex cord-stromal tumors: an immunohistochemical study including a comparison of calretinin and inhibin." *Mod Pathol* 16(6): 584-590.

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2010). "Diagnostik und Therapie der Endometriose."

Dmowski, W. P. and E. Radwanska (1984). "Current concepts on pathology, histogenesis and etiology of endometriosis." *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 123: 29-33.

Dogliani, C., A. P. Dei Tos, L. Laurino, P. Iuzzolino, C. Chiarelli, M. R. Celio and G. Viale (1996). "Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma." *Am J Surg Pathol* 20(9): 1037-1046.

Donato, R. (1991). "Perspectives in S-100 protein biology. Review article." *Cell Calcium* 12(10): 713-726.

Dougherty, P. M., K. A. Sluka, L. S. Sorkin, K. N. Westlund and W. D. Willis (1992). "Neural changes in acute arthritis in monkeys. I. Parallel enhancement of responses of spinothalamic tract neurons to mechanical stimulation and excitatory amino acids." *Brain Res Brain Res Rev* 17(1): 1-13.

Ebert, A. (2003). "Endometriose, ein Wegweiser für die Praxis." De Gruyter Verlag, Berlin.

Egea, J., C. Espinet, R. M. Soler, S. Peiro, N. Rocamora and J. X. Comella (2000). "Nerve growth factor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is modulated by Ca(2+) and calmodulin." *Mol Cell Biol* 20(6): 1931-1946.

Egea, J., E. Malmierca, A. O. Rosa, L. del Barrio, P. Negredo, A. Nunez and M. G. Lopez (2012). "Participation of calbindin-D28K in nociception: results from calbindin-D28K knockout mice." *Pflugers Arch* 463(3): 449-458.

Eide, F. F., D. H. Lowenstein and L. F. Reichardt (1993). "Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease." *Exp Neurol* 121(2): 200-214.

Eilers W., Agic A., Finas D., Banz C., et al. Neue Ansätze in der medikamentösen Therapie der Endometriose- eine kritische Bilanz. *Geburtsh Frauenheilk* 2006;66:559-65.

Literaturverzeichnis

Endo, T., K. Takazawa and T. Onaya (1985). "Parvalbumin exists in rat endocrine glands." *Endocrinology* 117(2): 527-531.

Fakih, H., B. Baggett, G. Holtz, K. Y. Tsang, J. C. Lee and H. O. Williamson (1987). "Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis." *Fertil Steril* 47(2): 213-217.

Fedele L., Bianchi S., Zanconato G., Portuese A., et al. Use of the levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 2001;485-8.

Ferrero, S., D. J. Gillott, V. Remorgida, P. Anserini, K. Y. Leung, N. Ragni and J. G. Grudzinskas (2007). "Proteomic analysis of peritoneal fluid in women with endometriosis." *J Proteome Res* 6(9): 3402-3411.

Fierro, L. and I. Llano (1996). "High endogenous calcium buffering in Purkinje cells from rat cerebellar slices." *J Physiol* 496 (Pt 3): 617-625.

Fiumelli, H., M. Kiraly, A. Ambrus, P. J. Magistretti and J. L. Martin (2000). "Opposite regulation of calbindin and calretinin expression by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons." *J Neurochem* 74(5): 1870-1877.

Gall, D., C. Roussel, I. Susa, E. D'Angelo, P. Rossi, B. Bearzatto, M. C. Galas, D. Blum, S. Schurmans and S. N. Schiffmann (2003). "Altered neuronal excitability in cerebellar granule cells of mice lacking calretinin." *J Neurosci* 23(28): 9320-9327.

Giorgi, R., R. L. Pagano, M. A. Dias, T. Aguiar-Passeti, C. Sorg and M. Mariano (1998). "Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain." *J Leukoc Biol* 64(2): 214-220.

Giudice, L. C. and L. C. Kao (2004). "Endometriosis." *Lancet* 364(9447): 1789-1799.
Griffin, W. S., J. G. Sheng, M. C. Royston, S. M. Gentleman, J. E. McKenzie, D. I. Graham, G. W. Roberts and R. E. Mrak (1998). "Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression." *Brain Pathol* 8(1): 65-72.

Gomes MK., Ferriani RA., Rosa e Silva JC. The levonorgestrel-releasing intrauterine system and endometriosis staging. *Fertil Steril* 2007;87:1231-4.

Gronski, M. A., J. M. Kinchen, I. J. Juncadella, N. C. Franc and K. S. Ravichandran (2009). "An essential role for calcium flux in phagocytes for apoptotic cell engulfment and the anti-inflammatory response." *Cell Death Differ* 16(10): 1323-1331.

Guo, Q., S. Christakos, N. Robinson and M. P. Mattson (1998). "Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3227-3232.

Halis, G., et al. (2006). "Schmerztherapeutische Optionen bei Endometriose." *Dtsch. Ärztebl.* 103 A 1146-1153.

Literaturverzeichnis

Halme, J., S. Becker, M. G. Hammond, M. H. Raj and S. Raj (1983). "Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis." *Am J Obstet Gynecol* 145(3): 333-337.

Harle, P., D. Mobius, D. J. Carr, J. Scholmerich and R. H. Straub (2005). "An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis." *Arthritis Rheum* 52(4): 1305-1313.

Hasegawa, S., Y. Kohro, M. Tsuda and K. Inoue (2009). "Activation of cytosolic phospholipase A2 in dorsal root ganglion neurons by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II after peripheral nerve injury." *Mol Pain* 5: 22.

Hirabayashi, T., T. Murayama and T. Shimizu (2004). "Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2." *Biol Pharm Bull* 27(8): 1168-1173.

Iacopino, A., S. Christakos, D. German, P. K. Sonsalla and C. A. Altar (1992). "Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity." *Brain Res Mol Brain Res* 13(3): 251-261.

Inoue, M., Y. Kobayashi, I. Honda, H. Awaji and A. Fujii (1992). "The impact of endometriosis on the reproductive outcome of infertile patients." *Am J Obstet Gynecol* 167(1): 278-282.

Ip, N. Y., Y. Li, G. D. Yancopoulos and R. M. Lindsay (1993). "Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT-3, and NT-4, but not NGF." *J Neurosci* 13(8): 3394-3405.

Jamieson, S. M., J. Liu, B. Connor and M. J. McKeage (2005). "Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss." *Cancer Chemother Pharmacol* 56(4): 391-399.

Jancso, N., A. Jancso-Gabor and J. Szolcsanyi (1967). "Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin." *Br J Pharmacol Chemother* 31(1): 138-151.

Jones, K. R., I. Farinas, C. Backus and L. F. Reichardt (1994). "Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development." *Cell* 76(6): 989-999.

Kaiser, A., A. Kopf, C. Gericke, J. Bartley and S. Mechsner (2009). "The influence of peritoneal endometriotic lesions on the generation of endometriosis-related pain and pain reduction after surgical excision." *Arch Gynecol Obstet* 280(3): 369-373.

Karagiannides, I. and C. Pothoulakis (2009). "Substance P, obesity, and gut inflammation." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16(1): 47-52.

Keckstein, J., U. Ulrich, O. Kandolf, H. Wiesinger and M. Wustlich (2003). "[Laparoscopic therapy of intestinal endometriosis and the ranking of drug treatment]." *Zentralbl Gynakol* 125(7-8): 259-266.

Literaturverzeichnis

Koller, M., A. Baumer and E. E. Strehler (1991). "Characterization of two novel human retropseudogenes related to the calmodulin-encoding gene, CaMII." *Gene* 97(2): 245-251.

Koninckx, P. R., S. H. Kennedy and D. H. Barlow (1998). "Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid." *Hum Reprod Update* 4(5): 741-751.

Koninckx, P. R., S. H. Kennedy and D. H. Barlow (1999). "Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid." *Gynecol Obstet Invest* 47 Suppl 1: 23-33.

Koninckx, P. R., C. Meuleman, S. Demeyere, E. Lesaffre and F. J. Cornillie (1991). "Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain." *Fertil Steril* 55(4): 759-765.

Kusakabe, K. T., H. Abe, T. Kondo, K. Kato, T. Okada and Y. Otsuki (2010). "DNA microarray analysis in a mouse model for endometriosis and validation of candidate factors with human adenomyosis." *J Reprod Immunol* 85(2): 149-160.

Leach, S. T. and A. S. Day (2006). "S100 proteins in the pathogenesis and diagnosis of inflammatory bowel disease." *Expert Rev Clin Immunol* 2(3): 471-480.

Lebovic, D. I., M. D. Mueller and R. N. Taylor (2001). "Immunobiology of endometriosis." *Fertil Steril* 75(1): 1-10.

Levine, J. D., R. Clark, M. Devor, C. Helms, M. A. Moskowitz and A. I. Basbaum (1984). "Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis." *Science* 226(4674): 547-549.

Levine, J. D., T. J. Coderre, C. Helms and A. I. Basbaum (1988). "Beta 2-adrenergic mechanisms in experimental arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12): 4553-4556.

Lewis, R. S. (2001). "Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* 19: 497-521.

Leyendecker, G., G. Kunz, M. Noe, M. Herbertz and G. Mall (1998). "Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra." *Hum Reprod Update* 4(5): 752-762.

Lipton, S. A. and P. A. Rosenberg (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." *N Engl J Med* 330(9): 613-622.

Lishko, P. V., E. Procko, X. Jin, C. B. Phelps and R. Gaudet (2007). "The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity." *Neuron* 54(6): 905-918.

Lorton, D., C. Lubahn, N. Klein, J. Schaller and D. L. Bellinger (1999). "Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis." *Brain Behav Immun* 13(4): 315-334.

Lugli, A., Y. Forster, P. Haas, A. Nocito, C. Bucher, H. Bissig, M. Mirlacher, M. Storz, M. J. Mihatsch and G. Sauter (2003). "Calretinin expression in human normal and

Literaturverzeichnis

neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples." *Hum Pathol* 34(10): 994-1000.

Lukas, W. and K. A. Jones (1994). "Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro." *Neuroscience* 61(2): 307-316.

Lynch, K., G. Fernandez, A. Pappalardo and J. J. Peluso (2000). "Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway." *Endocrinology* 141(11): 4209-4217.

Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" *Science* 285(5435): 1870-1874.

McCluggage, W. G. and P. Maxwell (2001). "Immunohistochemical staining for calretinin is useful in the diagnosis of ovarian sex cord-stromal tumours." *Histopathology* 38(5): 403-408.

Mechsner, S., J. Schwarz, J. Thode, C. Loddenkemper, D. S. Salomon and A. D. Ebert (2007). "Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions." *Fertil Steril* 88(3): 581-587.

Meyer R. (1919). "Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa." *Zbl Gynäkol* 43, 745–50.

Missmer, S. A. and D. W. Cramer (2003). "The epidemiology of endometriosis." *Obstet Gynecol Clin North Am* 30(1): 1-19, vii.

Moews, P. C. and R. H. Kretsinger (1975). "Refinement of the structure of carp muscle calcium-binding parvalbumin by model building and difference Fourier analysis." *J Mol Biol* 91(2): 201-225.

Mori, H., M. Sawairi, M. Nakagawa, N. Itoh, K. Wada and T. Tamaya (1991). "Peritoneal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease." *Am J Reprod Immunol* 26(2): 62-67.

Neugebauer, V. and H. G. Schaible (1990). "Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cat's knee." *J Neurophysiol* 64(1): 299-311.

Numazaki, M., T. Tominaga, K. Takeuchi, N. Murayama, H. Toyooka and M. Tominaga (2003). "Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13): 8002-8006.

O'Day, D. H. (2003). "CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins." *Cell Signal* 15(4): 347-354.

Literaturverzeichnis

- Oliker, A. J. and A. E. Harris (1971). "Endometriosis of the bladder in a male patient." *J Urol* 106(6): 858-859.
- Olive, D. L. and E. A. Pritts (2001). "Treatment of endometriosis." *N Engl J Med* 345(4): 266-275.
- Pagano, R. L., M. A. Dias, C. S. Dale and R. Giorgi (2002). "Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice." *Mediators Inflamm* 11(4): 203-210.
- Paizs, M., J. I. Engelhardt, Z. Katarova and L. Siklos (2010). "Hypoglossal motor neurons display a reduced calcium increase after axotomy in mice with upregulated parvalbumin." *J Comp Neurol* 518(11): 1946-1961.
- Parazzini, F. (1999). "Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi." *Hum Reprod* 14(5): 1332-1334.
- Parazzini, F., E. Di Cintio, L. Chatenoud, S. Moroni, C. Mezzanotte and P. G. Crosignani (1999). "Oral contraceptive use and risk of endometriosis. Italian Endometriosis Study Group." *Br J Obstet Gynaecol* 106(7): 695-699.
- Parmentier, M., E. Passage, G. Vassart and M. G. Mattei (1991). "The human calbindin D28k (CALB1) and calretinin (CALB2) genes are located at 8q21.3----q22.1 and 16q22----q23, respectively, suggesting a common duplication with the carbonic anhydrase isozyme loci." *Cytogenet Cell Genet* 57(1): 41-43.
- Petrova, T. V., J. Hu and L. J. Van Eldik (2000). "Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures." *Brain Res* 853(1): 74-80.
- Pinkert, T. C., C. E. Catlow and R. Straus (1979). "Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma." *Cancer* 43(4): 1562-1567.
- Pritts, E. A. and R. N. Taylor (2003). "An evidence-based evaluation of endometriosis-associated infertility." *Endocrinol Metab Clin North Am* 32(3): 653-667.
- Qing, H., H. Xu, Z. Wei, K. Gibson and X. M. Li (2003). "The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP+-induced apoptosis." *Eur J Neurosci* 17(8): 1563-1570.
- Rana, N., D. P. Braun, R. House, H. Gebel, C. Rotman and W. P. Dmowski (1996). "Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis." *Fertil Steril* 65(5): 925-930.
- Richardson, J. D. and M. R. Vasko (2002). "Cellular mechanisms of neurogenic inflammation." *J Pharmacol Exp Ther* 302(3): 839-845.
- Rier, S. E., A. K. Parsons and J. L. Becker (1994). "Altered interleukin-6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis." *Fertil Steril* 61(2): 294-299.

Literaturverzeichnis

- Rosenbaum, T., A. Gordon-Shaag, M. Munari and S. E. Gordon (2004). "Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin." *J Gen Physiol* 123(1): 53-62.
- Ryckman, C., K. Vandal, P. Rouleau, M. Talbot and P. A. Tessier (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." *J Immunol* 170(6): 3233-3242.
- Sampson, J. A. (1927). "Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation." *Am J Pathol* 3(2): 93-110.143.
- Schanne, F. A., A. B. Kane, E. E. Young and J. L. Farber (1979). "Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway." *Science* 206(4419): 700-702.
- A.E. Schindler (2008). "Operative und medikamentöse Therapie der Endometriose/Adenomyose." *J Gynäkol Endokrinol* 18, 18–26.
- Schrodt, G. R., M. O. Alcorn and J. Ibanez (1980). "Endometriosis of the male urinary system: a case report." *J Urol* 124(5): 722-723.
- Schwaller, B. (2009). "The continuing disappearance of "pure" Ca²⁺ buffers." *Cell Mol Life Sci* 66(2): 275-300.
- Schwaller, B. (2010). "Cytosolic Ca²⁺ buffers." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(11): a004051.
- Schwaller, B., M. Meyer and S. Schiffmann (2002). "'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice." *Cerebellum* 1(4): 241-258.
- Schwaller, B., I. V. Tetko, P. Tandon, D. C. Silveira, M. Vreugdenhil, T. Henzi, M. C. Potier, M. R. Celio and A. E. Villa (2004). "Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures." *Mol Cell Neurosci* 25(4): 650-663.
- Schweppe, K. W. (2003). "[Endometriosis--a disease that has no lobby]." *Zentralbl Gynäkol* 125(7-8): 233.
- Sojka, D., G. Zacharova, D. Spicarova and J. Palecek (2010). "Changes of calcium binding protein expression in spinothalamic tract neurons after peripheral inflammation." *Physiol Res* 59(6): 1011-1017.
- Somigliana, E., P. Panina-Bordignon, S. Murone, P. Di Lucia, P. Vercellini and P. Vigano (2007). "Vitamin D reserve is higher in women with endometriosis." *Hum Reprod* 22(8): 2273-2278.
- Spaczynski, R. Z. and A. J. Duleba (2003). "Diagnosis of endometriosis." *Semin Reprod Med* 21(2): 193-208.

Literaturverzeichnis

Starzinski-Powitz, A., A. Zeitvogel, A. Schreiner and R. Baumann (2001). "In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology." *Curr Mol Med* 1(6): 655-664.

Straub, R. H. and M. Cutolo (2007). "Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management." *Arthritis Rheum* 56(2): 399-408.

Strowitzki, T., J. Marr, C. Gerlinger, T. Faustmann and C. Seitz (2010). "Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicentre, open-label trial." *Hum Reprod* 25(3): 633-641.

Teepker, M., K. Munk, V. Mylius, A. Haag, J. C. Moller, W. H. Oertel and K. Schepelmann (2009). "Serum concentrations of s100b and NSE in migraine." *Headache* 49(2): 245-252.

Teodoro, F. C., M. F. Tronco Junior, A. R. Zampronio, A. C. Martini, G. A. Rae and J. G. Chichorro (2013). "Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models." *Neuropeptides* 47(3): 199-206.

Tokushige, N., R. Markham, P. Russell and I. S. Fraser (2006). "High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis." *Hum Reprod* 21(3): 782-787.

Tuttliès, F., J. Keckstein, U. Ulrich, M. Possover, K. W. Schweppe, M. Wustlich, O. Buchweitz, R. Greb, O. Kandolf, R. Mangold, W. Masetti, K. Neis, G. Rauter, N. Reeka, O. Richter, A. E. Schindler, M. Sillem, V. Terruhn and H. R. Tinneberg (2005). "[ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]." *Zentralbl Gynakol* 127(5): 275-281.

Ulrich, U. and J. Keckstein (2005). "[Diagnosing endometriosis]." *Zentralbl Gynakol* 127(5): 295-298.

Ulrich et al., 2009 ni U. Ulrich, F. Müller, F. Tuttliès, J. Keckstein (2009). "Diagnostik und Therapie der Endometriose – aktuelle Entwicklungen." *Frauenarzt* 50, 506–10.

Urdl, W. (2006). "Der derzeitige Stand der konservativen Therapie der Endometriose." *J Reproduktionsmed Endokrinol*. 2006, Bd. 3, S. 24-30.

Van Eldik, L. J. and M. S. Wainwright (2003). "The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain." *Restor Neurol Neurosci* 21(3-4): 97-108.

Vercellini, P. (1997). "Endometriosis: what a pain it is." *Semin Reprod Endocrinol* 15(3): 251-261.

Vercellini, P., F. Parazzini, G. Bolis, S. Carinelli, M. Dindelli, N. Vendola, L. Luchini and P. G. Crosignani (1993). "Endometriosis and ovarian cancer." *Am J Obstet Gynecol* 169(1): 181-182.

Literaturverzeichnis

Vercellini, P., E. Somigliana, P. Vigano, A. Abbiati, G. Barbara and P. G. Crosignani (2009). "Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments." *Drugs* 69(6): 649-675.

Vercellini, P., E. Somigliana, P. Vigano, A. Abbiati, G. Barbara and L. Fedele (2009). "Chronic pelvic pain in women: etiology, pathogenesis and diagnostic approach." *Gynecol Endocrinol* 25(3): 149-158.

Vernon, M. W., J. S. Beard, K. Graves and E. A. Wilson (1986). "Classification of endometriotic implants by morphologic appearance and capacity to synthesize prostaglandin F." *Fertil Steril* 46(5): 801-806.

Waldvogel, H. J., R. L. Faull, M. N. Williams and M. Dragunow (1991). "Differential sensitivity of calbindin and parvalbumin immunoreactive cells in the striatum to excitotoxins." *Brain Res* 546(2): 329-335.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991). Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1–8.

Willis, W. D. (2001). "Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses." *Ann N Y Acad Sci* 933: 142-156.

Wojtkiewicz, J., M. Rowniak, R. Crayton, M. Barczewska, M. Bladowski, A. Robak, Z. Pidsudko and M. Majewski (2012). "Inflammation-induced changes in the chemical coding pattern of colon-projecting neurons in the inferior mesenteric ganglia of the pig." *J Mol Neurosci* 46(2): 450-458.

Womack, M. D., A. B. MacDermott and T. M. Jessell (1988). "Sensory transmitters regulate intracellular calcium in dorsal horn neurons." *Nature* 334(6180): 351-353.

Woolf, C. J. and S. W. Thompson (1991). "The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states." *Pain* 44(3): 293-299.

Yamada, T., P. L. McGeer, K. G. Baimbridge and E. G. McGeer (1990). "Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K." *Brain Res* 526(2): 303-307.

Yang, H., T. H. Kim, H. H. Lee, K. C. Choi, Y. P. Hong, P. C. Leung and E. B. Jeung (2011). "Expression of calbindin-D28k and its regulation by estrogen in the human endometrium during the menstrual cycle." *Reprod Biol Endocrinol* 9: 28.

Yang, W., C. N. Rudick, E. Hoxha, S. A. Allsop, J. D. Dimitrakoff and D. J. Klumpp (2012). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with pelvic pain of neurogenic cystitis." *Am J Physiol Renal Physiol* 303(3): F350-356.

Yui, S., Y. Nakatani and M. Mikami (2003). "Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity." *Biol Pharm Bull* 26(6): 753-760.

Literaturverzeichnis

Zacharova, G., D. Sojka and J. Palecek (2009). "Changes of parvalbumin expression in the spinal cord after peripheral inflammation." *Physiol Res* 58(3): 435-442.

Zimmer, D. B. and L. J. Van Eldik (1989). "Analysis of the calcium-modulated proteins, S100 and calmodulin, and their target proteins during C6 glioma cell differentiation." *J Cell Biol* 108(1): 141-151.

8 Anhang

8.1 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Sylvia Mechsner bedanken, die mir während der Erarbeitung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem bedanke ich mich beim gesamten Team des Endometrioseforschungslabors für die tolle Zusammenarbeit in den letzten drei Jahren. Hier möchte ich ganz besonders Frau Maria Luisa Barcena de Arellano hervorheben, die stets einen endlos langen Geduldsfaden bewies.

Abschließend gebührt auch meiner Familie ein ganz besonderer Dank für die jahrelange Unterstützung in der Realisierung meiner Ausbildung sowie meinem liebevollen Ehemann, dem mittlerweile akzessorische Ohren gewachsen sind und der mich trotzdem bedingungslos liebt.

8.2 Lebenslauf

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

8.3 Publikationsliste

“Calcium-binding protein expression in peritoneal endometriosis-associated nerve fibres”, Barcena de Arellano ML, **Münch S**, Arnold J, Helbig S, Schneider A, Mechsner S; Eur J Pain, 2013

“The role of calcium-binding proteins in endometriosis-associated innervation”
Münch S, Barcena de Arellano ML, Vercellino GF, Chiantera V, Schneider A and Mechsner S; Poster Präsentation auf dem 28th Annual Meeting of ESHRE- European Society of Human Reproduction and Embryology, 2012, Istanbul, Türkei

“The role of calcium-binding proteins in endometriosis-associated innervation”, Barcena de Arellano ML, **Münch S**, Arnold J, Vercellino GF, Chiantera V, Schneider A, Mechsner S. (2012); 15th World Congress of Gynecological Endocrinology der ISGE, 2012, Florenz, Italien

“Die Rolle von Neurotrophinen und Calcium-bindenden Proteinen in der Endometriose-assoziierten Innervation “, **Münch S**, Barcena de Arellano ML, Arnold J, Rüster C, Vercellino GF, Chiantera V, Mechsner S; Poster Präsentation auf dem 9. Endometriosekongress deutschsprachiger Länder, 2011, Emmendingen, Deutschland

8.4 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sina Harf, geb. Münch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Die Rolle der Calcium-bindenden Proteine in der Endometriose-assoziierten Innervation** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit Frau PD Dr. med Sylvia Mechsner, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sina Harf, geb. Münch, hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

“*Calcium-binding protein expression in peritoneal endometriosis-associated nerve fibres*”, Barcena de Arellano ML, **Münch S**, Arnold J, Helbig S, Schneider A, Mechsner S; Eur J Pain, 2013

Beitrag im Einzelnen:

Die Doktorandin Frau Sina Harf, geb. Münch, übernahm die Durchführungen folgender Aufgaben und Versuchsreihen:

- Auswahl des Patientinnenkollektivs und Aufbereitung der Gewebeproben
- Immunhistochemische Färbungen in Präparaten peritonealer Endometriose und gesunden Peritoneums
- Expressionsanalysen in Peritonealflüssigkeiten von EM-Patientinnen und Patientinnen ohne EM sowie inkubierten PC12-Zellen mittels Western-Blot
- Erarbeitung und statistische Auswertungen der Ergebnisse der o.g. Versuchsreihen

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin