

Analyse der Lokalisationsmuster von Claudin 1, Claudin 5 und Claudin 10 in der
Endometriose und in der Adenomyose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Löffelmann, Anna
aus Buchen (Odenwald)

Gießen, 2026

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Gutachter: PD Dr. Lutz Konrad

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Tag der Disputation: 27.08.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie der Endometriose und der Adenomyose	1
1.2	Lokalisation und Klassifikationssysteme	2
1.3	Symptome und leitliniengerechte Diagnostik der Endometriose und Adenomyose ...	4
1.4	Leitliniengerechte Therapie der Endometriose und Adenomyose	7
1.5	Ätiologie der Endometriose und Adenomyose.....	9
2	Zielsetzung und Auswahl der Antikörper	13
2.1	Familie der Claudine	13
2.2	Claudin 10.....	14
2.3	Claudin 1.....	15
2.4	Claudin 5.....	16
2.5	Claudine in der Endometriose	16
2.6	Fragestellung	18
2.7	Patientenkollektiv und Gewebeproben	19
2.8	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	26
2.9	Chemikalien und Puffer.....	26
2.10	Geräte, Verbrauchsmaterial und Computerprogramme.....	27
3	Methode	29
3.1	Immunhistochemie	29
3.1.1	Herstellung der Paraffinschnitte.....	30
3.1.2	Protokoll der Immunhistochemie	31
3.2	Auswertung.....	33
3.2.1	H-Score.....	33
3.2.2	Lokalisationsscore.....	34
3.2.3	Vaskularisierungsscore.....	34
3.3	Statistische Analyse.....	40
4	Ergebnisteil	41
4.1	Qualitative und quantitative Analyse von Claudin 10.....	41
4.1.1	Vorexperimente zur Spezifität des Claudin 10 Antikörpers	41
4.1.2	Analyse des uterinen Expressionsmusters von Claudin 10.....	44
4.1.3	Analyse des Expressionsmusters von Claudin 10 in der Adenomyose.....	47
4.1.4	Analyse des Expressionsmusters von Claudin 10 in der extrauterinen Endometriose	50
4.1.5	Analyse der Lokalisationsverschiebung von Claudin 10	53
4.1.6	Zusammenfassung des Ergebnisteils von Claudin 10	57

4.2	Qualitative und quantitative Analyse von Claudin 1	58
4.2.1	Analyse des uterinen Expressionsmusters von Claudin 1	58
4.2.2	Analyse des Expressionsmusters von Claudin 1 in der Adenomyose.....	60
4.2.3	Analyse des Expressionsmusters von Claudin 1 in der extrauterinen Endometriose	63
4.2.4	Auffälligkeiten im Expressionsmuster von Claudin 1	66
4.2.5	Analyse der Co-Lokalisation von Endometrioseläsionen und Nerven	67
4.2.6	Zusammenfassung Ergebnisteil Claudin 1	72
4.3	Qualitative und quantitative Analyse von Claudin 5	73
4.3.1	Vergleichsfärbung mit CD31	73
4.3.2	Analyse des uterinen Expressionsmusters von Claudin 5	74
4.3.3	Analyse des Expressionsmusters von Claudin 5 in der Adenomyose und in der extrauterinen Endometriose	77
4.3.4	Analyse des Expressionsmusters von Claudin 5 im Myometrium.....	82
4.3.5	Vergleich der Claudin 5 Expression in extrauterinen Endometrioseläsionen und ihrer Umgebung	84
4.3.6	Aufschlüsselung des Vaskularisierungsscores	86
4.3.7	Morphometrische Analyse der Gefäßfläche.....	88
4.3.8	Zusammenfassung Claudin 5	92
5	Diskussion.....	94
5.1	Analyse der Expression von Claudin 10.....	94
5.2	Analyse der Expression von Claudin 1.....	98
5.3	Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf eine Epithelial-mesenchymale Transition	101
5.4	Analyse der Expression von Claudin 5.....	102
5.5	Stärken und Limitationen	106
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick	108
6	Zusammenfassung.....	110
7	Abkürzungsverzeichnis.....	112
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	115
9	Literaturverzeichnis	118
10	Publikationsverzeichnis.....	138
11	Ehrenwörtliche Erklärung	139
12	Danksagung	140

1 Einleitung

Die Endometriose und die Adenomyose sind zwei der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen der reproduktionsfähigen Frau. Während bei der Endometriose Zellen des Endometriums in extrauterinen Lokalisationen zu finden sind, ist die Adenomyose durch das Vorhandensein von Endometriumdrüsen und Stroma im Myometrium gekennzeichnet (Clement 2007). Die grundlegenden Kenntnisse über die Pathologie und Ätiologie dieser Erkrankungen sind auf J.A. Sampson (1873-1946) zurückzuführen (Sampson 1927). Typische Lokalisationen der Endometriose sind die Ovarien, das Peritoneum und die Organe des kleinen Beckens, wie zum Beispiel die Blase und das Rektum (Bulun et al. 2019).

Die ektopen Läsionen sind histologisch durch die Drüsenzellen und das gefäßreiche zellreiche Stroma des Endometriums charakterisiert (Clement 2007). In wie weit diese ektopen Drüsen- und Stromazellen den physiologischen Endometriumzellen in ihrem Aufbau und ihrer Ausstattung ähnlich sind, ist eine zentrale Forschungsfrage vieler wissenschaftlicher Arbeiten, so auch der Folgenden.

Nicht nur aus pathophysiologischer Sicht werfen die Endometriose und die Adenomyose noch viele Fragen auf, auch aus klinischer Sicht zählen sie aufgrund ihres heterogenen Erscheinungsbildes zu den schwer zu diagnostizierenden Erkrankungen und gelten als unterdiagnostiziert (Giudice & Kao 2004). Bis zur Diagnosestellung der Endometriose vergehen in Deutschland durchschnittlich 10 Jahre (Hudelist et al. 2012). Ursächlich hierfür ist zum einen die bereits erwähnte Vielfalt an unspezifischen Symptomen, zum anderen ist die Verzögerung maßgeblich darauf zurückzuführen, dass laut Leitlinie die definitive Diagnose zum aktuellen Zeitpunkt nur durch ein invasives Verfahren gestellt werden kann.

1.1 Epidemiologie der Endometriose und der Adenomyose

Laut Giudice & Kao (2014) liegt die Prävalenz der Endometriose in der weiblichen Bevölkerung bei 10%. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Harder et al. (2023), die in ihrem Review von 36 klinischen Studien zwischen den Jahren 2000-2023 berichten und eine Prävalenz von 6,8% angeben. In der Gruppe der symptomatischen Frauen liegt die Prävalenz der Endometriose deutlich höher. Bei Frauen mit chronischen Unterleibschmerzen beträgt sie 15,4-71,4% und bei den untersuchten Frauen mit Infertilität bis zu 68% (Ghiasi et al. 2020).

Die Prävalenzangaben der Adenomyose sind in verschiedenen Studien ebenfalls sehr unterschiedlich beschrieben und reichen von 2% in der Normalbevölkerung (Morassuto et al. 2016) bis zu 24,4% in der Gruppe von Frauen im reproduktionsfähigen Alter (Puente et al. 2016). Die erhebliche Diskrepanz der Prävalenzangaben beruht unter anderem auf der breiten Heterogenität der Studien bezüglich den Studienpopulationen, Einschluss- und Diagnosekriterien und dem Studiendesign (Vigano et al. 2004, Ghiasi et al. 2020, Harder et al. 2023). Harder et al. (2023) argumentieren, dass die tatsächliche Prävalenz insbesondere aufgrund der schweren Diagnosestellung höher ist als aktuell angenommen, was zu unzureichender finanzieller Unterstützung in der Forschung und der Diagnostik führt.

Die Symptome der Endometriose und der Adenomyose setzen meist mit Beginn der Pubertät ein und enden bei der überwiegenden Zahl der Patientinnen mit dem Eintritt in die Menopause (Suvitie et al. 2016). Diese Tatsachen sind laut Bulun (2009) unter anderem der Östrogenabhängigkeit der Erkrankungen geschuldet. So lassen sich bei postmenopausalen Patientinnen atrophe Endometrioseherde beobachten, die durch kleine, mit Zysten versehenen Drüsen charakterisiert sind (Clement 2007). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung beträgt 30-35 Jahre (Ballard et al. 2008, Haas et al. 2012). In einer Übersichtsarbeit fassen Parazzini et al. (2017) Faktoren zusammen, die mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung einer Endometriose assoziiert sind. Als Risikofaktoren wurden unter anderem ein junges Alter während der Menarche, lange Periodenblutungsdauer und Nulliparität genannt. Außerdem zeigen verschiedene Studien eine Assoziation von Endometriose und gastrointestinalen und autoimmunen Krankheiten (Nielsen et al. 2011, Bungum et al. 2014, Parazzini et al. 2017).

1.2 Lokalisation und Klassifikationssysteme

Die vielfältigen Symptome der Endometriose sind unter anderem durch die multiplen Manifestationsorte zu erklären. In einer großen prospektiven Beobachtungsstudie von Audebert et al. (2018) wurde die anatomische Verteilung der Endometrioseläsionen von 1101 Patientinnen mit laparoskopisch diagnostizierter Endometriose analysiert. Mit 66,9% erweisen sich die Ovarien als häufigster Manifestationsort, gefolgt von den uterosakralen Ligamenten mit 45,51%, der Fossa ovarica mit 32,15% und dem Douglasraum mit 29,25%. Eine tief infiltrierende Endometriose zeigt sich in 14,4% der

untersuchten Fälle. Die Harnblase und das Rektum sind die häufigsten Lokalisationen der tief infiltrierenden Endometriose (Schindler 2007). Koninckx & Martin (1992) definieren diese Entität anhand einer Infiltrationstiefe von mindestens 5 mm. Diese Schwelle wurde festgelegt, da ab dieser Tiefe die stärkste Schmerzkorrelation festgestellt wurde. Extrapelvine Manifestationen sind in der Literatur nur vereinzelt beschrieben, können jedoch sehr vielfältig sein. Neben dem Zwerchfell (Redwine 2002) und Operationsnarben können die Leber, die Niere, das Pankreas, die Knochen und das Gehirn betroffen sein (Bourgioti et al. 2017).

Die meist verbreitete Klassifikation der Endometriose ist der Score der *American Society of Reproductive Medicine*, der *rASRM* Score. Die erste Version dieser Klassifikation wurde 1979 von der damals noch anders benannten *American Fertility Society* veröffentlicht (The American Fertility Society 1979). Es folgte eine Überarbeitung im Jahre 1985 (Revised American Fertility Society classification of endometriosis 1985) und eine Umbenennung im Jahre 1996 (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis 1997). Dieses Punktesystem basiert auf der Beurteilung der makroskopischen Ausdehnung, des Befallsmusters und der daraus resultierenden Zuordnung zu einem von vier Ausprägungsstadien (Haas et al. 2013). Das Ergebnis des *rASRM* Scores korreliert nur schwach mit der Ausprägung der Schmerzen und der Sterilität der Patientinnen, was ein Nachteil dieser Klassifikation ist (Vercellini et al. 1996). Die *rASRM* Klassifikation ist zudem nur für ovarielle und peritoneale Endometrioseläsionen, sowieso Adäsionen an Ovarien und Tuben anwendbar, nicht jedoch für die tief infiltrierende Endometriose und die Adenomyose.

Deshalb wurde 2005 die *ENZIAN* Klassifikation eingeführt (Tuttlies et al. 2005). Die *ENZIAN* Klassifikation beschrieb zuerst nur die Morphologie der tief infiltrierenden Endometriose, bis 2021 eine Erweiterung stattfand und der *#ENZIAN* Score seitdem für ein umfassendes Klassifikationssystem mit Erfassung aller Entitäten der Endometriose steht. Der Score ermöglicht eine strukturierte, einheitliche und exakte Beschreibung der Morphologie der Läsionen, analog zur *TNM* Klassifikation von malignen Tumoren (Haas et al. 2013). Wie bereits zu den Anfängen der *ENZIAN* Klassifikation werden die Läsionen der tief infiltrierenden Endometriose drei Kompartimenten zugeteilt (*A*: Septum rectovaginale, Vagina, *B*: Ligamentum sacrouterinum, Beckenwand, *C*: Rektum, Sigmoid) und der Ausdehnungsgrad anhand der Größe und der Infiltrationstiefe bestimmt. Zusätzlich werden mögliche Herde am Peritoneum (*P*), Zysten am Ovar (*O*) oder Adhäsionen und Verwachsungen an den Tuben (*T*) beurteilt. Andere Lokalisationen

werden mit einem *F* betitelt, zum Beispiel *FA* steht für die Adenomyose oder mit *FU* wird die Infiltration des Ureters beschrieben. Eine weitere wichtige Ergänzung des #ENZIAN Scores ist die Methode zur Erhebung. Die Klassifikation kann sowohl intraoperativ (*s*=surgical) als auch präoperativ mittels Ultraschall (*u*) oder Magnetresonanztomographie (*m*) angewandt werden.

Eine weitere aber eher veraltete Klassifikation der Endometriose ist die Einteilung der makroskopisch erhobenen intraoperativen Befunde in rote, weiße und schwarze Läsionen (Revised American Fertility Society classification of endometriosis 1985). Die immunhistochemische Untersuchung der roten Läsionen ergab eine starke Vaskularisierung und eine hohe mitotische Aktivität. Somit sind rote Läsionen Zeichen für eine hohe Krankheitsaktivität und weisen auf ein frühes Stadium nach Implantation der Endometriose in extrauterinem Gewebe hin (Nisolle et al. 1993). Die weißen Läsionen zeichnen sich durch wenig Vaskularisierung und eine niedrige mitotische Aktivität aus, weshalb dieser Befund eher für eine inaktive Endometriose spricht (Nisolle et al. 1993).

2010 stellten Adamson & Pasta den Endometriosis Fertility Index (*EFI*) als klinisches Tool zur Vorhersage einer Schwangerschaft nach intraoperativ bestätigter Endometriose vor. Dieser Score beruht auf den makroskopisch zu beobachtenden endometriotischen Veränderungen der Adnexe und den anamnestischen Informationen bezüglich der Dauer der Sterilität und vorangegangenen Schwangerschaften (Adamson & Pasta 2010).

1.3 Symptome und leitliniengerechte Diagnostik der Endometriose und Adenomyose
In einer großen retrospektiven Studie erfragte Sinaii et al. (2008) die Symptome von 940 Patientinnen mit histologisch bestätigter Endometriose. Mit 79% ist die Dysmenorrhoe das am häufigsten genannte Symptom, gefolgt von chronischen Unterleibsschmerzen mit 69%. In der klinischen Studie von Konrad et al. (2023) berichten sogar 97% der Patientinnen mit Endometriose über Dysmenorrhoe. In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass die Schmerzintensität im Vergleich zu gesunden Frauen höher und die Schmerzdauer um die Phase der Menstruation länger ist. Es wurde bestätigt, dass eine signifikant höhere Zahl an Frauen mit Endometriose an chronischen Unterleibsschmerzen leidet im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (46% vs. 21%). Je nach Lokalisation der Endometrioseherde können auch weitere, oft zyklusabhängige Schmerzmodalitäten, wie Dysurie, Dyspareunie und Dyschezie auftreten (Sinaii et al. 2008). Ein sehr

belastendes Symptom ist die oft mit der Endometriose oder Adenomyose einhergehende Infertilität. Laut der oben zitierten Studie von Sinaii et al. (2008) leiden 26% der Frauen mit Endometriose daran.

Die Symptome der Adenomyose ähneln denen der Endometriose. Die Adenomyose ist als eine der häufigsten Ursachen für die Hypermenorrhoe und die Menorrhagie bekannt (Gordts et al. 2018). In einem Drittel der Fälle ist die Adenomyose asymptomatisch (Graziano et al. 2015).

Wie beschrieben, ist das Erscheinungsbild der Endometriose und der Adenomyose als sehr heterogen zu bezeichnen. Deshalb vergeht bei dem Großteil der betroffenen Frauen eine sehr lange Zeit bis die Diagnose gestellt und eine entsprechende Therapie eingeleitet wird. Darüber hinaus berichten Ballard et al. (2006) über die unzureichenden Kenntnisse und das mangelnde Bewusstsein von Hausärzten über das Krankheitsbild der Endometriose, was späte Überweisungen an spezialisierte Fachärzte zur Folge hat. Hadfield et al. befragten 1996 betroffene Frauen in Selbsthilfegruppen in den USA und im Vereinigten Königreich über den Zeitraum zwischen dem Auftreten ihrer Symptome und der Diagnosestellung. Das Ergebnis der Befragung ergab eine Zeitspanne von 7,9 bis 11,9 Jahren. In Deutschland und Österreich beträgt dieses Intervall im Durchschnitt 10,4 Jahre (Hudelist et al. 2012). Diese Aspekte führen zu langen Schmerzperioden, herabgesetzter Lebensqualität und starker psychischer Belastung (Nnoaham et al. 2011, Bourdel et al. 2019). So leiden die Patientinnen nicht nur unter den oben beschriebenen somatischen Beschwerden, sondern haben auch ein erhöhtes Risiko psychische Symptome zu entwickeln. In einer Follow-up Studie von Chen et al. (2016) wurde gezeigt, dass Patientinnen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Depressionen (Hazard Ratio 1,56) und Angststörungen (Hazard Ratio 1,44) besitzen. Um die Leidenszeit der Patientinnen bis zur Diagnosestellung zu verkürzen, entwickelte Konrad et al. (2023) einen klinischen Fragebogen zur Erfassung typischer Schmerzmuster. Mit einer Sensitivität von 90,4% und einer Spezifität von 75% kann hierdurch eine Endometriose präoperativ korrekt diagnostiziert werden. Es konnte herausgearbeitet werden, dass nicht ein einzelnes Symptom, sondern vielmehr spezifische Schmerzmuster für die nicht-invasive Diagnosestellung entscheidend sind. Speziell die Kombination aus Dysurie und Schmerzausstrahlung in die Oberschenkel besitzt einen hohen prädiktiven Aussagewert (Konrad et al. 2023). Zum aktuellen Zeitpunkt ist im klinischen Alltag die Laparoskopie noch Goldstandard in der Diagnostik und der Therapie der Endometriose (AWMF Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose

2020). Durch die Visualisierung der Läsionen können diese im Bezug zu ihren Nachbarstrukturen beurteilt, die Läsionen operativ entfernt und histologisch spezifiziert werden. Die Invasivität dieser Methode und die damit verbundenen Operationsrisiken führen jedoch häufig zu einer weiteren Verzögerung der Diagnosestellung. Deshalb wurde im Mai 2024 von der internationalen Gesellschaft für Ultraschall in der Frauenheilkunde und Geburtshilfe ein Consensus Statement veröffentlicht, dass die Wichtigkeit und Dringlichkeit einer non-invasiven Diagnosestellung und Klassifikation mittels ausführlicher Anamnese, körperlicher Untersuchung und nicht-invasiver Bildgebung betont (Condous et al. 2024). Bezüglich der Anamnese wurde in der hiesigen Arbeit bereits der vielversprechende Fragebogen von Konrad et al. (2023) angesprochen. In der körperlichen Untersuchung können Auffälligkeiten bei der SpekulumEinstellung und der bimanuellen Palpation erste Hinweise auf eine Endometriose geben. Bei der Bildgebung wird der transvaginale Ultraschall aufgrund der ubiquitären Verfügbarkeit, der Kosteneffizienz und der fehlenden Invasivität als erste Methode empfohlen (Condous et al. 2024). Insbesondere die tief infiltrierende Endometriose am Rektum, im rektovaginalen Septum und in der Blase lässt sich mittels dieser Methode spezifisch untersuchen. So berichten Hudelist et al. (2011) von einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 98% für die Erkennung einer Endometriose am Rektum mittels Sonographie. Im Bereich des Parametriums und der uterosakralen Ligamente hingegen, wird die Magnetresonanztomographie als ergänzende Bildgebung empfohlen (Condous et al. 2024). Diese Empfehlung basiert auf der Cochrane Analyse von Nisenblatt et al. (2016), welche eine signifikant höhere Sensitivität (86%) und Spezifität (84%) der MRT im Vergleich zum transvaginalen Ultraschall (Sensitivität 64%) zur Detektion der tief infiltrierenden Endometriose im Bereich der uterosakralen Ligamente aufzeigt. Ergänzend empfiehlt die AWMF Leitlinie (2020) bei Verdacht auf eine tief infiltrierende oder ovarielle Endometriose eine beidseitige Nierenultraschall zur Abklärung eines möglichen Harnstaus. Außerdem sollte gegebenenfalls eine weiterführende symptomorientierte Diagnostik angeschlossen werden (AWMF Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose 2020). So sollten beispielweise Patientinnen mit einer Dysurie und chronischer Mikrohämaturie eine Zystoskopie und Patientinnen mit einer Dyschezie eine Kolo-/Rektoskopie zur differenzialdiagnostischen Abklärung erhalten. In der Diagnostik der Adenomyose war lange Zeit die histologische Untersuchung des Uterusgewebes nach Hysterektomie die einzige definitive Diagnosestellung. Mit Verbesserung der Bildgebung, sowohl aus technischer als auch aus Anwendersicht

gewinnen die transvaginale Sonographie und die Magnetresonanztomographie an Bedeutung (Selntigia et al. 2024). So erarbeitete 2021 die *Morphological Uterus Sonographic Assesment* Gruppe eine Auflistung typischer sonographischer Zeichen (Harmsen et al. 2022). Unter anderem sind ein diffus vergrößerter Uterus, ein heterogenes Myometrium und eine verbreiterte Junktionalzone genannt. Durch mehrere Studien, die die Sensitivität und die Spezifität des transvaginalen Ultraschalls und die Magnetresonanztomographie untersuchten, zeigte sich, dass beide Methoden in der Diagnostik der Adenomyose sehr spezifisch und zielführend sind (Selntigia et al. 2024). Welche zu bevorzugen ist, hängt laut Selntigia et al. (2024) von verschiedenen Faktoren, unter anderem der Verfügbarkeit, der Erfahrung und den Vorlieben des Untersuchers und möglichen Kontraindikationen des Patienten ab (Selntigia et al. 2024).

1.4 Leitliniengerechte Therapie der Endometriose und Adenomyose

Die Endometriose und die Adenomyose sind komplexe Krankheitsbilder und erfordern einen individuellen und interdisziplinären Therapieansatz. Der folgende Absatz orientiert sich an den Empfehlungen der aktuellen S2-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose (2020). Um eine erfolgreiche Therapie anzustreben, muss neben dem vorrangigen Ziel der Schmerzfreiheit und der Reduktion der funktionellen Beschwerden, auch eine Anpassung an die aktuelle Lebenssituation erfolgen. Die Grundpfeiler der Therapie sind die chirurgische Intervention sowie die medikamentöse Hormontherapie. Laut AWMF Leitlinie (2020) ist die operative Entfernung der Endometrioseläsionen der Goldstandard zur Symptomkontrolle. Aufgrund der möglichen negativen Folgen einer chirurgischen Maßnahme, wie Verwachsungen oder intraoperativen Organverletzungen ist jedoch vor allem bei rezidivierender Endometriose wichtig, dass die Indikation zur Operation auf strengen und restriktiven Kriterien beruht (Burghaus et al. 2019). Die sich weiterentwickelnden nicht-invasiven Diagnosemaßnahmen ermöglichen laut Burghaus et al. (2019) die Auswahl der Patientinnen, die wirklich eine Operation benötigen, zu optimieren. Zur Rezidivprophylaxe nach operativer Endometriosesanierung und als Alternative zur Reduktion der Endometriose assoziierten Schmerzen steht die medikamentöse Hormontherapie zur Verfügung (Grandi et al. 2018). Die hormonelle Therapie basiert auf der Induktion einer therapeutischen Amenorrhoe und der damit einhergehenden Reduktion der Endometriose assoziierten Beschwerden (Grandi et al. 2018). Laut der Leitlinie (2020) und Grandi et al. (2018) gelten der Einsatz von oralen

Gestagenen, zum Beispiel von Dienogest und kombinierten oralen Kontrazeptiva als first line Therapie. Durch die negative Rückkopplung im Rahmen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse kommt es zu niedrigen Östrogenspiegeln und damit zur Reduktion der Läsionsgröße und -aktivität. Grandi et al. (2018) wiesen durch den Einsatz von reinen Gestagenpräparaten und oralen Kontrazeptiva eine signifikante Schmerzreduktion nach. Der Einsatz von Gestagenpräparaten ist im Vergleich zu den GnRH-Analoga mit deutlich weniger unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. In der Leitlinie (2020) wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass aufgrund des Nebenwirkungsspektrums der GnRH Analoga mit klimakterischen Beschwerden und Osteoporose diese Behandlung nur als second line Therapie gilt und in der Regel auf einen Zeitraum von 3-6 Monaten zu beschränken ist. Rund ein Drittel der an Endometriose erkrankten Patientinnen berichtet über Infertilität (Bonavina & Taylor 2022). Aufgrund der Komplexität der Ursachen und der verschiedenen Therapiemöglichkeiten sollte die Behandlung dieser Frauen in Zusammenarbeit mit einem Zentrum für Reproduktionsmedizin erfolgen. Faktoren wie das Patientenalter, die Dauer der Infertilität, die ovarielle Reserve, die Ausprägung der Endometriose-assoziierten Beschwerden und die Läsionsgröße beeinflussen die Therapieentscheidung (AWMF S2k-Leitlinie, Diagnostik und Therapie der Endometriose 2020). Bei Kinderwunsch ist von einer Hormontherapie abzusehen. Es wird empfohlen, durch verschiedene Verfahren der reproduktiven Medizin den Kinderwunsch zu realisieren. Eine Meta-Analyse hat jedoch gezeigt, dass die erfolgreiche Befruchtungsrate durch assistierte Reproduktionstechniken bei Patientinnen mit Endometriose geringer ist als im Vergleich zu gesunden Frauen (Horton et al. 2019). Bei erfolglosen Aussichten wird im weiteren Schritt die operative Therapie empfohlen. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Entfernung peritonealer und tief infiltrierender Endometrioseherde die Schwangerschaftsraten verbessert werden konnten (Bianchi et al. 2009).

In der Therapieplanung der Adenomyose spielen das Alter und der Kinderwunsch eine entscheidende Rolle. Je nach aktueller Lebenssituation der Patientin ist die medikamentöse Hormontherapie auch in der Adenomyose eine Option (AWMF S2k-Leitlinie, Diagnostik und Therapie der Endometriose 2020). Die bereits genannten Substanzklassen unterscheiden sich nicht in ihrer Effektivität (Selntigia et al. 2024). Laut AWMF Leitlinie (2020) ist bei abgeschlossener Familienplanung die Hysterektomie die first line Therapie. Bei Patientinnen mit Kinderwunsch ist die supportive Therapie mit nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) die erste Therapieoption (Selntigia et al. 2024).

Bei fokaler oder zystischer Erscheinungsform der Adenomyose ist gegebenenfalls eine uteruserhaltende isolierte Exzision in Betracht zu ziehen. Interventionelle Behandlungsoptionen, wie die Arterienembolisation oder die Hochfrequenzablation werden zum aktuellen Zeitpunkt nur im Rahmen von Studien eingesetzt, versprechen aber effektive Ergebnisse bezüglich der Schmerzreduktion (Selntigia et al. 2024).

Ein weiterer wichtiger Therapiebaustein beider Erkrankungen, der in der AWMF Leitlinie (2020) behandelt wird, sind die bereits angesprochenen supportiven Maßnahmen. Bezüglich des häufig auftretenden chronischen Schmerzes und der damit einhergehenden Einschränkung der Lebensqualität und der Entwicklung somatischer Schmerzstörungen sollte den Patientinnen neben bedarfsgerechten Analgetika auch eine psychosomatische Betreuung angeboten werden. Ebenso wichtig ist die medizinische und soziale Rehabilitation, die den Frauen einen Austausch mit anderen Betroffenen und die Entwicklung von Krankheitsbewältigungskompetenzen ermöglicht. Die symptomatische Analgetikatherapie der Endometriose und Adenomyose umfasst den Einsatz von nicht-steroidalen Antirheumatika und die bei nicht ausreichender Schmerzkontrolle angewandte Erweiterung nach dem WHO-Schema mittels Opioiden.

1.5 Ätiologie der Endometriose und Adenomyose

Die Entstehungsprozesse der Endometriose sind bis heute nicht vollständig geklärt und unter anderem Thema der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden werden die wichtigsten Konzepte mit ihren Grundaussagen vorgestellt. Die allgemein am meisten anerkannte Entstehungstheorie ist die **Transplantationstheorie nach Sampson** (1927). Diese Theorie besagt, dass im Rahmen einer retrograden Menstruation Teile des abgestoßenen Endometriums durch die Tuben in die Peritonealhöhle gelangen, wo es zur Anheftung und zur Implantation der Zellen kommt und so zur Entstehung von extrauterinen Endometrioseläsionen. Für diese Theorie spricht, dass die Endometriose am häufigsten bei menstruierenden Frauen auftritt (Bulun et al. 2019). Es konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass die im Menstruationsblut vorhandenen Endometriumzellen die Eigenschaft besitzen, sich an extrauterinem Gewebe festzusetzen und Endometrioseläsionen zu entwickeln (D’Hooghe et al. 1995). Halme et al. (1984) beschreiben die retrograde Menstruation als einen sehr häufig vorkommenden und physiologischen Vorgang bei 90% der Frauen mit durchgängigen Tuben. Dennoch entwickelt nur jede zehnte Frau eine Endometriose. Dies zeigt, dass es weitere Faktoren

geben muss, die zur Entwicklung dieser Erkrankung beitragen (Giudice & Kao 2014). Neben der Annahme von komplexen immunologischen und inflammatorischen Reaktionen und Einflüssen durch die peritoneale Umgebung (Young et al. 2013) gibt es zahlreiche weitere Hypothesen, wie die Einwirkung von oxidativem Stress, genetischen und epigenetischen Veränderungen (Koninckx et al. 2019), die versuchen diese Tatsache zu erklären. Die Entstehung von Endometrioseherden außerhalb des Bauchraums erklärt Sampson über den Transport von Endometriumzellen über Venen und Lymphgefäße (Sampson 1927).

Laut der **Metaplasie-Theorie nach Meyer** (1919) entwickeln sich Endometrioseläsionen aus metaplastisch veränderten Zellen des pluripotenten Zölomepithels. Die Metaplasie wird durch unspezifische Stimuli, unter anderem hormoneller, infektiöser oder umgebungsbedingter Art ausgelöst. Für diese Theorie spricht das Auftreten der Endometriose bei Männern, präpubertären Mädchen und bei Patienten mit Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrom (Nisolle & Donnez 1997, Batt & Mitwally 2003, Mok-Lin et al. 2010). Eine kritische Bewertung dieser Literatur zeigte jedoch, dass die Beweise für eine Assoziation von Uterusagenesie und Endometriose nur selten histologischer Art sind, sondern die Aussagen auf MRT-Befunden basieren (Konrad et al. 2019). Somit sind die Evidenz und die Aussagekraft dieser Fallberichte im Hinblick auf Beweise für die Metaplasietheorie als unzureichend zu beurteilen. Eine weitere potentielle Einschränkung dieses Modells besteht in der Vorstellung, dass an verschiedenen Manifestationsorten immer wieder die identisch aufgebauten endometriotischen Läsionen mit Drüsen- und Stromazellen entstehen. Die seltene Manifestation außerhalb des Bauchraums und die äußerst geringe Inzidenz bei Männern widersprechen ebenfalls der Annahme einer metaplastischen Entstehung. Metaplasien werden häufig im Zusammenhang mit Alterungsprozessen und kumulativen Schädigungen beobachten. Der fehlende Inzidenzanstieg im Alter spricht folglich zusätzlich gegen die Metaplasie-Theorie (Sasson & Taylor 2008).

In Anlehnung an die Implantationstherapie und die Metaplasie-Theorie ergänzten **Koninckx et al. (1999)** die **Endometriotic Disease Theory**, welche den Fokus auf zelluläre Veränderungen legt. Laut den Autoren beschreiben die Implantations- und die Metaplasietheorie lediglich die Entstehung von Endometrioseläsionen, nicht jedoch das Wachstum und die Entwicklung in eine schwerwiegende Erkrankung mit unterschiedlichsten Erscheinungs- und Ausprägungsformen. Die Progression vergleicht er mit der Entstehung eines gutartigen Tumors. Durch epigenetische Veränderungen und

genetische Mutationen entziehen die endometriotischen Zellen den regulierenden Faktoren der Peritonealflüssigkeit und entwickeln dadurch ein erhöhtes Invasivitäts- und Proliferationspotential. Die Art der zellulären Veränderungen und die Zusammensetzung des Microenvironment bestimmen die Morphologie und den Ausprägungsgrad der endometriotischen Läsion. Eine mögliche Ursache für die genetischen und epigenetischen Mutationen ist laut Koninckx et al. (2019) der oxidative Stress, den die Zellen im Uterus während der Menstruation und nach der Verschleppung in die peritoneale Höhle erfahren. Eine weitere Entstehungstheorie ist die **Tissue-Injury-and-Repair-Theorie nach Leyendecker & Wildt et al. (2009)**, ein weiterentwickeltes Konzept der Archimetra-Theorie nach Leyendecker et al. (1998). In dieser Theorie wird der Uterus ebenfalls als Ausgangspunkt der Erkrankung angesehen. Die zentralen Vorgänge der Theorie basieren auf einer lokal erhöhten Östrogenkonzentration im Endometrium. Östrogen führt unter anderem zur Sekretion von Oxytocin und wirkt somit peristaltikfördernd. Durch eine erhöhte Konzentration dieses Hormons kommt es zu einer Hyper- und Dysperistaltik des Uterus, wodurch es zu mechanischem Stress und zu Mikrotraumata der Archimetra, der Einheit aus Endometrium und dem darunterliegendem Stratum subvasculare des Myometriums kommt. An dieser Stelle ist jedoch zu nennen, dass sich das Archimetra-Konzept international nie etabliert hat, unter anderem weil die Hauptannahme, dass nur die Archimetra paramesonephrischen Ursprungs ist, während die äußeren Muskelschichten einen anderen Ursprung haben, schwer zu belegen ist und der gängigen embryologischen Lehrmeinung und vor allem auch der Entstehungstheorie nach Sampson (1927) widerspricht (Habiba et al. 2023). Vergleichbar mit der Transplantationstheorie postuliert das TIAR-Konzept, dass es zu einem retrograden transtubären Transport der durch die Mikrotraumata abgeschilfert Zellen kommt und dies als primärer Mechanismus für die Implantation endometrialen Gewebes in der Bauchhöhle fungiert. Durch die Mikrotraumata kommt es zur Aktivierung inflammatorischer Prozesse und Reparaturvorgänge, welche durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumshormonen zu dauerhaft erhöhten Östrogenwerten und damit zu einem Circulus vitosus führen. Durch die inflammatorischen Prozesse ist das infiltrative Potential zur Einnistung in extrauterinen Geweben erhöht. Auch iatrogene Gewebsverletzungen, zum Beispiel im Rahmen einer Ablation können die Dislokation von Endometriumzellen zur Folge haben. Die Infertilität erklären Leyendecker & Wildt et al. (2009) durch den durch die Dysperistaltik bedingten gestörten Spermientransport. Habiba et al. (2023) unterziehen das TIAR-Konzept in ihrer aktuellen Arbeit einer

kritischen Überprüfung. Neben der kritischen Betrachtung der Annahme, dass die Endometriose und die Adenomyose eine gemeinsame Pathogenese teilen und die Endometrioseherde nur aus der Basalis entstehen, ist ein zentraler Kritikpunkt die bisher fehlenden Daten zur epidemiologischen Evidenz. Die Autoren hinterfragen insbesondere die Rolle der Hyper- und Dysperistaltik in der Pathogenese der Endometriose. Sie argumentieren, dass das allgegenwärtige Phänomen der Uterusperistaltik die Relevanz dieser Faktoren bezüglich der Kausalität in Frage stellt (Habiba et al. 2023).

Die **Stamm- und Progenitorzelltheorie** basiert auf der Identifizierung von jenen Zellen im physiologischen Endometrium und im Menstruationsblut (Sasson & Taylor 2008). Die Stammzelltheorie nimmt Bezug auf die Implantationstheorie nach Sampson und geht ebenfalls von einer retrograden Menstruation und einer transtubaren Zellverschleppung von uterinen Zellen aus. Durch die Analyse von Markerproteinen konnten in diesem Zellgemisch Zellen mit Stammzellcharakter und Differenzierungspotential identifiziert werden. Laut den Befürwortern dieser Theorie kommt es im Rahmen der Thelarche und dem damit einhergehendem Anstieg des Östrogenspiegels zur Differenzierung der Stammzellen in epitheliale und stromale Zellen und damit zur Bildung von Endometrioseläsionen (Gargett et al. 2014, Maruyama 2022).

Bezüglich der Entwicklung der Adenomyose gibt es aktuell im Wesentlichen zwei vorherrschende Theorien, die in weiten Teilen den Entstehungstheorien der Endometriose ähneln. Die wahrscheinlichste Theorie ist die **Invaginationstheorie**, bei der es zur Expansion des basalen Endometriums in Richtung Myometrium kommt. Die exakten Mechanismen, die diesen Prozess auslösen, sind nicht vollständig geklärt. Das bereits angesprochene TIAR-Konzept bietet durch dysregulierte Gewebeheilung einen möglichen Erklärungsansatz. Allerdings unterstreichen Habiba et al. (2023), dass dieses Konzept weiterer empirischer Überprüfung bedarf.

Die **Metaplasietheorie** besagt, dass sich adenomyotische Läsionen de novo aus embryonalen pluripotenten Überresten der Müllerschen Gänge entwickeln (García-Solares et al. 2018). Alternativ entwickeln sich die Läsionen aus endometrialen Stammzellen, die in Richtung des Myometriums auswandern (Guo 2020). Diese beiden Konzepte sind jedoch kritisch zu hinterfragen aufgrund der nur schwer vorstellbaren Annahme, dass sich aus den genannten pluripotenten Zellen an diversen Lokalisationen morphologisch identische Läsionen, bestehend aus stromalen und epithelialen Zellen ausbilden.

2 Zielsetzung und Auswahl der Antikörper

Obwohl die Endometriose und die Adenomyose zu den häufigsten gynäkologischen Krankheitsbildern zählen und weitreichende Auswirkungen auf die Lebensqualität betroffener Frauen haben, sind die Ätiologie und Pathophysiologie dieser Krankheiten noch nicht vollständig erforscht. Durch das Verstehen der pathophysiologischen Abläufe kann die Diagnosestellung der Endometriose sowie der Adenomyose beschleunigt und standardisiert werden, sodass den betroffenen Frauen ein langer Leidensweg erspart bleibt.

Um die zentralen pathophysiologischen Mechanismen des Ablösens und der Abwanderung aus dem endometrialen Zellverband besser zu verstehen, wurden in der folgenden Arbeit die Expressionsmuster von Proteinen analysiert, die bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielen. Die Ausstattung an Zell-Zell-Kontakten ist ein wichtiges Charakteristikum jeder Zelle und definiert unter anderem die Rolle im Zellverband. Hierfür wurden drei Proteine ausgewählt, die zu der Familie der Claudine gehören, wichtige Bestandteile der Tight Junctions in verschiedensten Epithelien sind, jedoch im Uterus und vor allem in Bezug auf das Krankheitsbild der Endometriose und der Adenomyose noch nicht ausreichend untersucht wurden: Claudin 1, 5 und 10. Neben einer ausgiebigen Literaturrecherche war eine möglichst spezifische immunhistologische Färbung Grundlage für die Auswahl der einzelnen Biomarker. Die drei oben genannten Claudine zeigten in Vorexperimenten eine hohe Anzahl an gefärbten Epithelzellen und wenige unspezifische Anfärbungen von Stroma, Muskulatur und Blutgefäßen.

2.1 Familie der Claudine

Die Familie der Claudine umfasst 27 Mitglieder, die ähnlich aufgebaut sind und von denen 26 auch im Menschen nachgewiesen wurden (Grund & Grümmer 2018). Claudine sind die Bausteine der Tight Junctions. Diese Strukturen sind am oberen Teil der lateralen Zellmembran lokalisiert und sind wie ein Gürtel um die Epithelzelle angeordnet. Indem sie ein reißverschlussartiges Proteinnetzwerk bilden, regulieren sie neben dem intrazellulären Transport unter anderem auch den parazellulären Fluss von Ionen, Wasser und anderen Molekülen (Grund & Grümmer 2018). Die meisten Claudine, unter anderem Claudin 1, 3, 5, 11, 14 und 19 übernehmen hierbei eine Barriere-bildende Funktion,

wohingegen andere Claudine an der Bildung von Poren beteiligt sind. Hier sind die Claudine 2, 10, 15 und 17 zu nennen (Krug et al. 2012).

Die Anordnung der Tight Junctions führt dazu, dass zwei funktionelle Bereiche der Epithelzellen geschaffen werden: der apikale und der basale Pol. Diese Zellpolarität ist essentiell für die Integrität eines Zellverbandes (Lüllmann-Rauch 2009). Ein abnormes Expressions- und Lokalisationsmuster von Claudinen wurde bereits bei vielen pathophysiologischen Prozessen beobachtet, unter anderem auch bei neoplastischen Vorgängen. Hierbei gibt es über die Auswirkungen der veränderten Claudin-Expression jedoch kontroverse Beobachtungen. Es gibt einige Studien, die zeigen, dass der Verlust der Zelladhäsionen ein zentraler Bestandteil der malignen Transformation ist. So konnte beispielsweise eine reduzierte Expression von Claudin 1 in Mamma- (Krämer et al. 2000) und Kolonkarzinomen aufgezeigt werden (Resnick et al. 2005). Eine verringerte Proteinexpression von Claudin 7 im Endometriumkarzinom wurde mit einer erhöhten Proliferation und Metastasierung assoziiert (Li et al. 2013). Andere Studien beschreiben jedoch eine Korrelation der Hochregulation von Claudinen mit einer erhöhten Invasionsbereitschaft und einem erhöhten Potential zur Metastasierung von Krebszellen. In differenzierten Schilddrüsentumoren konnte eine erhöhte Expression von Claudin 10 beobachtet werden (Aldred et al. 2004), in invasiven Mammakarzinomen (Kominsky et al. 2003) und Kopf-/Halstumoren (Al Moustafa et al. 2002) eine erhöhte Expression von Claudin 7. Unabhängig von den Auswirkungen einer abnormen Expression der Claudine in Tumorzellen haben sie eine klinische Relevanz in der Onkologie, denn man schreibt einigen Claudinen die Funktion als Prognosemarker zu. So ist Claudin 10 ein Prognosemarker für hepatozelluläre Karzinome (Cheung et al. 2005), Claudin 18 für Magenkarzinome (Sanada et al. 2006) und Claudin 1 für cholangiozelluläre Karzinome (Resnick et al. 2005).

2.2 Claudin 10

Im menschlichen Genom ist Claudin 10 von 6 Exons kodiert und man unterscheidet die zwei Hauptisoformen Claudin 10 a und b (Krug et al. 2012). Diese zwei Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich in ihrem ersten Exon, was zu Abweichungen im ersten transmembranen und ersten extrazellulären Segment führt (Krug et al. 2012). So ist Claudin 10a an der Bildung und Regulation von Anionen-selektiven und Claudin 10b an Kationen-selektiven Kanälen beteiligt (Krug et al. 2012).

Die Expression von Claudin 10a ist auf die Niere und den Uterus beschränkt (Krug et al. 2012). Im Gegensatz dazu wird Claudin 10b in vielen Geweben exprimiert, unter anderem in Lunge, Gehirn und Niere (Krug et al. 2012). Claudin 10a erhöht als Anionen-selektives Kanal-formendes Protein die Permeabilität für Cl^- und NO_3^- (Krug et al. 2012). Die von Claudin 10b gebildeten Kanäle zeigen eine starke Präferenz für monovalente Kationen, wie Natrium, Lithium und Kalium und in der Komplexbildung mit anderen Claudinen eine geringere Permeabilität für divalente Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} (Milatz 2019). Für Moleküle größer als 4 kDa sowie für Wasser besitzen die durch Claudin 10b gebildeten Kanäle eine Impermeabilität (Krug et al. 2012). Die funktionelle Rolle von Claudin 10 wird beispielsweise von Breiderhoff et al. (2012) durch ein Claudin 10 Knockout Maus Model verdeutlicht. Zu beobachten waren eine parazellulär reduzierte Natrium-Permeabilität und eine erhöhte Magnesium- und Calcium-Permeabilität im dünnen aufsteigenden Teil der Henlesche Schleife. Dies führte zu einem Defekt bei der Harnkonzentration, begleitet von einer Polyurie, Hypokalzurie, Hypermagnesiämie und Nephrokalzinose (Breiderhoff et al. 2012).

2.3 Claudin 1

Claudin 1 ist vermutlich das prominenteste und älteste Mitglied der Claudin Familie und wurde 1998 von Furuse erstmalig beschrieben (Furuse et al. 1998). Das Protein ist aus 211 Aminosäuren aufgebaut und 22 kDa schwer (Reinhold & Rittner 2017). Es bindet über die PDZ-Domäne (PSD95/SAP90, Discs large, Zonula occludens-1), einem zentralen Gerüstprotein, an ZO-1 (Zonula occludens-1) und damit an das Aktinskelett der Zelle (Reinhold & Rittner 2017). Claudin 1 wird in den verschiedensten Geweben exprimiert, unter anderem in der Leber und dem Intestinaltrakt (Reinhold & Rittner 2017). Auch in der Haut spielt Claudin 1 eine große Rolle, was an Claudin 1-Knockout Mäusen deutlich wird, die an einer Dehydratation aufgrund des Wasserverlustes über die Epidermis sterben (Furuse et al. 2002). Außerdem kommt Claudin 1 eine besondere Bedeutung im zentralen und peripheren Nervensystem zu, wo es an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Nerven-Schranke beteiligt ist (Reinhold & Rittner 2017). Die Herunterregulation von Claudin 1 geht mit einem Barriereverlust einher und ist mit einigen neurologischen Erkrankungen assoziiert, zum Beispiel der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (Kanda et al. 2004). In den peripheren Nerven findet sich Claudin 1 vor allem im Perineurium (Reinhold & Rittner

2017). Das Perineurium ist die periphere Fortsetzung der Arachnoidea und umschließt einen Faszikel, ein Bündel aus mehreren Axonen. Es bildet zusammen mit den endoneurinalen Blutgefäßen die Blut-Nerven-Schranke und reguliert das infrafaszikuläre Milieu (Piña-Oviedo & Ortiz-Hidalgo 2008).

2.4 Claudin 5

Claudin 5 ist ein 31,6 kDa schweres Protein und wurde 1999 erstmals von Morita et al. (1999) näher beschrieben. Im Endothel wird die parazelluläre Barriere und Permeabilität vorrangig von VE-Cadherin und Claudin 5 reguliert (Hata et al. 2014). VE-Cadherin ist ein wichtiger Baustein der Adhärenskontakte, während Claudin 5 am Aufbau der Tight Junctions beteiligt ist. Eine verringerte Expression von Claudin 5 und VE-Cadherin ist mit einer erhöhten parazellulären Permeabilität von Endothelzellen assoziiert (Hata et al. 2014). Aufgrund dieser Barrierefunktion spielt Claudin 5 unter anderem bei der Erhaltung der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle und sichert hierbei die Impermeabilität gegenüber Makromolekülen (Morita et al. 1999). Claudin 5 wird häufig als endotheliales Claudin charakterisiert, es ist aber auch in den Epithelien verschiedenster Organgewebe zu finden, unter anderem während der Entwicklung des Pigmentepithels der Retina (Kojima et al. 2002), im Epithel der Luftwege (Coyne et al. 2003), im intestinalen Epithel (Amasheh et al. 2005) und in uterinen Drüsenepithelzellen der Ratte (Mendoza-Rodríguez et al. 2005).

2.5 Claudine in der Endometriose

Ein biologischer Mechanismus, bei dem es unter anderem zu dem Verlust der angesprochenen Zellintegrität und Zellpolarität durch Veränderung der Zell-Zell Kontakte kommt, ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Sie spielt in zahlreichen physiologischen Vorgängen, unter anderem der Embryoimplantation, der Embryogenese und der Wundheilung eine zentrale Rolle. Jedoch wird sie häufig auch in pathologischen Prozessen, wie Entzündung, Fibrose und Metastasierung von Neoplasien beobachtet (Kalluri & Weinberg 2009). Die EMT ist ein komplexer, mehrstufiger Vorgang, bei dem es zum Verlust der epithelialen Zellstruktur kommt und dem Zugewinn mesenchymaler Zellmarkern und damit auch zur Fähigkeit zum Abwandern aus dem physiologischen Epithelverband (Kalluri & Weinberg 2009, Konrad et al. 2020). Es wurden bereits einige Studien publiziert, die eine EMT als zentralen Mechanismus in der

Entstehung der Endometriose vermuten (Matsuzaki & Darcha 2012, Bartley et al. 2013, Young et al. 2013, Furuya et al. 2017, Owusu-Akyaw et al. 2018). Diese Hypothese beruht auf dem Verlust von epithelialen Markern, wie E-Cadherin und Beta-Catenin und einem Zugewinn an N-Cadherin, Snail, Slug und Vimentin (Konrad et al. 2020). Dieser Cadherin-Switch konnte auch in der Adenomyose beobachtet werden (Chen et al. 2010, Qi et al. 2015). Claudine sind wie angesprochen wichtige Bausteine der Tight Junctions und damit unerlässlich für die Integrität eines Zellverbandes. Laut De Wever et al. (2008) ist der Verlust dieser Zell-Zell-Adhäsion ein zentrales Zeichen für das Vorliegen einer EMT. Folglich ist die Claudinforschung wichtig zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der EMT in der Pathogenese der Endometriose. Für die Claudine 2,3,7 und 11 konnten in den bisher durchgeführten Studien keine signifikanten Unterschiede des eutopen Endometriums von gesunden und an Endometriose erkrankten Frauen dargestellt werden (Horné et al. 2019, Hoerscher et al. 2020). Wohingegen Gaetje et al. (2008) und Pan et al. (2009) von einer Herunterregulation von Claudin 3 in endometriotischen Läsionen berichten, weisen Hoerscher et al. (2020) keine Unterschiede von Claudin 3 und 2 in den endometriotischen Läsionen verglichen zum Endometrium nach. In den Experimenten von Gaetje et al. (2008) zeigt sich Claudin 7 in der Endometriose ebenfalls herabreguliert, was von Horné et al. (2019) jedoch durch serologische und immunhistologische Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte. Unter anderem vergleicht Gaetje et al. (2008) die Proteinexpression von Claudin 1 in eutopen Endometrien mit der Expression in peritonealen Endometrioseläsionen mittels verschiedener Methoden. In der Microarray-Analyse zeigt sich eine erhöhte Expression von Claudin 1 in peritonealen Läsionen im Vergleich zum eutopen Endometrium. Diese Erhöhung konnte aber in der PCR Untersuchung und in der Immunhistochemie nicht bestätigt werden und wurde auf die starke Expression von Claudin 1 in den Mesothelzellen im Peritoneum zurückgeführt. Die in dieser Arbeit durchgeführten ausführliche Literaturrecherche zeigte, dass es bisher zu keiner vollumfänglichen vergleichenden Analyse der Claudin 1 Expression in uterinen und extrauterinen Entitäten kam, weshalb dies Bestandteil der vorliegenden Forschungsarbeit sein wird.

Da Claudin 10 als etablierter Marker für Zell-Zell-Adhäsion gilt und seine Expression in Endometriumzellen bereits beschrieben wurde (Krug et al., 2012), jedoch bisherige Studien die Expression in Endometriose- und Adenomyosegewebe vernachlässigt haben, entschieden wir uns für eine zusätzliche Analyse dieses Proteins.

Im Rahmen der Claudinforschung wurde die Proteinexpression von Claudin 5 ebenfalls bereits in endometrialen Epithelzellen des Menschen und der Ratte untersucht (Mendoza-Rodriguez 2005, Gaetje et al. 2008). Gleichzeitig wird Claudin 5 jedoch auch in Endothelzellen exprimiert. Eine Untersuchung des Endometriums und der Endometriose in Hinblick auf die Expression von Claudin 5 in den Endothelzellen wurde nach aktuellem Wissensstand bisher nicht durchgeführt und ist deshalb ebenfalls Thema der vorliegenden Forschungsarbeit.

2.6 Fragestellung

Durch die vergleichende Analyse der Expressionsmuster von Claudin 1, 5 und 10 erfolgt eine phänotypische Charakterisierung des endometrialen Gewebes sowie der pathologischen Läsionen. Hierdurch können Fragen bezüglich Veränderungen der Zellausstattung und des Zellverbands vor und nach der Implantation und folglich über mögliche Ursachen und Folgen des Ablösens beantwortet werden. Bei der Analyse dieser möglichen Veränderungen soll der Fokus auf der Untersuchung eines möglichen Verlusts des epithelialen Phänotyps im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transition liegen. Die EMT ist unter anderem ein zentraler pathophysiologischer Vorgang in vielen malignen Erkrankungen mit hohem Invasions- und Metastasierungspotential. Aufgrund des ähnlich ablaufenden Ablösens der Endometriumzellen aus ihrem Zellverband im Endometrium wird von einer Vielzahl von Autoren ein Auftreten einer EMT auch im Rahmen der Endometriose und der Adenomyose vermutet. Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Untersuchung von klassischen Tight Junction-Proteinen valide Aussagen über Veränderungen des epithelialen Zelltyps zu treffen und somit die Hypothese einer EMT zu überprüfen. Neben dem weiteren Ziel, Argumente für oder gegen die unterschiedlichen Entstehungstheorien zu finden, erlaubt die Analyse des endothelialen Proteins Claudin 5 vergleichende Aussagen über das Ausmaß der Vaskularisierung in physiologischem und pathologischem Gewebe. Bekannterweise ist für einen aktiven Zellstoffwechsel eine gute Versorgung mit Nährstoffen Voraussetzung. Dies lässt vermuten, dass für die Auswanderung der Endometriumzellen, deren Implantation in ektopes Gewebe und das anschließende Überleben und Wachsen eine Angiogenese notwendig ist. In der Literatur wird häufig eine Angiogenese des ektopen Gewebes postuliert. Diese Hypothese wird in der vorliegenden Arbeit anhand der Expression des endothelialen Proteins Claudin 5 überprüft.

Materialien

2.7 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Für die vorliegende Forschungsarbeit wurde auf die Gewebedatenbank der Frauenklinik des Uniklinikums Gießen zugegriffen. Die Zustimmung für die Arbeit mit diesen Daten wurde von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen am 2. Juli 2009 erteilt und ist unter dem Aktenzeichen 95/09 vermerkt. Der aktualisierte Antrag, speziell für die Analyse der Claudine wurde am 25. Januar 2017 eingereicht und am 7. März 2017 bewilligt. Die Gewebeproben stammen aus operativen gynäkologischen Eingriffen, unter anderem Hysterektomien und Laparoskopien, die im Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt wurden. Die Patientinnen wurden ausführlich über das Forschungsprojekt informiert und willigten durch eine schriftliche Einverständniserklärung der Aufnahme in die Datenbank ein. Für die vorliegende Dissertation wurden neben Uteruspräparaten von Frauen mit Endometriose auch Gewebeproben mit Endometrioseläsionen aus Ovarien, Peritoneen und Organen des kleinen Beckens untersucht. Die vergleichende Kontrollgruppe setzt sich aus endometrialen Proben von Frauen ohne Endometriose zusammen. Die histopathologische Beurteilung der Gewebeproben und die Diagnosestellung der Endometriose erfolgte durch die Pathologen des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen. Die Zuordnung der Präparate zur proliferativen oder sekretorischen Phase beruhte zum einen auf der bereits erwähnten histologischen Befundung der Pathologen und zum anderen auf den Angaben der Patientinnen bezüglich des Zyklustages am Entnahmezeitpunkt.

Die Tabellen 1 bis 6 geben einen Überblick über die Gewebeproben, welche für die Analysen von Claudin 1, 5 und 10 verwendet wurden. Die Anzahl der Proben für die immunhistochemischen Färbungen mit Claudin 5 ist im Vergleich zu den verwendeten Proben für die Experimente mit Claudin 1 und 10 geringer, da für die Auswertung des Expressionsmusters von Claudin 5 eine gut erhaltene Gewebestruktur der Schnitte Voraussetzung war.

Tabelle 1: Uterine Gewebeproben für Claudin 10

	Endometrium ohne EN	Endometrium mit EN	AM- Patienten ohne EN	AM- Patienten mit EN
Alle Proben (n)	23	24	21	17
Alter (MW±SD)	42±8,0	37±7,5	44±4,8	33±6,7
Proliferationsphase (n)	12	9	9	8
Alter (MW±SD)	43±9,6	32±5,5	43±5,47	44±3,9
Sekretionsphase (n)	11	15	12	9
Alter (MW±SD)	41±6,1	39±7,4	43±4,48	39±3,5
Leiomyom (n)	16	9	11	8

Abkürzungen: EN = Endometriose, AM = Adenomyose, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 2: Extrauterine Gewebeproben für Claudin 10

	OMA	SPE	TIE	Vorexperimente
Alle Proben (n)	27(28)*	18	21	4
Alter (MW±SD)	33±6,7	35±4,5	36±6,8	39±0
Blase			3	
Colon			2	
Rektum			9	
Sigma			1	
Spatium			5	
rektovaginale				
Spatium			1	
paraurethrale				
Douglasraum		6		
Ligamentum		9		
sakrouterinum				
Beckenwand		1		
Ligamentum		1		
rotundum				
Fossa ovarica		1		
Blasenperitoneu		1		
m				
Physiologisches				2
Ovar				
Physiologische				2
Tuba uterina				

Abkürzungen: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, *= 28 Proben von 27 Patientinnen (rechtes und linkes Ovar von derselben Patientin), OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, TIE = tief infiltrierende Endometriose

Tabelle 3: Uterine Gewebeproben für Claudin 1

	Endometrien ohne EN	Endometrien mit EN	AM- Patienten ohne EN	AM- Patienten mit EN
Alle Proben (n)	23	25	21	17
Alter (MW±SD)	41±8,3	37±7,4	43±4,8	41±4,4
Proliferationsphase (n)	12	9	9	8
Alter (MW±SD)	43±9,6	32±5,5	43±5,5	44±3,9
Sekretionsphase (n)	11	16	12	9
Alter (MW±SD)	40±6,8	40±7,1	43±4,5	39±3,5
Leiomyom (n)	15	9	11	8

Abkürzungen: EN = Endometriose, AM = Adenomyose, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 4: Extrauterine Gewebeproben für Claudin 1

	Ovarielle	Peritoneale	Tief infiltrierende
	Endometriose	Endometriose	Endometriose
Alle Proben (n)	19	22	23
Alter (MW±SD)	34±7,1	33±5,0	35±6,9
Blase			3
Colon			2
Rektum			10
Sigma			1
Spatium rektovaginale			4
Spatium pararektale			2
Spatium paraurethrale			1
Douglasraum		5	
Ligamentum sakrouterinum		10	
Beckenwand		2	
Ligamentum rotundum		2	
Ligamentum suspensorium ovarii		1	
Fossa ovarica		1	
Blasenperitoneum		1	

Abkürzungen: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 5: Uterine Gewebeproben für Claudin 5

	Endometrien ohne EN	Endometrien mit EN	AM- Patienten ohne EN	AM- Patienten mit EN
Alle Proben (n)	19	19	19	14
Alter (MW±SD)	43±7,2	37±7,1	43±4,5	41±4,7
Proliferationsphase (n)	11	7	9	6
Alter (MW±SD)	44±8,9	33±4,9	43±5,5	44±4,6
Sekretionsphase (n)	8	12	10	8
Alter (MW±SD)	42 ±4,5	39 ±7,4	43±3,8	39±3,6
Leiomyom (n)	14	7	9	7

Abkürzungen: EN = Endometriose, AM = Adenomyose, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 6: Extrauterine Gewebeproben für Claudin 5

	Ovarielle Endometriose	Peritoneale Endometriose	Tief infiltrierende Endometriose
Alle Proben (n)	11	16(17)*	17
Alter (MW±SD)	36±6,9	35±6,2	35±6,8
Blase			4
Vagina			1
Rektum			7
Sigma			1
Spatium rektovaginale			2
Spatium pararektale			2
Douglasraum		2	
Ligamentum sakrouterinum		8	
Beckenwand		3	
Ligamentum rotundum		1	
Ligamentum latum uteri		1	
Blasenperitoneum		2	

Abkürzungen: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, *= 17 Proben von 16 Patientinnen (Lig. sakrouterinum rechts und links derselben Patientin)

2.8 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Der folgenden Tabelle 7 sind die Stammdaten der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper zu entnehmen. Für die Primärantikörper sind neben den herstellenden Firmen, die Klonalität, die Spezies, die entsprechenden Verdünnungen und die Färbezeiten mit der Diaminobenzidin Substratlösung (DAB) aufgelistet.

Tabelle 7: Primär- und Sekundärantikörper

	Hersteller	Klonalität	Verdünnung	Färbezeit	Spezies
Primärantikörper					
Claudin 1	LSBio	Polyklonal	1:100	25 sec	Rabbit
Claudin 5	Invitrogen	Monoklonal	1:100	3 min	Mouse
Claudin 10	LifeTechnologies	Polyklonal	1:100	1 min 25 sec	Rabbit
Sekundärantikörper					
Anti-Rabbit	Dako	IgG	EnVision + System- HRP Labelled		
Anti-Mouse	Dako	IgG	Polymer		

2.9 Chemikalien und Puffer

Im nachfolgenden Abschnitt erfolgt die alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien und Puffern mit der jeweiligen Zusammensetzung und der Herstellerfirma.

- Bouin'sche Lösung der Firma Morphisto
- BSA-Lösung (Blockpuffer): 1g BSA (proteasefreie Albumin Fraktion V der Firma Roth) in 70ml PBS-Puffer mit 21µl Triton-X 100 der Firma Merck
- Citratpuffer: 25ml der Lösung B in 275ml Aqua dest., Einstellung auf einen pH von 6,0 durch Zugabe von Lösung A
 - Lösung A: 0,1Mol Citronensäure (21,01g Citronensäure der Firma Merck in 1000ml Aqua dest)
 - Lösung B: 0,1Mol Natriumcitrat (29,41g Natriumcitrat der Firma Merck in 1000ml Aqua dest)
- DAB: 1 Tropfen Chromogen in 1 ml Substrat Puffer, Firma Dako

- Ethanol der Firma Otto Fischer GmbH und Co.
- Eukitt der Firma Fluka Analytical
- H₂O₂ (30%) der Firma Roth
- 0,3% H₂O₂ (Blockierungslösung): 45ml Methanol -20°C der Firma Roth und 5ml H₂O₂ (30%) der Firma Roth
- Hämatoxylin nach Mayer der Firma Morphisto
- Methanol der Firma Roth
- NeoClear der Firma Merk
- Paraffin der Firma Prolab
- 0,02 M PBS-Puffer (Waschpuffer): 2 PBS-Tabletten der Firma Gibco by Life Technologies in 1000ml Aqua dest.
- Real Antibody Diluent der Firma Dako
- Triton der Firma MERK
- Xylol der Firma Roth

2.10 Geräte, Verbrauchsmaterial und Computerprogramme

In der folgenden Auflistung werden Laborgeräte, Computerprogramme und Verbrauchsmaterialien genannt, welche für die Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden.

- Aqua dest. Anlage Elix 3 der Firma Merck Millipore
- Befundungsmikroskop Dialux 20 der Firma Leica
- Deckgläser in den Größen 22x22 mm, 24x26 mm und 24x36 mm der Firma R. Langenbrinck
- Eiswürfelmaschine Flake Line der Firma Wessamat
- Färbekammern und -gestelle der Firma Roth
- Fettstift Liquid Blocker der Firma Science Services
- Fotomikroskop Leica DM 2000 LED der Firma Leica Microsystems
- GIMP 2.10.20, Bildbearbeitungssoftware
- Gourmetgarer MultiGourmet plus FS20R der Firma Braun
- GraphPad Prism 6.01, statistisches Analyseprogramm
- Handschuhe Sterling Nitrile Gloves der Firma Kimtech
- Image J 1.53a, Wayne Rasband, National Institutes of Health USA, Bildbearbeitungssoftware

- Inkubator Heratherm compact Microbiological Incubator der Firma Thermo Scientific
- Kimwipes der Firma Kimberly Clark
- Kühlschrank 20°C der Firma Bosch
- Kühlschrank 4°C der Firma VWR International
- Küvetten der Firma Roth
- Labor-pH-Meter CG841 der Firma Schott
- Laborwaage 1219 MP der Firma Sartorius
- Leica Application Suite Version 4.9.0, Leica Microsystems
- Lichtmikroskop Leitz Laborlux S der Firma Leica
- Magnetrührer Variomag der Firma Thermo Scientifics™
- Microsoft Office 2010
- Mini-Zentrifuge der Firma Sprout
- Mund-Nasen-Schutz Procedure Face Mask der Firma ECOMA
- Objektträger SuperFrost Plus der Firma R. Langenbrinck
- Paraffineinbettungsautomat TP1050 der Firma Leica Biosystems
- Pipetboy acu der Firma Integra Biosciences
- Pipetten Research plus und Pippetenspitzen der Firma Eppendorf
- Rotationsmikrotom mit Wasserbad der Firma Leica Biosystems
- Schüttelgerät VRX Vibrax der Firma IKA
- Vortex-Genie 2 der Firma Scientific Industries

3 Methode

3.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine immunologische Methode zum Nachweis spezifischer Proteine mithilfe von Antikörpern. Sie führt nicht nur zur Identifizierung, sondern auch zur visuellen Darstellung von Gewebsantigenen. Das Grundprinzip der Immunhistochemie ähnelt dem bekannten Schlüssel-Schloss-Prinzip: Ein hochaffiner Antikörper ist gegen ein spezifisches Ziel gerichtet und bildet mit diesem zusammen die charakteristische Antikörper-Antigen-Bindung aus. Die zwei wichtigsten Verfahrensarten der Immunhistochemie sind die direkte und indirekte Methode. Die direkte Methode beschreibt den Vorgang, bei dem der Antikörper, der an ein spezifisches Antigen bindet, direkt mit einer Substanz konjugiert ist, die im Mikroskop sichtbar ist (z.B. Fluorochrom) oder über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden kann (z.B. durch ein Markerenzym). Die indirekte Methode ist ein mehrstufiger Vorgang bei dem mit zwei Antikörpern gearbeitet wird. Hierbei bindet der spezifische aber unkongjugierte Primärantikörper an das Antigen. In einem weiteren Schritt gibt man einen Sekundärantikörper dazu, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet und diesen und das gebundene Antigen durch ein Markerenzym oder durch ein Fluorochrom sichtbar macht. Ein großer Vorteil dieser indirekten Methode ist, dass ein sehr viel stärkeres Signal und damit eine stärkere Färbung erreicht werden kann, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können. In dieser Arbeit wurde das Nachweissystem EnVision™ System der Firma DAKO verwendet. Dies ist ein System, bei welchem die sekundären Antikörper an Dextranpolymere gekoppelt sind, welche wiederum mit HRP (Horseradish-Peroxidase) besetzt sind. Das Markerenzym HRP reagiert in einem späteren Schritt der Immunhistochemie in einer chromogenen Reaktion mit Diaminobenzidin, führt so zur Braunfärbung und damit zur visuellen Darstellung der Antigene. Für die Anwendung der Immunhistochemie müssen die operativ gewonnenen Proben fixiert und in Paraffin eingebettet werden. Dieser Vorgang und die Arbeitsschritte der Immunhistochemie sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

3.1.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme, noch im Operationssaal, in Falcon-Röhrchen gegeben und mit Bouin'scher Lösung, einer häufig verwendeten Fixierlösung aufgefüllt. Die Fixierzeit betrug 48 Stunden. Während dieser Zeit wurden die Falcon-Röhrchen auf dem Rollmischer geschwenkt, um eine optimale Fixation der Gewebeproben zu erreichen. Die Eindringtiefe der Bouin'schen Lösung ins Gewebe beträgt 1 mm in 2 Stunden. Nach der zweitägigen Fixierung erfolgte die tägliche Spülung mit 70%igem Ethanol an drei darauffolgenden Tagen. Die daraufhin anstehende Paraffinierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Veterinär-Anatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hier wurde das fixierte Gewebe mithilfe eines Paraffineinbettungsautomaten zu Paraffinblöcken verarbeitet. Im ersten Schritt erfolgte die Entwässerung des Gewebes, um es damit zugänglich für das Paraffin zu machen, welches in einem weiteren Schritt zugegeben wurde. Der gesamte Vorgang der Paraffinierung erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

1. Entwässerung: 2 h in Ethanol (80 Vol%) bei RT
 2 h in Ethanol (96 Vol%) bei RT
 3x für je 3 h in Ethanol (100 Vol%) bei RT
2. Klärung: 1 h in Xylol (100 Vol%) bei RT
 2x für je 45 min in Xylol (100 Vol%) bei RT
3. Einbettung: 3x in Paraffin für je 40 min bei 59°C

Abkürzung: RT=Raumtemperatur

Bis zur Weiterverarbeitung der Paraffinblöcke wurden diese bei 4°C gelagert. Der Zugschnitt der Gewebeproben erfolgte mit dem Rotationsmikrotom von Leica, welches die gekühlten Paraffinblöcke in 5 µm dicke Scheiben schneidet. Die Gewebeschnitte wurden von einem Wasserbad (RT) aufgefangen und daraufhin in ein weiteres Wasserbad, dem sogenannten Streckbad, überführt, in dem sich die Proben bei einer Temperatur von 45°C wieder ausdehnten. Die Schnitte wurden im Anschluss auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 47°C getrocknet, um ihnen das restliche Wasser zu entziehen.

3.1.2 Protokoll der Immunhistochemie

Entparaffinierung

Um die Paraffinschnitte für die Immunhistochemie nutzen zu können, mussten diese zunächst mittels NeoClear, einem Xylolersatzstoff, entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 40°C inkubiert und nochmals zwei weitere Male für jeweils 20 Minuten mit NeoClear bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Schnitte nach dem folgenden Protokoll:

1. Zweimalige Inkubation in 100%-igem Ethanol für 5 min
2. Zweimalige Inkubation in 96%-igem Ethanol für 5 min
3. Zweimalige Inkubation in 70%-igem Ethanol für 5 min

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden dann für 5 Minuten in destilliertem Wasser unter Schütteln gewaschen.

Antigendemaskierung

Nach der oben geschilderten Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte anschließend die Antigendemaskierung durch Hitze. Diese ist notwendig, um mögliche Querverbindungen aufzubrechen, die bei dem Prozess der Fixierung und der Einbettung entstehen und um somit die Zugänglichkeit für die Antikörper zu verbessern. Für die Hitzedemaskierung wurden die Schnitte in einem Dampfgerät in einem auf 100°C vorgeheiztem Citratpuffer für 20 Minuten erhitzt. Anschließend kühlten die Gewebeschnitte in der Pufferlösung unter Raumtemperatur für weitere 20 Minuten ab und wurden dreimal für 5 Minuten mit 0,02 M PBS-Puffer unter Schütteln gewaschen.

Blockierung endogener Peroxidasen und unspezifischer Proteinbindungen

Nach der Hitzedemaskierung erfolgte die Peroxidaseblockierung, bei der die Schnitte für 30 Minuten in einem Wasserstoffperoxid- Methanol-Gemisch (45ml Methanol und 5ml 3%-igem H₂O₂) geschüttelt wurden. Anschließend erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen mit 0,02 M PBS-Puffer für jeweils 5 Minuten. Auf diese Weise wird die Reaktion des Chromogens mit endogenen Peroxidasen blockiert und damit unerwünschte Hintergrundfärbungen vermieden. Um weitere unspezifische Proteinbindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurde in dieser Arbeit eine zusätzliche Blockierung mittels BSA (Bovines Serum Albumin) durchgeführt. Dies ist ein Serum, welches nicht mit den nachzuweisenden Antigenen immunisiert wurde, also keine spezifischen

Antikörper gegen das gesuchte Antigen enthält. Das BSA führt zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen und damit zur Vermeidung unspezifischer Anfärbungen. Hierfür wurde 1g BSA in 70 ml 0,02 M PBS-Puffer und 21 µl Triton gelöst und die Schnitte für 20 Minuten in diesem 1,5% BSA Gemisch geschüttelt.

Antikörperbindung

Die überschüssigen Pufferreste wurden vorsichtig vom Objektträger abgeklopft und diese mit Zellstoff rund um das Gewebe vorsichtig trockengewischt. Im Anschluss wurden auf jeden Gewebeschnitt 95 µl der verdünnten primären Antikörperlösung pipettiert (Tab. 7) und über Nacht bei 4°C in einer feuchten dunklen Kammer inkubiert. Zuvor wurde das Gewebe mit einem Fettstift (DAKO-Pen) umkreist, der das Verteilen der Antikörperlösung auf dem gesamten Objektträger verhindert. Der erste Schritt am nächsten Tag umfasste das Abkippen der Primärantikörperlösung auf Zellstoff und das dreimalige Waschen der Schnitte für je 5 Minuten mit 0,02 M PBS-Puffer, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 2-3 Tropfen des sekundären Antikörpers der entsprechenden Spezies auf die Gewebeschnitte pipettiert (Tab. 7) und für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Substratreaktion

Für die anschließende Färbereaktion lies man die Sekundärantikörperlösung auf Zellstoff ablaufen und spülte die Schnitte erneut dreimal für je 5 Minuten mit PBS-Puffer. Es wurden 2-3 Tropfen der DAB-Lösung auf die Schnitte gegeben und unter lichtmikroskopischer Kontrolle für jeden Antikörper die optimale Färbedauer ermittelt (Tab. 7). Bei optimaler Intensität der Braunfärbung erfolgte das Waschen mit Aqua dest. und damit das Stoppen der Substratreaktion. Hierfür wurden die Schnitte drei weitere Male für 5 Minuten in einer Küvette mit Aqua dest. geschüttelt. Die ermittelte Färbezeit wurde im Folgenden bei jeder Färbung exakt eingehalten um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Die anschließende Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun von Mayer für 15 Minuten in der feuchten Kammer. Dieses wurde mit destilliertem Wasser abgespült und unter fließendem Leitungswasser erfolgte für 15 Minuten die Bläuungsreaktion der Gewebeschnitte.

Dehydrierung und Eindeckung der Gewebsschnitte

Im Anschluss daran wurden die Schnitte der aufsteigenden Ethanolreihe unterzogen und damit dehydriert, um sie schließlich Eindecken zu können. Sie wurden hierfür zweimal für 2 Minuten in 70%-igem Ethanol und zweimal für 2 Minuten in 96%-igem Ethanol inkubiert. Dieser Ablauf wurde in 100%-igem Ethanol wiederholt. Hiernach erfolgte die Inkubation der Schnitte in 100%-igem Xylol für 2 Minuten und anschließend nochmals für 5 Minuten. Die dehydrierten Schnitte konnten nun mittels Eukitt und den entsprechenden Deckgläschen eingedeckt werden. Hierfür wurden sie zunächst mit faserfreien Tüchern trockengewischt. Nach der Eindeckung verblieben die Schnitte zur Aushärtung für ca. zwei weitere Stunden unter dem Abzug und wurden dann histologisch beurteilt.

3.2 Auswertung

Für die detaillierte histologische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden diese unter einem Lichtmikroskop in verschiedenen Vergrößerungen betrachtet und ausgewählte repräsentative Bildfelder mit der Olympus FSX 100 Digitalmikroskop-Kamera dokumentiert. Es wurde analysiert, welche Strukturen angefärbt und ob spezielle Färbemuster der einzelnen Antikörper zu erkennen sind. Vor allem die typischen endometrialen Drüsen und das umliegende Stroma wurden detailliert betrachtet und gezielt danach untersucht, welche Anteile der einzelnen Zellen angefärbt sind. Bei den immunhistochemischen Färbungen für Claudin 5 erfolgte zusätzlich die detaillierte Analyse der Endothelanfärbungen. Bei der Auswertung von Claudin 1 lag der Fokus neben der Betrachtung der endometrialen Strukturen auf den nervalen Strukturen.

3.2.1 H-Score

Die Quantifizierung der genannten Beobachtungen erfolgte anhand von zwei Parametern. Zum einen wurde der Prozentsatz an gefärbten Drüsenzellen bestimmt und zum anderen wurde der Histological Score (H-Score) berechnet. Für die Quantifizierung der Proteinexpression mittels H-Score werden, wie von Ornek et al. (2008) beschrieben, vier Intensitätsgrade der Färbungen festgelegt:

0 = keine Färbung

1 = schwache Färbung

2 = moderate Färbung

3 =intensive Färbung

Alle Drüsen und Zysten des Präparats wurden gezählt und jede einzelne hinsichtlich der Intensität beurteilt. Hierdurch lies sich schließlich der H-Score anhand der folgenden Formel errechnen:

$$\text{H-Score} = [1 \times (\% \text{Drüsen}^{\text{schwach}})] + [2 \times (\% \text{Drüsen}^{\text{moderat}})] + [3 \times (\% \text{Drüsen}^{\text{intensiv}})]$$

Die Analyse der Proteinexpression mittels H-Score wurde für die Färbungen mit Claudin 1 und Claudin 10 angewandt.

3.2.2 Lokalisationsscore

Für die Auswertung der Claudin 10 Proben wurde darüber hinaus ein Score zur Quantifizierung der Lokalisation entwickelt, bei dem je nach Lokalisationsmuster Punkte verteilt und diese anschließend verrechnet wurden. Eine apikale, sich als regelrechte herausstellende Lokalisation wurde mit fünf Punkten beurteilt. Je weiter die Lokalisation von dieser regulären apikalen Expression abwich, desto niedriger war der vergebene Punktwert. Die detaillierte Auflistung der Punktevergabe mit beispielhaften Abbildungen erfolgt im Ergebnisteil von Claudin 10. Ein ähnlicher Score wurde bereits von Horné et al. (2019) für die quantitative Auswertung der Lokalisation von Claudin 11 genutzt.

3.2.3 Vaskularisierungsscore

Eine häufig angewandte Methode zur Quantifizierung der Vaskularisierung in immunhistochemischen Gewebeschnitten ist die Bestimmung des MVDs, der *Microvessel Density*. Erstmalig wurde der MVD von Weidner et al. (1991) beschrieben. Weidner detektierte für die Bestimmung des MVDs zuerst die am stärksten vaskularisierte Bereiche, die *hot spots*, des Gewebeschnittes. In diesen Bereichen erfolgte die manuelle Zählung der Gefäße und die Beurteilung der Gefäßdichte mit einem Wert von 1-4 (Weidner et al. 1991). Da die Auswahl der *hot spots* eine sehr subjektive Methode ist und stark vom Untersucher abhängig ist, haben einige Autoren zur Bestimmung des MVD zufällige Bildausschnitte, zum Beispiel drei bis fünf an der Zahl, gewählt (Inan et al. 2003, Liu et al. 2016). Um die Reliabilität dieser Methode zu erhöhen, greifen vielen Autoren auf computergestützte Bildanalysesysteme zurück (Charpin et al. 1995, Simpson

et al. 1996). Um neben dem Aspekt der Quantifizierung der Vaskularisierung mehr über die Qualität der Gefäße zu erfahren, wird häufig neben dem MVD auch die Intensität der immunhistochemischen Färbung bestimmt, so entwickelte zum Beispiel Mahzouni et al. (2010) den *von Willebrand factor vessel index*, ein Produkt aus MVD und Färbeintensität. Woznialis et al. (2016) bestimmten mithilfe der Image-Pro Software von Media Cybernetics die Fläche der angefärbten Gefäße und multiplizierten diese mit der Färbeintensität. Ähnlich gingen Uil et al. (2019) vor, die den MVD mithilfe von Image J bestimmten. Sie verwendeten den Gesamtprozentsatz der CD31-positiven Pixel pro analysiertem Gewebeschnitt als Maß für die durchschnittliche Dichte der Gefäße. Angelehnt an die Methode von Uil et al. (2019) wird in der vorliegenden Arbeit das Open-Source-Programm Image J in der Version 1.53a für die Analyse der immunhistochemischen Färbungen mit Claudin 5 genutzt. Image J ist ein auf Java basierendes Bildbearbeitungsprogramm, das von Wayne Rasband, einem Mitarbeiter des National Institute for Mental Health in Maryland entwickelt wurde (Schneider et al. 2012). Es wird gerne zur wissenschaftlichen Bildverarbeitung und Bildanalyse genutzt. Die vielseitige Funktionalität des Programms kann durch die kostenlose Installation von mehreren hundert verschiedenen Plugins erweitert werden (Collins 2007). Für die Analyse der Claudin 5 Proben mit Image J wurden die repräsentativen Fotografien nach einem speziellen Muster ausgewählt, um eine objektive Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Das Expressionsmuster von Claudin 5 wurde in Endometrien, Myometrien, Adenomyosen, Myometriumbereiche um Adenomyoseläsionen, extrauterinen Endometrioseläsionen und gesunden Organen des kleinen Beckens untersucht. Pro Zielstruktur wurden mit der Olympus FSX 100 Digitalmikroskop-Kamera fünf Bilder in 200-facher Vergrößerung, wie bereits von anderen Autoren vorgeschlagen (Liu et al. 2015), aufgenommen. Die fotografierten Gewebesausschnitte wurden so ausgewählt, dass zwei Bilder stark vaskularisierte Bereiche, zwei Bilder schwach vaskularisierte Bereiche und ein Bild einen repräsentativen Bereich der Zielstruktur widerspiegeln. Bei sehr wenigen Gewebeschnitten war das Erstellen von fünf Bildern aufgrund von schlechtem Gewebeerhalt oder unpassendem Gewebeschnitt erschwert. Diese Präparate wurden mit der höchstmöglichen aber oftmals geringeren Anzahl von Bildern festgehalten. Die Fotografien der Endometrien, der Adenomyosen und der Endometrioseläsionen in extrauterinen Geweben wurden nach ihrer Aufnahme mit der Bildbearbeitungssoftware GIMP bearbeitet. Die Bilder wurden vertikal in der Mitte geteilt um sicherzustellen, dass das zu analysierende Bild nur das für uns interessante

Gewebe darstellt. In den folgenden Abbildungen soll dieser Vorgang bildlich verdeutlicht werden.

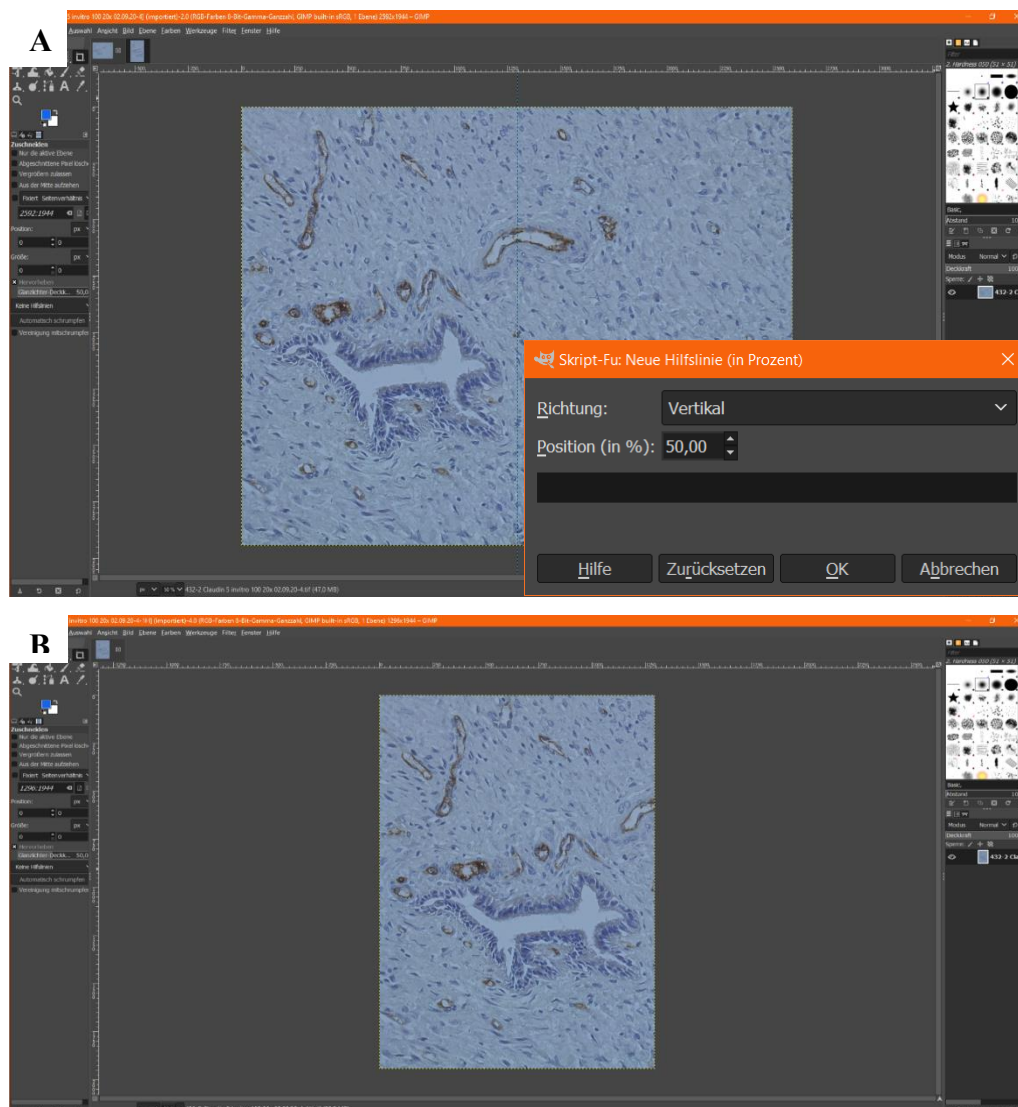


Abbildung 1: Ausschnitt einer tief infiltrierenden Endometrioselesion in der Vaginalwand einer 29-jährigen Patientin. In Ausschnitt A ist die unbearbeitete Fotografie mit der Olympus FSX 100 Digitalmikroskop-Kamera in einer 200-fachen Vergrößerung zu erkennen. Mithilfe dem Tool *Neue Hilfslinie in Prozent* wurde die Fotografie entlang einer vertikalen, mittig positionierten Hilfslinie zerlegt, sodass in Ausschnitt B möglichst nur die Endometrioselesion mit Drüsenverband und Stroma abgebildet ist.

Die vorbereiteten Fotografien wurden nun mithilfe des Programms Image J hinsichtlich der gefärbten endothelialen Fläche und der Farbeintensität analysiert. Die Flächenbestimmung erlaubt Aussagen über das Ausmaß der Vaskularisierung in den

entsprechenden Geweben und über die Intensitätsbestimmung können sich Informationen zu der Funktion von Claudin 5 als beteiligtes Protein an der Regulation des parazellulären Transports ergeben. Für die quantitative Bestimmung der gefärbten Areale wurde die Funktion *Colour Threshold* genutzt. Die Anwendung dieser Funktion umfasste das Einstellen einer Farbschwelle und damit die Definition eines begrenzten spezifischen Farbbereichs. Oberhalb der Farbschwelle liegende Areale wurden als positiv erkannt und in die Berechnung miteinbezogen, wohingegen Areale unterhalb der Farbschwelle eliminiert wurden. Diese Funktion ermöglichte eine maximale Erfassung der spezifisch gefärbten Fläche bei gleichzeitiger Minimierung der fälschlichen Erfassung von unspezifischen Hintergrundfärbungen. Um eine Vergleichbarkeit der Präparate zu gewährleisten, wurde für alle Claudin 5 Präparate derselbe Schwellenwert (Colour Threshold 125-130) definiert. Alle in diesen spezifischen Farbbereich fallende Pixel wurden durch das Programm markiert, hinsichtlich der Fläche bemessen und ein Wert in der Einheit pixel² ausgegeben. Diese Methode zur Auswertung immunhistochemischer Färbungen wurde bereits in ähnlicher Weise von anderen Autoren vorgeschlagen (Meusch 2016). Die ausgewählte Fläche wurde in einem nächsten Schritt ins Verhältnis zur Gesamtpixelanzahl des Bildes gestellt, um letztendlich den Anteil der gefärbten Fläche in Prozent bezogen auf die Gesamtfläche des fotografierten Präparats zu erhalten:

$$\% \text{ an gefärbter Fläche} = \frac{\text{gefärbtes Areal in pixel}^2 \times 100}{\text{Gesamtfläche in pixel}^2}$$

Die Gesamtpixelanzahl einer unbearbeiteten Fotografie betrug 55,99 pixel²; die eines in der vertikalen Mitte geteilten Bildes 27,99 pixel² (Abb. 1). Die Angabe eines Flächenanteils in Bezug auf eine Gesamtfläche ist ein anerkanntes Mittel in der wissenschaftlichen Arbeit (Bulut & Sahin 2009).

Für die Bestimmung der Färbeintensität wurde mit einem Plugin, dem IHC Profiler gearbeitet. Der IHC Profiler bietet einen Algorithmus für die automatische digitale Bestimmung der Färbeintensität im dargestellten Gewebeausschnitt an (Varghese et al. 2014). Der IHC Profiler bestimmt die Färbeintensität jedes Pixels, ordnet den Pixel einer von vier Farbstufen zu (high positive, positive, low positive, negative) und gibt dies als Prozentsätze an. In Anlehnung an den H-Score wurden die vom IHC-Profiler bestimmten Prozentsätze mit der jeweiligen Intensitätsstufe verrechnet und die daraus entstandenen Produkte addiert:

$$\text{Intensitätsbestimmung} = [1 \times (\% \text{ Pixel}^{\text{low positive}})] + [2 \times (\% \text{ Pixel}^{\text{positive}})] + [3 \times (\% \text{ Pixel}^{\text{high positive}})]$$

Im letzten Schritt der Auswertung der Claudin 5 Proben wurden die Ergebnisse der beiden Parameter multipliziert, um somit den Vaskularisierungsscore zu erhalten, der die endotheliale Fläche und Intensität berücksichtigt. Dieser Schritt wurde bereits in einigen Publikationen in ähnlicher Weise angewandt (Mahzouni et al. 2010, Usuda et al. 2018).

$$\text{Vaskularisierungsscore} = \text{Färbeintensität} \times \text{endotheliale Fläche}$$

In einem weiteren Ansatz wurde der Flächeninhalt der einzelnen Gefäße in den Endometrien gesunder und an Endometriose erkrankter Frauen untersucht. Auch die Präparate mit Adenomyose- und extrauterinen Endometrioseläsionen wurden hinsichtlich dieses Parameters analysiert. Grund für die Analyse der Gefäßfläche war unter anderem Ota et al. (1998), der die größeren Gefäßflächen in den Präparaten von Patientinnen mit Adenomyose als möglichen Grund für die begleitende Hypermenorrhoe ansieht. Pro Präparat wurden jeweils zwei Fotografien mithilfe von Image J und der Funktion *Polygon selection* analysiert. Zuerst wurde anhand der Funktion *Set Scale* und der Maßstabsangabe im rechten unteren Bildrand die entsprechende Skalierung festgelegt (Abb. 2A). Daraufhin wurden alle auf der Fotografie abgebildeten Gefäße bezüglich ihrer Fläche in μm^2 analysiert und der Mittelwert berechnet (Abb. 2B). Abbildung 2B zeigt eine Fotografie des Stromas einer Adenomyoseläsion einer 48-jährigen Patientin. Mithilfe des Tools *Polygon selection* des Programms Image J wurde beispielhaft eines der abgebildeten Gefäße umrandet, durch den grünen Pfeil markiert, und die umrandete Fläche in μm^2 berechnet. In dem dargestellten Beispiel ergab die Messung eine Gefäßfläche von $2710\mu\text{m}^2$. Diese Berechnung wurde für alle abgebildeten Gefäße dieser Fotografie angestellt und daraufhin ein Mittelwert dieser errechneten Gefäßflächen ermittelt, welcher in der Abbildung 2B $327\mu\text{m}^2$ betrug.

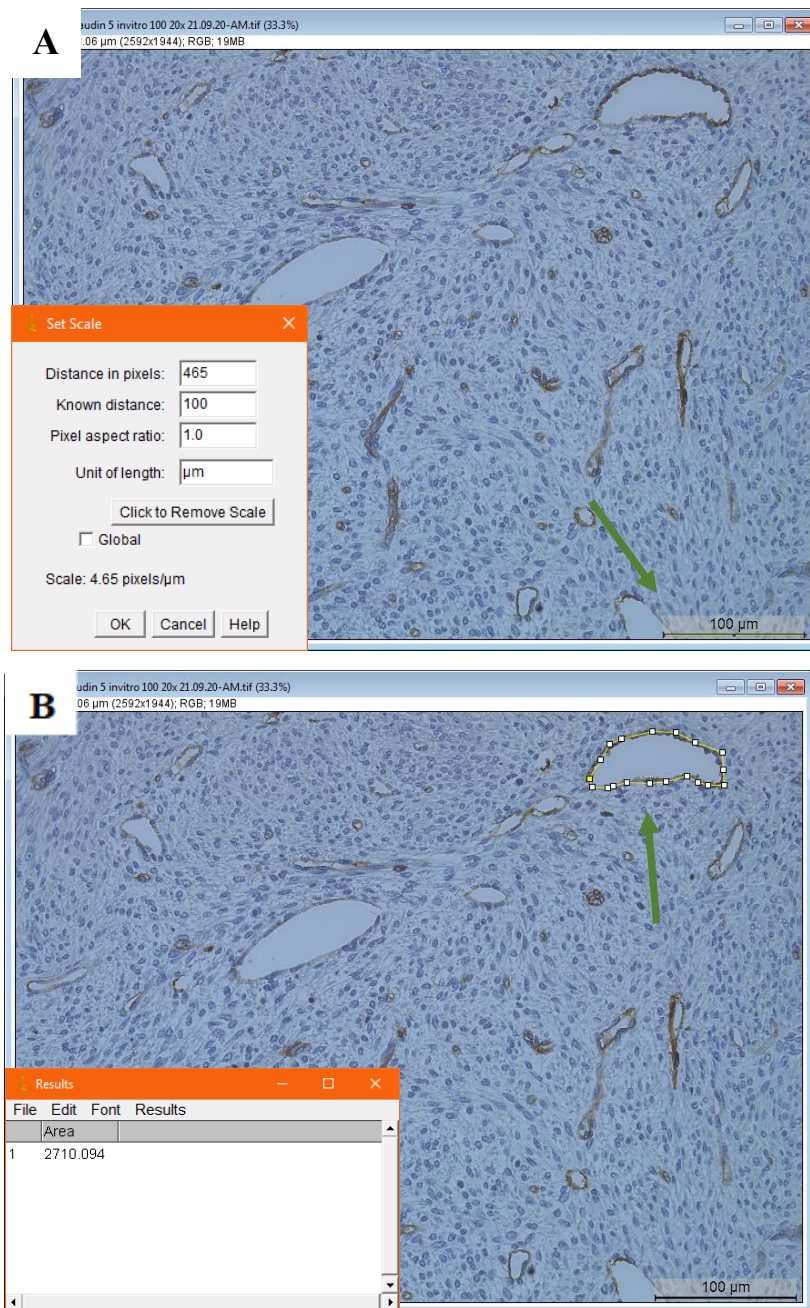


Abbildung 2: Ausschnitt aus dem endometrialen Stroma einer 48-jährigen Patientin mit Adenomyose. Vergrößerung 200-fach. Größenmaßstab 100µm. In Ausschnitt A ist der Schritt der Skalierung durch die Verwendung des Tools Set Scale zu erkennen. Mithilfe des Maßstabs im rechten unteren Bildrand, markiert durch den orangenen Pfeil, konnte die entsprechende Skalierung, 4,65 pixels/µm, eingestellt werden. In Ausschnitt B ist die Größenmessung eines Gefäßes, markiert durch den orangenen Pfeil, beispielhaft aufgezeigt. Mithilfe des Tools *Polygon selection* wurde das Gefäß entsprechend markiert und die umrandete Fläche und damit die Gefäßgröße in µm² berechnet.

3.3 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurde das Programm GraphPad Prism 6.01 genutzt. Alle Werte wurden als Mittelwerte oder Mediane mit dazugehörigem Standardfehler oder Standardabweichung dargestellt. Die Ergebnisse der zu vergleichenden Gruppen wurden zuerst mithilfe des F-Tests auf eine Normalverteilung geprüft und durch eine One-Way Analysis of Variance (ANOVA) näher beschrieben. Der finale Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test durchgeführt. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Als signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ angesehen.

4 Ergebnisteil

Mit dem Ziel weitere Erkenntnisse über die Pathophysiologie und die Ätiologie der Endometriose und der Adenomyose zu erlangen, wurden in der vorliegenden Forschungsarbeit die Expressionsmuster von drei Proteinen aus der Claudin-Familie, Claudin 1, 5 und 10, näher untersucht. Die drei ausgewählten Proteine weisen in der Immunhistochemie ein spezifisches Muster mit wenigen unspezifischen Anfärbungen auf. Diese spezifischen Expressionsmuster werden sowohl aus qualitativer als auch quantitativer Sicht in den folgenden Kapiteln genauer analysiert. Hierfür wurden neben der Prozentsatzbestimmung an positiven Drüsen, die H-Score Analyse und die computerunterstützte Flächenanteilsbestimmung angewandt. Die Analyse der drei Proteine erfolgte einerseits im physiologischen Endometrium der Kontrollgruppe und andererseits in pathologisch verändertem Gewebe. Neben den Läsionen der Adenomyose wurden extrauterine endometriotische Läsionen auf die Expression der Claudine untersucht. Die Gewebeproben für diese Analysen wurden vorwiegend durch minimal invasive Verfahren in der Universitätsklinik Gießen operativ entnommen und durch das Institut der Pathologie histologisch beurteilt. Alle drei untersuchten Claudine sind für den Aufbau von Tight Junctions unerlässlich und wurden im Endometrium und in endometriotischen Läsionen bisher nicht genauer untersucht. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen ausführlich dargestellt.

4.1 Qualitative und quantitative Analyse von Claudin 10

4.1.1 Vorexperimente zur Spezifität des Claudin 10 Antikörpers

Im Folgenden wurde das Expressionsmuster von Claudin 10 in gesunden Endometrien und in Endometrien von Patientinnen mit Endometriose mittels Immunhistochemie untersucht. Im Anschluss wurden diese miteinander und mit dem Proteinmuster in Adenomyoseläsionen und extrauterinen Endometrioseeläsionen verglichen.

Zuvor wurden, um die Spezifität des Antikörpers für Claudin 10 genauer zu untersuchen, unter anderem gesunde Ovarien gefärbt. Außer der Anfärbung der Oozyten, als Teil der Follikel, konnte keine Färbung für Claudin 10 beobachtet werden. Die stromalen Zellen des Ovargewebes und das einschichtige kubische Oberflächenepithel stellten sich für die Färbung mit Claudin 10 negativ dar (Abb. 3). Diese Erkenntnisse waren für die korrekte Beurteilung der Gewebeschnitte mit ovarieller Endometriose wichtig.

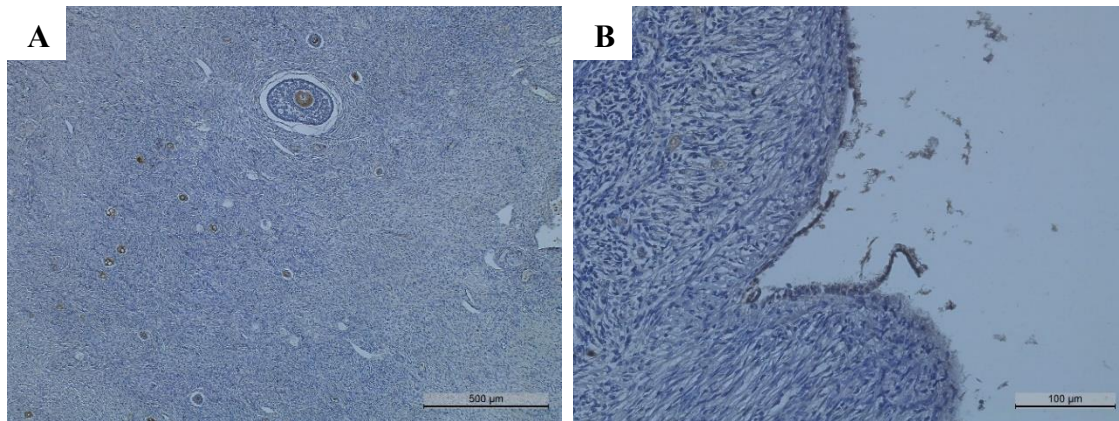


Abbildung 3: Nachweis von Claudin 10 in einem gesunden Ovar. Vereinzelt Anfärbungen der Oozyten sind zu erkennen (A). Oberflächenepithel (B), Gefäßanschnitte, Rinde und Mark des Ovars sind Claudin 10-negativ. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 μm ; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 μm

Außerdem wurde Gewebe der Tuba uterina auf die Expression von Claudin 10 untersucht. In der gesamten Tube war eine apikale Färbung der luminalen Epithelzellen zu beobachten, jedoch nicht im Kern der Epithelzellen oder im Stroma. Im Bereich der Ampulle war die apikale Färbung am stärksten ausgeprägt (Abb. 4). Im Infundibulum präsentierten sich die Claudin 10-Färbungen als Plaque-ähnlich. Die apikalen Färbungen der Epithelzellen nahmen in den Krypten an Intensität zu und waren zur Mitte hin schwächer ausgeprägt (Abb. 5). Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Inai et al. (2005) gemacht, die die Claudin 10 Expression in den Krypten des Kolons untersuchten. Die durchgeführten Färbungen der Tubenpräparate mit dem Antikörper für Claudin 10 zeigten ein spezifisches Expressionsmuster von Claudin 10 in Epithelzellen auf. Auch in den Abbildungen von Tube und Endometrium des *Human Proteinatlasses* war dieses Muster zu finden und zeigte, dass der verwendete Antikörper für eine Reihenuntersuchung verwendbar ist (Human Protein Atlas, Knut and Alice Wallenberg Foundation, 2022).

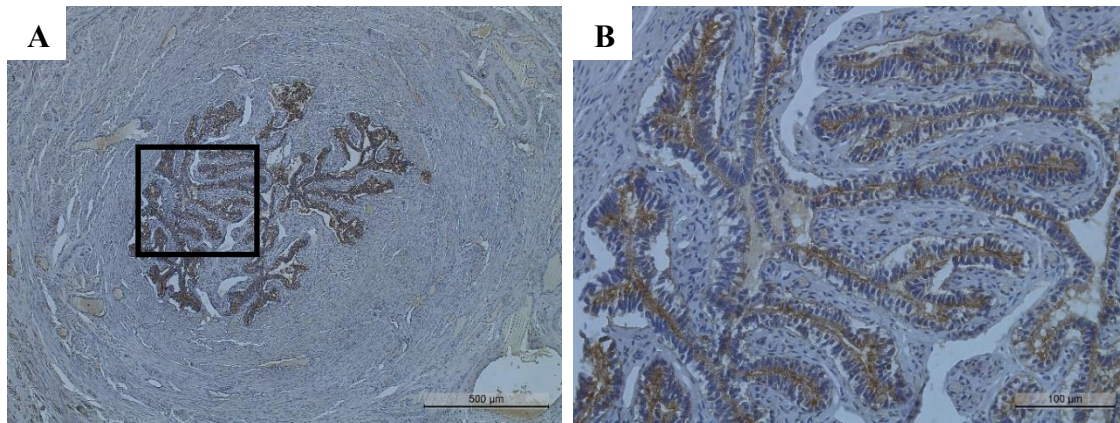


Abbildung 4: Nachweis von Claudin 10 in der Ampulle einer Tube einer 39-jährigen Patientin. Zu beobachten ist eine strikt auf den apikalen Zellpol begrenzte Färbung des einschichtigen Flimmerepithels der Ampulle. Angrenzende Muskel- und Stromaschichten und angeschnittene Gefäße sind negativ. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

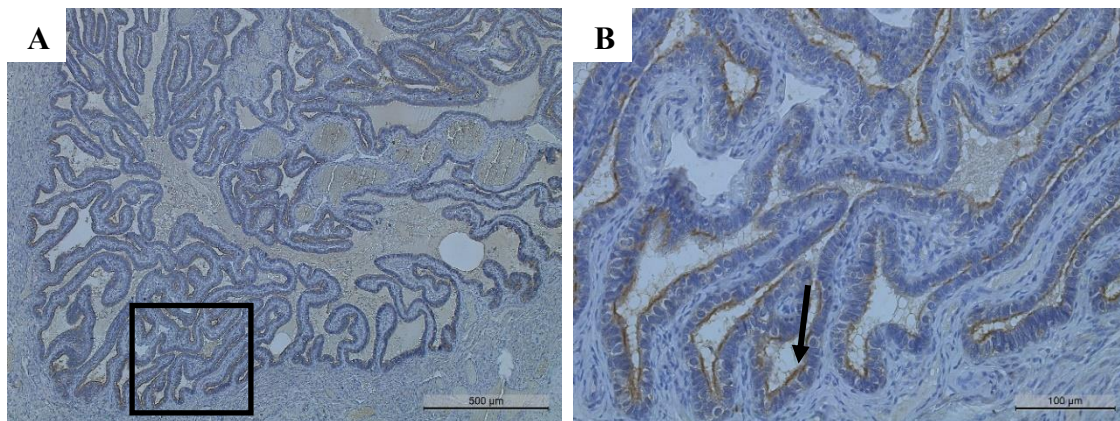


Abbildung 5: Nachweis von Claudin 10 im Infundibulum einer Tube einer 39-jährigen Patientin mit plaqueähnlicher Anfärbung des apikalen Pols des einschichtigen zilientragenden Epithels (Pfeil). Die basalen Abschnitte der Tube zeigen eine deutliche Expression von Claudin 10, wohingegen die Expression zur Mitte hin schwächer ist. Das umgebende Gewebe und die Gefäßanschnitte sind negativ, Blutreste im Lumen sind unspezifisch gefärbt. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

4.1.2 Analyse des uterinen Expressionsmusters von Claudin 10

Die uterinen Zellen wurden mittels Immunhistochemie auf die Expression von Claudin 10 untersucht und analysiert. In der Kontrollgruppe, bestehend aus gesunden Patientinnen, zeigten nahezu alle der endometrialen Drüsen eine spezifische Färbung für Claudin 10 (Tab. 8). Es zeigte sich eine auf den apikalen Zellpol begrenzte zytoplasmatische und membranöse Anfärbung der glandulären Epithelzellen, wohingegen das umgebende endometriale Stroma, das angrenzende Myometrium und die angeschnittenen Gefäße frei von Färbung waren. In den repräsentativen Ausschnitten der Abbildung 6 ist dieses Expressionsmuster dargestellt.

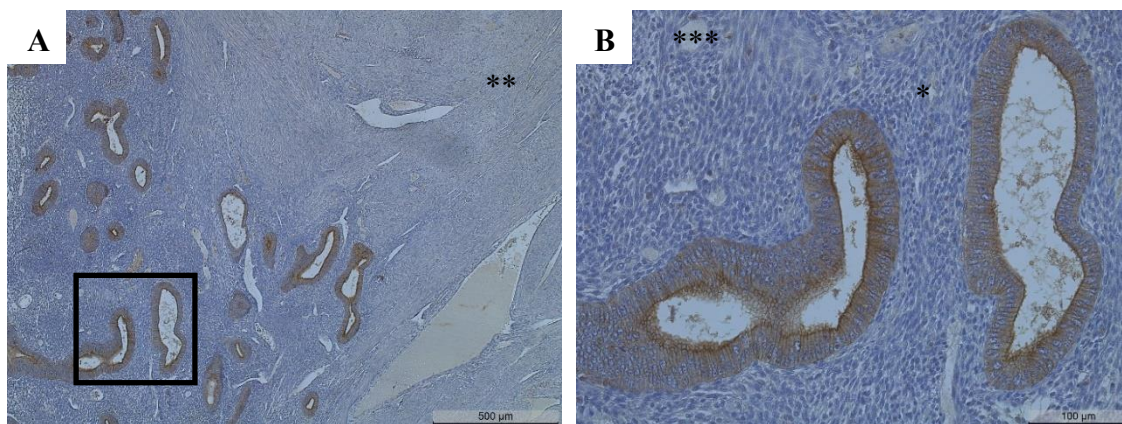


Abbildung 6: Nachweis von Claudin 10 im proliferativen Endometrium einer gesunden 47-jährigen Patientin. Abgebildet sind die typischen endometrialen Drüsenverbände mit der apikal betonten zytoplasmatischen Färbung aller Epithelzellen. Stroma (*), Myometrium (**) und Gefäße (***) sind negativ. Die Markierung von Stroma, Myometrium und Gefäßen erfolgt exemplarisch für alle folgenden Abbildungen. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Zum Vergleich wurden Endometrien von Patientinnen mit Endometriose untersucht und ein sehr ähnliches Expressionsmuster gefunden. 97-98% der endometrialen Drüsen von Patientinnen mit Endometriose zeigten die bereits dargestellte spezifische apikal betonte zytoplasmatische und membranöse Lokalisation von Claudin 10. Umgebendes Stroma, angrenzendes Myometrium und Gefäßanschnitte waren Claudin 10-negativ (Tab.8, Abb. 7).

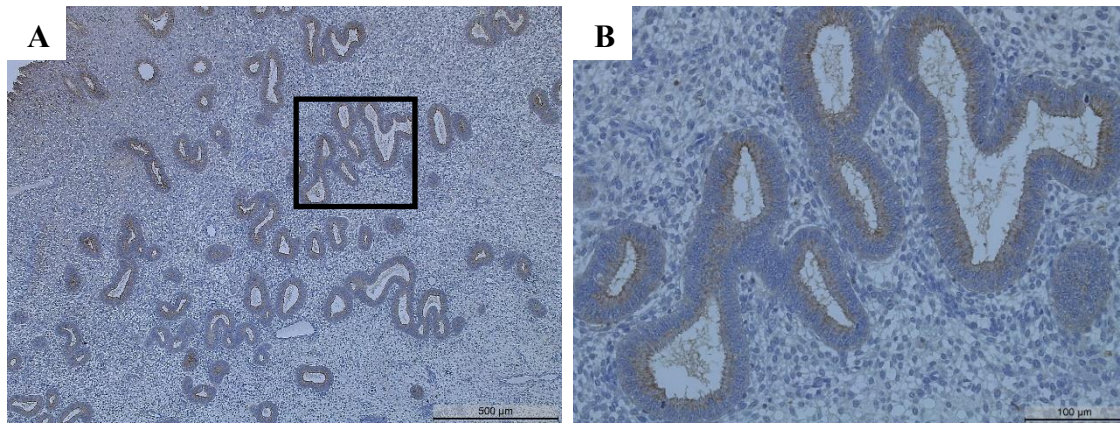


Abbildung 7: Nachweis von Claudin 10 im sekretorischen Endometrium einer 37-jährigen Patientin mit Endometriose. In diesem repräsentativem Gewebeschnitt konnte in jeder endometrialen Drüse das spezifische Expressionsmuster von Claudin 10, eine apikal betonte zyttoplasmatische Färbung, beobachtet werden. Stroma, Myometrium und Gefäße zeigten keine Färbung. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Die Intensität der Färbung wurde mittels H-Score quantifiziert. Sowohl in der vergleichenden H-Score Analyse als auch im Vergleich der Prozentsätze an positiven Zellen zeigten die Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose keine signifikanten Unterschiede (Tab. 8).

Weiterhin konnten keine zyklusabhängigen Unterschiede bezüglich der Expression von Claudin 10 in der proliferativen und der sekretorischen Phase bei gesunden Frauen als auch bei Patientinnen mit Endometriose nachgewiesen werden (Tab. 8).

Tabelle 8: Vergleich der Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 10

	Endometrien ohne Endometriose		Endometrien mit Endometriose	
	Proliferativ	Sekretorisch	Proliferativ	Sekretorisch
Alle Proben (n)	12	11	9	15
Alter (MW±SD)	43±9,6	41±6,1	32±5,5	39±7,4
H-Score				
Mittelwert	103	106	108	95
SEM	5,5	11,3	14,6	5,0
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
% positive Drüsen				
Mittelwert	98	97	97	98
SEM	1,2	1,7	2,5	1,3
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler

4.1.3 Analyse des Expressionsmusters von Claudin 10 in der Adenomyose

In der vorliegenden Arbeit wurden die Präparate der Kontrollgruppe nicht nur mit Proben von Patientinnen mit extrauteriner Endometriose verglichen, sondern auch mit Präparaten von Patientinnen mit Adenomyose, die teilweise zusätzlich noch eine extrauterine Endometriose hatten (Tab. 9). Da die Anzahl der Proben nach der Zuteilung zu den zwei Zyklushälften für eine statistische Beurteilung zu gering war, wurde auf eine Aufteilung in die proliferative und sekretorische Phase in Tabelle 9 verzichtet. Die Analyse zeigte, dass das Expressionsmuster von Claudin 10 in der Adenomyose dem in den Endometrien entsprach. Abbildung 8 zeigt repräsentative Ausschnitte aus dem Endometrium und der Adenomyose einer Patientin. In beiden Ausschnitten ist die charakteristische apikal betonte zytoplasmatische Expression von Claudin 10 zu erkennen. Das umgebende endometriale Stroma, das angrenzende Myometrium und die angeschnittenen Gefäße zeigen keine Färbung.

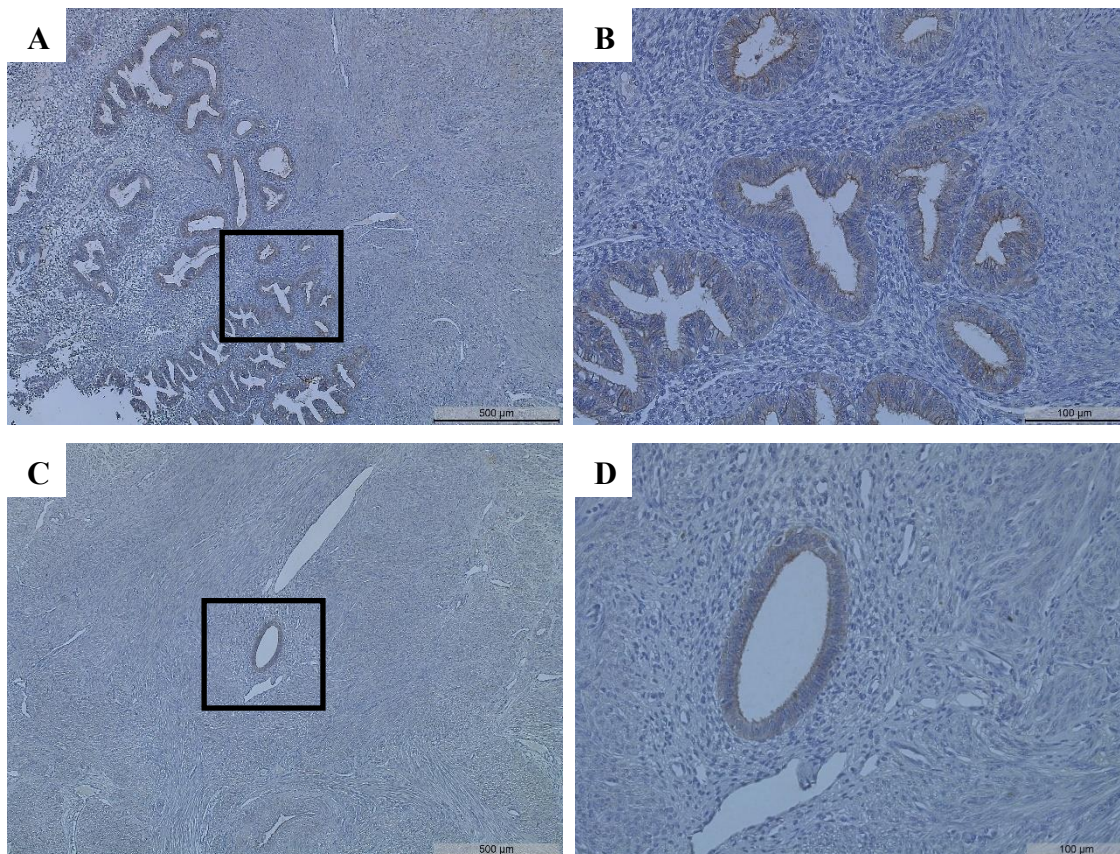


Abbildung 8: Nachweis von Claudin 10 im Endometrium (A+B) und in der Adenomyose (C+D) einer 35-jährigen Patientin. Sowohl im proliferativen Endometrium als auch in der Adenomyoseläsion markiert Claudin 10 alle Drüsen positiv. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. Abbildung D ist eine

Vergrößerung des in Abbildung C markierten Bereichs. A+C: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B+D: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Bei der quantitativen Betrachtung wurde in den eutopen Endometrien von Patientinnen, die sowohl an einer Endometriose, als auch an einer Adenomyose litten, eine signifikante Reduktion des Prozentsatzes an Claudin 10-positiven Drüsen beobachtet. Im Vergleich zu den positiven Zellen in den Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose ergab die Analyse eine Reduktion von 8% (Tab. 9).

Die endometrialen Drüsen der Adenomyoseläsionen zeigten in dieser Gruppe nahezu alle eine spezifische Expression von Claudin 10 (Tab. 9). Die qualitative Analyse anhand des H-Scores ergab eine signifikante Erhöhung der Claudin 10 Expression in den Adenomyoseläsionen von Frauen mit Endometriose gegenüber den eutopen Endometrien (Tab. 9).

Tabelle 9: Vergleich der Endometrien und Adenomyosen von Frauen mit und ohne Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 10

	EM ohne EN	EM mit EN	AM-Pat mit EN		AM-Pat ohne EN	
	EM	EM	EM (c)	AM (d)	EM (e)	AM (f)
Alle Proben (n)	23	24	12	17	15	21
Alter MW±SD	42±8,0	37±7,5	42±4,3	41±4,4	43±5,0	44±4,8
H-Score						
Mittelwert	104	100	107	136	97	108
SEM	6,0	6,2	9,0	11,0	4,83	4,8
p-Werte	n.s.	0,05 ^{b,d}	n.s.	0,05 ^{b,d}	n.s.	n.s.
%positive Drüsen						
Mittelwert	98	98	90	97	94	96
SEM	1,0	1,2	3,0	1,7	2,4	2,2
p-Werte	n.s.	0,05 ^{b,c}	0,05 ^{b,c} 0,05 ^{c,d} 0,05 ^{c,f}	0,05 ^{c,d}	n.s.	0,05 ^{c,f}

Abkürzungen: EN = Endometriose, EM = Endometrium, AM = Adenomyose, AM-Pat = Patientinnen mit Adenomyose, Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{b,d} bedeutet b verglichen mit d

4.1.4 Analyse des Expressionsmusters von Claudin 10 in der extrauterinen Endometriose

Im nächsten Schritt wurde auf gleiche Weise, durch Quantifizierung der positiven Drüsen und der Bestimmung des H-Scores, die Expression von Claudin 10 in den extrauterinen endometriotischen Läsionen bestimmt. Nahezu alle ektopen endometrialen Drüsen zeigten eine deutliche Positivität für Claudin 10 (Tab. 10). Allerdings fielen bei der Analyse der extrauterinen Gewebeproben Abweichungen zu dem bekannten apikal betonten Färbemuster auf. Auf diese Unterschiede wird in Kapitel 5.1.5 genauer eingegangen. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Expression von Claudin 10 in der ovariellen Endometriose. Die ovarielle Endometriose präsentiert sich häufig in Form von Zysten, welche im klinischen Alltag Schokoladenzysten genannt werden, da sie oftmals durch Einblutungen mit brauner Flüssigkeit gefüllt sind. Zu erkennen ist ein starke zytoplasmatische und membranöse Färbung der gesamten epithelialen Zelle. Die Analyse der Färbeintensität ergab eine signifikante Erhöhung des H-Scores der ovariellen endometrialen Drüsen gegenüber den uterinen Endometriumdrüsen (Tab. 10).

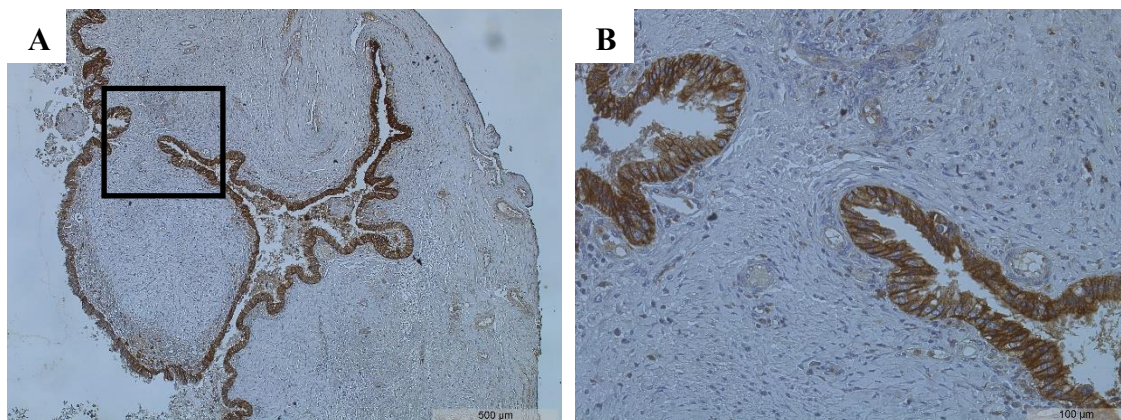


Abbildung 9: Nachweis von Claudin 10 im Ovar einer 28-jährigen Patientin. 100% der epithelialen Zellen zeigen eine Färbung des Zytoplasmas und der lateralen Zellmembran. Das umliegende Stroma und die angeschnittenen Gefäße sind Claudin 10-negativ. Zum Lumen hin sind vereinzelt unspezifische Anfärbungen von Blut und Zelldetritus zu erkennen. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Die nachfolgende Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt aus einem sakrouterinen Ligament einer 40-jährigen Patientin und repräsentiert die Expression von Claudin 10 in der peritonealen Endometriose. Ähnlich zu dem Expressionsmuster in der ovariellen Endometriose zeigt sich ein zytoplasmatisches und membranöses Färbemuster der gesamten endometriotischen Epithelzelle. Die Analyse der Gewebeproben mit peritonealer Endometriose ergab eine erhöhte, jedoch statistisch nicht signifikant veränderte Expression von Claudin 10 im Vergleich zu den eutopen Endometrien. (Tab. 10).

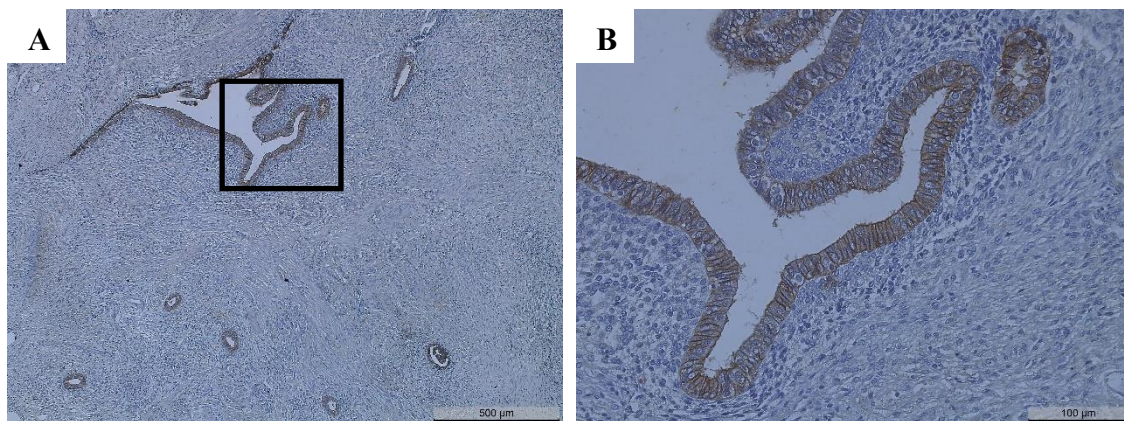


Abbildung 10: Nachweis von Claudin 10 im linken Ligamentum sakrouterinum einer 40-jährigen Patientin. Die epithelialen Zellen zeigen eine Positivität für Claudin 10 im Zytoplasma und im Bereich der Zellgrenzen, wohingegen umliegendes Stroma, angrenzendes Organgewebe und angeschnittene Gefäße negativ sind. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Abbildung 11 zeigt beispielhaft die Verteilung von Claudin 10 in der tief infiltrierenden Endometriose. Der Gewebeausschnitt stammt aus der Blase einer 33-jährigen Patientin und zeigt stark zytoplasmatisch gefärbte epitheliale Drüsenzellen, eingebettet in zytogenem Stroma. Das Stroma stellt sich grundsätzlich Claudin 10 negativ mit wenigen unspezifischen Färbereaktionen von Blutresten dar. Die Gefäßanschnitte zeigen keine Färbung für Claudin 10. Die quantitative Analyse mittels H-Score ergab eine signifikant erhöhte Proteinexpression von Claudin 10 in der tief infiltrierenden Endometriose im Vergleich zur Expression in uterinen Endometriumdrüsen (Tab. 10).

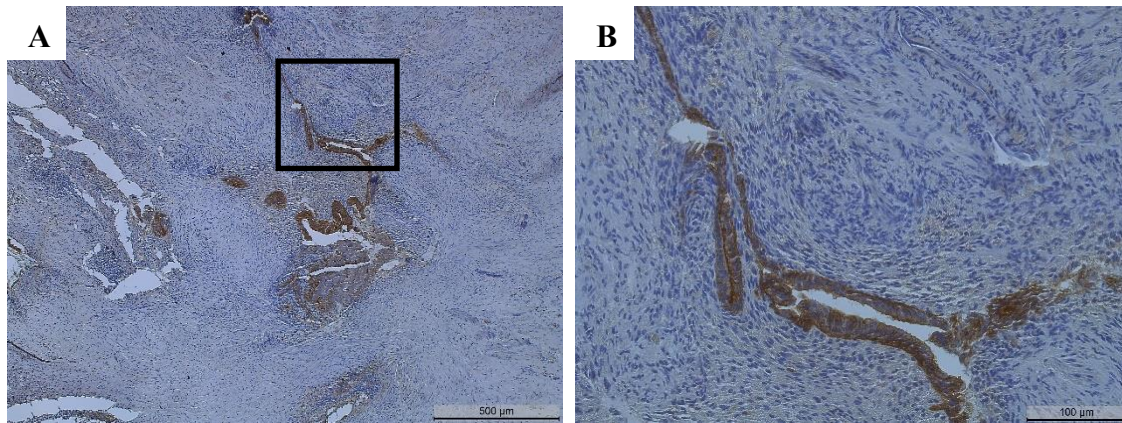


Abbildung 11: Nachweis von Claudin 10 in der Blase einer 33-jährigen Patientin. Eine starke zytoplasmatische und membranöse Färbung der endometriotischen Epithelzellen ist zu erkennen. Das Stroma, das umliegende Gewebe und die Gefäße sind frei von Färbung. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 10: Vergleich der eutopen und ektopen endometrialen Drüsen anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 10

	EM ohne EN (a)	EM mit EN (b)	OMA (c)	SPE (d)	TIE (e)
Alle Proben (n)	23	24	27 (28)	18	21
Alter (MW±SD)	42±8,0	37±7,5	33±6,7	35±4,5	36±6,8
H-Score					
Mittelwert	104	100	170	136	130
SEM	6,0	6,2	8,4	13,2	8,0
p-Werte	0,001 ^{a,c}	0,001 ^{b,c} 0,05 ^{b,e}	0,001 ^{a,c} 0,001 ^{b,c}	n.s.	0,05 ^{b,e}
%positive Drüsen					
Mittelwert	98	98	99	98	99
SEM	1,0	1,2	0,4	1,4	0,5
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: EN = Endometriose, EM = Endometrium, OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, TIE = tief infiltrierende Endometriose, n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,d} bedeutet a verglichen mit d

4.1.5 Analyse der Lokalisationsverschiebung von Claudin 10

Neben der quantitativ erhöhten Proteinexpression von Claudin 10 konnte in den extrauterinen Endometrioseläsionen eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Die Analyse zeigte in den extrauterinen Endometrioseläsionen eine Verschiebung der Lokalisation von Claudin 10, weg von der präferentiellen apikalen Lokalisation in eutopen Endometrien.

Diese Beobachtung wurde mithilfe eines Lokalisationsscores klassifiziert. Da Claudin 10 in den Endometrien gesunder Frauen fast ausschließlich apikal in den Epithelzellen lokalisiert war, wurde diese Lokalisation als regulär angenommen und mit fünf Punkten klassifiziert (Abb. 12A). Vier Punkte wurden für eine vorwiegend apikolaterale Expression vergeben (Abb. 12B) und drei Punkte für eine basolaterale Färbung (Abb. 12C). Eine betonte basale Färbung wurde mit zwei Punkten (Abb. 12D) und eine deutliche Färbung des gesamten Zytoplasmas mit einem Punkt bewertet (Abb. 12E). Für jedes Präparat wurde die überwiegende Proteinlokalisierung erfasst und die entsprechende Punktzahl zugeordnet. Der Mittelwert aller Proben entsprach dem Lokalisationsscore.

In allen drei Entitäten konnte eine Tendenz zur Verschiebung zu einer mehr basalen und zytoplasmatischen Expression beobachtet werden. Von den ovariellen Endometrioseläsionen zeigten 86% der Proben nicht das als regulär angenommene apikale Expressionsmuster. Am häufigsten zeigten sich die basolaterale und zytoplasmatische Proteinlokalisierung, sodass der durchschnittliche Lokalisationsscore bei den Proben mit einer ovariellen Endometriose bei 2,75 lag und sich damit signifikant von den eutopen Endometrien mit einem durchschnittlichen Wert von 4,55 und den Adenomyoseläsionen mit einem Wert von 4,61 unterschied (Tab. 11). Die Abbildung 12D zeigt einen Ausschnitt aus einer peritonealen Endometriose, auf der eine auf den basalen Pol der epithelialen Zellen beschränkte Expression von Claudin 10 zu erkennen ist. Der durchschnittliche Lokalisationsscore der peritonealen Endometriose lag bei 3,42 (Tab. 11). Die Abbildung 12E repräsentiert beispielhaft die Lokalisation der Claudin 10 Expression in der tief infiltrierenden Endometriose. Sie zeigt den Verlust eines differenzierten lokalisierten Expressionsmusters, stattdessen zeigt sich eine starke zytoplasmatische Färbung der gesamten endometriotischen Epithelzelle. 52% der Proben mit einer tief infiltrierenden Endometriose wurden mit der Punktzahl eins bewertet. Ein solches Lokalisationsmuster lag bei keiner der Drüsen der eutopen Endometrien und der Adenomyose vor. Der Tabelle 11 ist zu entnehmen, dass der Lokalisationsscore der tief infiltrierenden Endometriose im Vergleich zu den Scores der Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose und den Adenomyosen signifikant vermindert war.

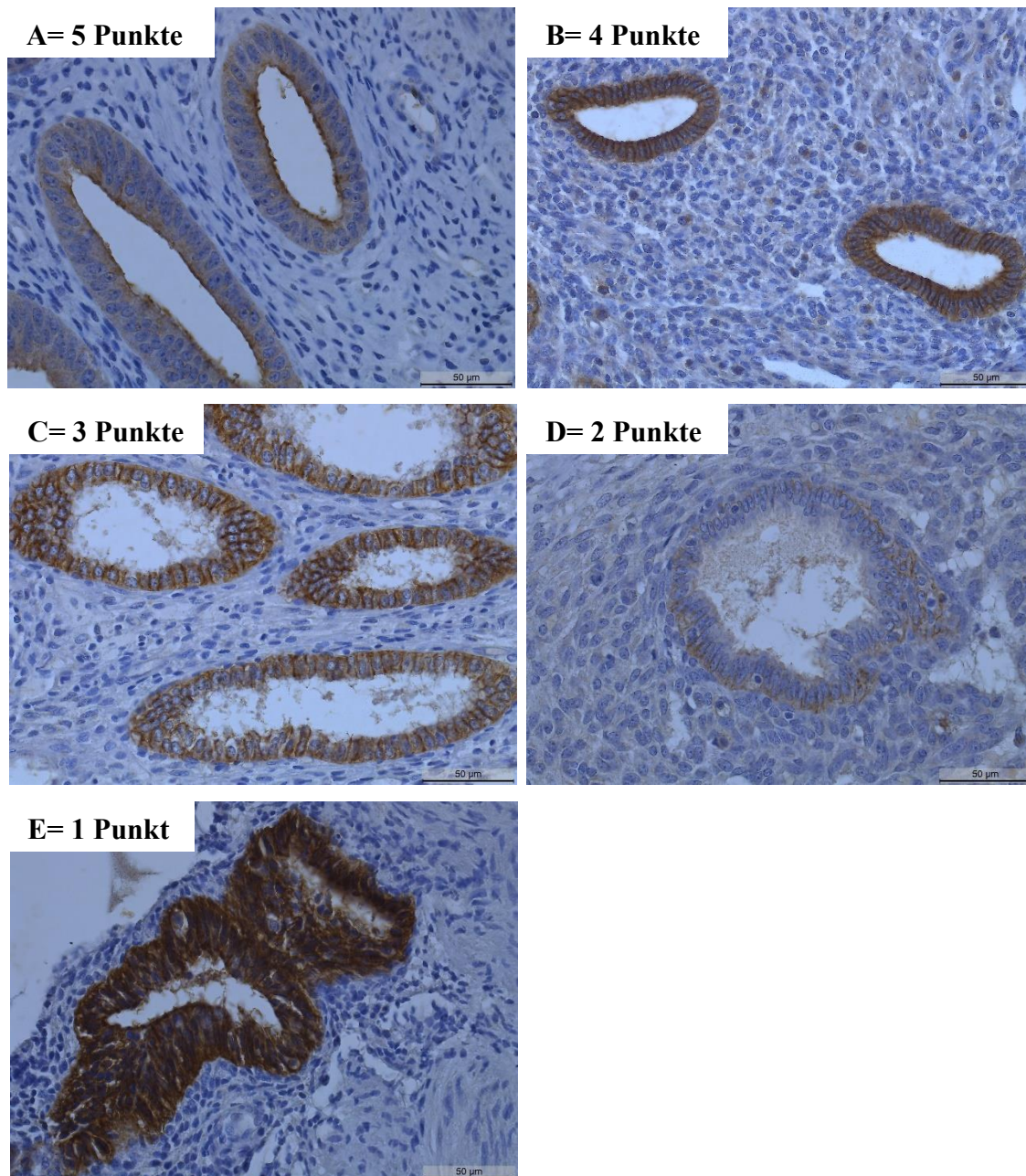


Abbildung 12: Beispielfarbungen der verschiedenen Proteinlokalisationen von Claudin 10 und des Lokalisationsscores. **A:** Nachweis von Claudin 10 in den endometrialen Drüsen einer 41-jährigen Patientin. Zu erkennen ist eine auf den apikalen Pol der Zelle begrenzte Färbung. **B:** Endometriale Drüsen einer 34-jährigen Patientin und einer apikolateralen Expression von Claudin 10. **C:** Endometriale Drüsen einer 37-jährigen Patientin und einer vorwiegenden basolateralen Färbung. **D:** Linkes Ligamentum sakrouterinum einer 40-jährigen Patientin mit peritonealer Endometriose. Zu erkennen ist eine betont basale Expression von Claudin 10. **E:** Rektum einer 28-jährigen Patientin mit tief infiltrierender Endometriose und kräftiger zytoplasmatischer Färbung der gesamten Zelle. A-E: Vergrößerung 400-fach, Größenmaßstab 50µm

Tabelle 11: Vergleich der eutopen und ektopen Drüsen anhand des Lokalisationsscores für Claudin 10

	EM ohne EN (a)	EM mit EN (b)	AM (c)	OMA (d)	SPE (e)	TIE (f)
Alle Proben (n)	23	24	38	28	18	21
Alter (MW±SD)	42±8,0	37±7,5	43±4,7	33±6,7	35±4,5	36±6,8
Lokalisationsscore						
Mittelwert	4,52	4,58	4,61	2,75	3,42	3,14
SEM	0,14	0,15	0,12	0,26	0,42	0,33
p-Werte	0,001 ^{a,d}	0,001 ^{b,d}	0,001 ^{c,d}	0,001 ^{a,d}	n.s.	0,05 ^{a,f}
	0,05 ^{a,f}	0,01 ^{b,f}	0,001 ^{c,f}	0,001 ^{b,d}		0,01 ^{b,f}
				0,001 ^{c,d}		0,001 ^{c,f}

Abkürzungen: EN = Endometriose, EM = Endometrium, AM = Adenomyose, OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, TIE= tief infiltrierende Endometriose, n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,d} bedeutet a verglichen mit d

4.1.6 Zusammenfassung des Ergebnisteils von Claudin 10

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression von Claudin 10 in nahezu allen eutopen und ektopen Endometriumdrüsen, sowie in nahezu allen Drüsen der Adenomyose nachgewiesen werden. Es konnten keine zyklusabhängigen Unterschiede gefunden werden. Auch der Vergleich der Expression von Claudin 10 in Endometriumdrüsen gesunder Frauen und Frauen mit Endometriose lieferte keine signifikanten Unterschiede. Eine signifikant erhöhte Expression von Claudin 10 konnte in ektopen Drüsenzellen der tief infiltrierenden Endometriose, der ovariellen Endometriose und in den Adenomyoseläsionen von Frauen mit Endometriose gezeigt werden. Außerdem wurde eine signifikante Verschiebung der Lokalisation, von der apikal betonten Anfärbung in den Epithelzellen eutoper Endometrien zu einer mehr basalen Zellanfärbung in ektopen Endometriumdrüsen der tief infiltrierenden, peritonealen und ovariellen Endometriose beobachtet.

4.2 Qualitative und quantitative Analyse von Claudin 1

4.2.1 Analyse des uterinen Expressionsmusters von Claudin 1

Für die vergleichende Analyse der Proteinexpression von Claudin 1 wurden zuerst Endometrien von gesunden Frauen, der Kontrollgruppe, mithilfe des H-Scores und der Prozentsatzbestimmung untersucht. Die folgende Abbildung (Abb. 13) zeigt ein sekretorisches Endometrium einer gesunden Patientin mit den typischen endometrialen Drüsen und dem umliegenden zellreichen Stroma. Die epithelialen Zellen, sowohl vom luminalen als auch vom endometrialen Typ, zeigten eine spezifische Lokalisation von Claudin 1 im gesamten Zytoplasma mit Betonung der lateralen Membranen. Die Zellkerne, das umliegende Stroma und die Gefäßanschnitte wurden von Claudin 1 nicht positiv markiert. Präparate, die in der proliferativen Phase operativ entnommen wurden, zeigten gegenüber den Endometrien in der sekretorischen Phase ein sehr ähnliches Expressionsmuster, sodass sich diese zwei Gruppen weder hinsichtlich des Prozentsatzes an gefärbten Drüsen noch des H-Scores unterschieden (Abb. 14,15; Tab.12). In allen Präparaten zeigten 100% der Drüsen eine deutliche Claudin 1 Positivität und einen ähnlich hohen H-Score mit einer geringen Schwankungsbreite (Tab. 12).

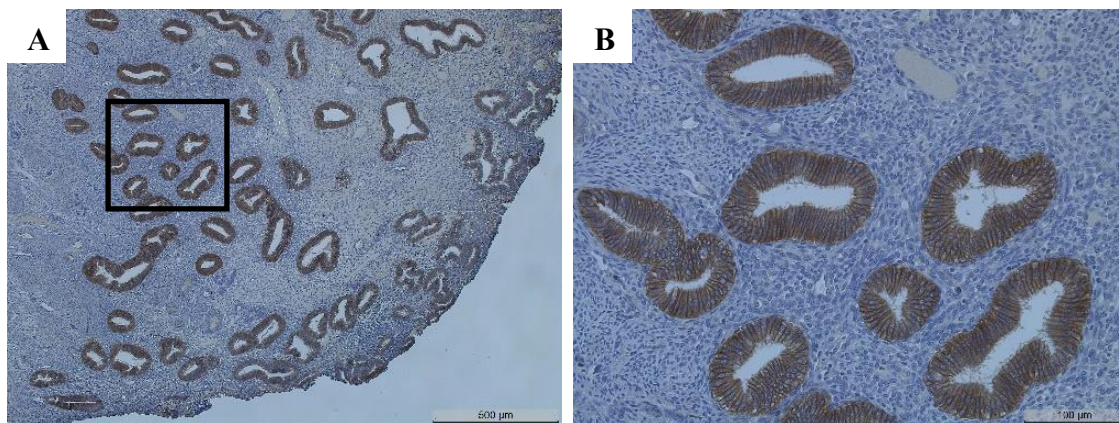


Abbildung 13: Nachweis von Claudin 1 in einem sekretorischen Endometrium einer 36-jährigen Patientin ohne Endometriose. 100% der Drüsen zeigen eine starke membranöse und zytoplasmatische Färbung für Claudin 1. Das Stroma und die Gefäßanschnitte sind negativ. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Die Analyse der Endometrien von Patientinnen mit Endometriose, unabhängig von der Zyklusphase, ergab vergleichbare Ergebnisse (Abb. 14,15; Tab. 12). In allen Präparaten

zeigten 100% der Drüsen eine Positivität für Claudin 1 mit einer ausgeprägten zytoplasmatischen und membranösen Anfärbung der epithelialen Zellen im Gegensatz zum Stroma und den Gefäßanschnitten, die sich negativ darstellten (Abb. 14,15). Die H-Score Analyse ergab ebenfalls fast identische Werte (Tab. 12).

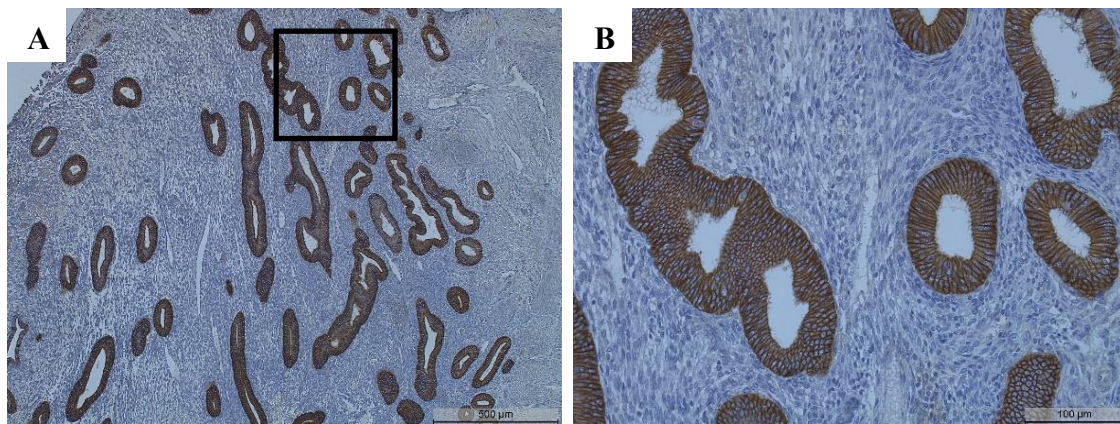


Abbildung 14: Proliferatives Endometrium einer Patientin mit Endometriose und deutlicher Positivität von Zytoplasma und Membranen der epithelialen Zellen für Claudin 1. Das Stroma und die Gefäße sind frei von Färbung. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

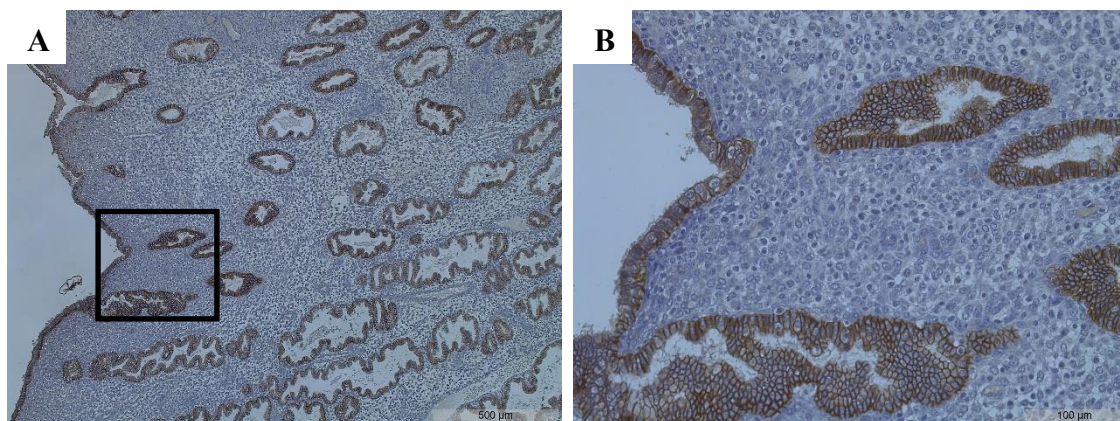


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin 1 in einem sekretorischem Endometrium einer 43-jährigen Patientin mit Endometriose. Im vergrößerten Bildausschnitt B ist eine repräsentative Darstellung des luminalen Epithels mit deutlicher zytoplasmatischer und membranöser Färbung aufgezeigt. Das endometriale Stroma und die Gefäße sind negativ. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 12: Vergleich der Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 1

	Endometrien ohne Endometriose		Endometrien mit Endometriose	
	Proliferativ	Sekretorisch	Proliferativ	Sekretorisch
Alle Proben (n)	12	11	9	16
Alter (MW±SD)	43±9,6	40±6,8	32±5,5	40±7,1
H-Score				
Mittelwert	162	161	162	173
SEM	11,3	6,8	16,7	8,6
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
%positive Drüsen				
Mittelwert	100%	100%	100%	100%
SEM	0,0	0,0	0,0	0,0
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler

4.2.2 Analyse des Expressionsmusters von Claudin 1 in der Adenomyose

Im Folgenden wurde die Expression von Claudin 1 in den Adenomyoseläsionen untersucht und mit den Ergebnissen der bereits analysierten Endometrien verglichen. Alle glandulären Epithelzellen der Adenomyoseläsionen zeigten eine ausgeprägte zytoplasmatische und membranöse Färbung für Claudin 1, wohingegen Stroma und angeschnittene Gefäße, wie bereits in den Endometrien beobachtet, keinerlei Positivität zeigten (Abb. 16). In Tabelle 13 ist die vergleichende Analyse mittels H-Score und Prozentsatzbestimmung an positiven Drüsen dargestellt und deutet auf ein sehr

ähnliches Expressionsmuster von Claudin 1 in der Adenomyose und den Endometrien hin.

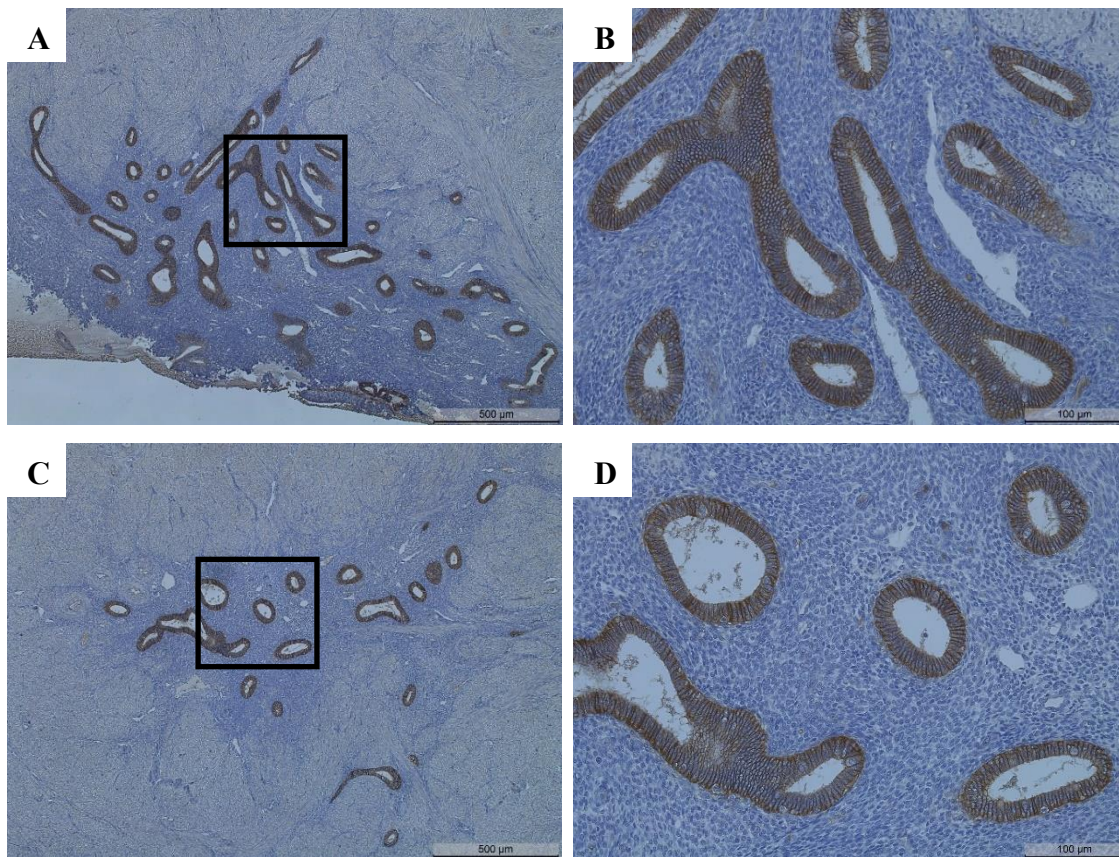


Abbildung 16: Nachweis von Claudin 1 im eutopen Endometrium (A+B) und in einer Adenomyoseläsion (C+D) einer 37-jährigen Patientin. In Abbildung A ist eine eventuell beginnende Adenomyose zu diskutieren. Es zeigt sich ein nahezu identisches Expressionsmuster von Claudin 1 in beiden Ausschnitten und eine deutliche zytoplasmatische Färbung der Drüsenzellen mit Betonung der lateralen Membranen. Das Stroma und die Gefäßanschnitte sind Claudin 1 negativ. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. Abbildung D ist eine Vergrößerung des in Abbildung C markierten Bereichs. A+C: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B+D: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Der Tabelle 13 ist zu entnehmen, dass die quantitative Expression von Claudin 1, beurteilt anhand des H-Scores, in den Adenomyosen gegenüber den eutopen Endometrien tendenziell leicht erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich war.

Tabelle 13: Vergleich der Endometrien und der Adenomyosen von Frauen mit Adenomyose und ohne oder mit extrauteriner Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 1

	EM ohne EN	EM mit EN	AM-Pat mit EN				AM-Pat ohne EN			
	EM	EM	EM		AM		EM		AM	
			p	s	p	s	p	s	p	s
Alle Proben (n)	23	25	7	5	8	9	7	11	9	12
Alter	41±8,3	37±7,4	44±1,5	39±1,7	44±3,9	39±3,5	41±1,6	44±1,4	43±5,5	44±4,5
MW±SD										
H-Score										
MW	161	169	178	202	183	206	158	188	170	190
SEM	6,6	8	15,3	19,6	10,0	17,7	7,8	14,2	7,67	15,4
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
%positive Drüsen										
MW	99,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100
SEM	0,18	0	0	0	0	0,03	0	0	0	0
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: EN = Endometriose, EM = Endometrium, AM = Adenomyose, AM-Pat = Patientinnen mit Adenomyose, p= proliferative Phase, s= sekretorische Phase, n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler

4.2.3 Analyse des Expressionsmusters von Claudin 1 in der extrauterinen Endometriose

In einem weiteren Schritt wurden die extrauterinen endometriotischen Läsionen, eingeteilt in ovarielle, peritoneale und tief infiltrierende Endometriose, hinsichtlich der Claudin 1 Expression untersucht. Alle drei Entitäten zeigten eine starke Expression von Claudin 1 in Form einer ausgeprägten zytoplasmatischen und membranösen Färbung der Epithelien, welche in Abbildung 17 dargestellt ist. Die Ausschnitte 17A und 17B imponieren mit stark gefärbten Epithelien glandulärer Strukturen einer ovariellen Endometriose. Deutlich zu erkennen ist der nicht angefärbte Zellkern in einem Claudin 1-positiven Zytoplasma der Epithelzellen. Das schmale endometriale Stroma und das angrenzende Ovargewebe sind ebenfalls frei von Färbung. Im Ligamentum sakrouterinum, dargestellt in den Ausschnitten 17C und 17D, beeindruckt ein großer peritonealer Endometrioseherd mit charakteristisch stark angefärbtem Drüsenverband und zellreichem negativen Stroma. In ähnlicher Weise präsentiert sich die tief infiltrierende Endometriose in den Ausschnitten 17E und 17F. Auch in dieser Entität zeigten sich das Zytoplasma und die lateralen Zellgrenzen der glandulären Epithelien deutlich gefärbt, wohingegen sich das Stroma negativ darstellte.

Bei der H-Score Analyse unterschieden sich die drei endometriotischen Entitäten untereinander kaum. Im Vergleich zu den eutopen Endometrien jedoch zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von Claudin 1 in allen drei Entitäten. Tabelle 14 stellt diese hochsignifikanten Unterschiede dar.

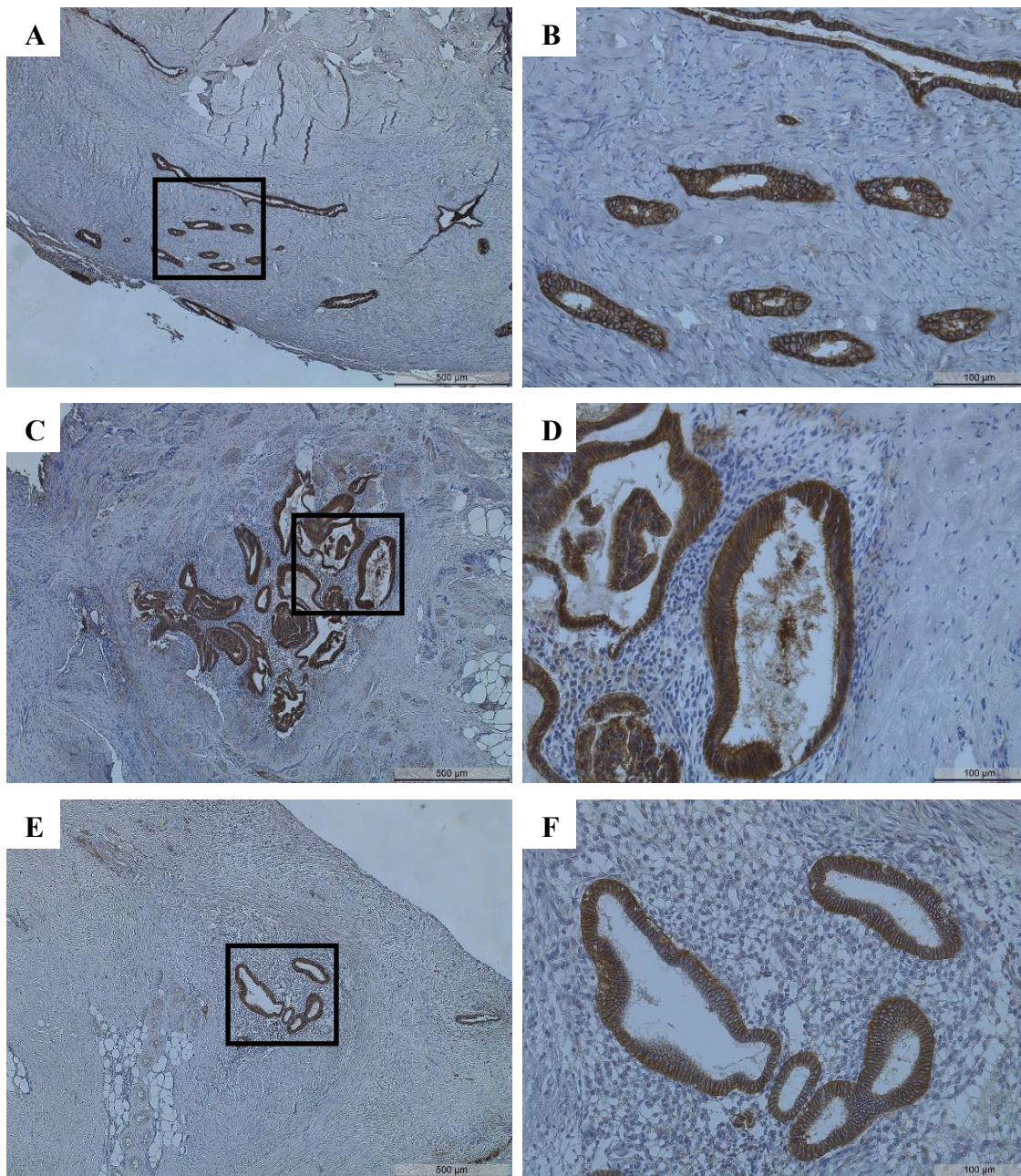


Abbildung 17: Repräsentative Färbungen von Claudin 1 in endometriotischen Läsionen. **A+B:** Diese Ausschnitte zeigen eine ovarielle Endometriose einer 46-jährigen Patientin. **C+D:** Zu erkennen sind Ausschnitte eines rechten Ligamentums sakrouterinum einer 33-jährigen Patientin mit peritonealer Endometriose. Die Bildausschnitte **E+F** zeigen die Läsion einer tief infiltrierende Endometriose in der Blase einer 35-jährigen Patientin. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. Abbildung D ist eine Vergrößerung des in Abbildung C markierten Bereichs. Abbildung F ist eine Vergrößerung des in Abbildung E markierten Bereichs. A+C+E: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B+D+F: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 14: Vergleich der eutopen und ektopen endometrialen Drüsen anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 1

	EM ohne EN (a)	EM mit EN (b)	AM-Pat (c)		OMA (d)	SPE (e)	TIE (f)
			EM	AM			
Alle Proben (n)	23	25	30	38	19	22	23
Alter (MW±SD)	41±8,3	37±7,4	42±0,8	43±0,8	34±7,1	33±5,0	35±6,9
H-Score							
Mittelwert	161	169	181	187	205	217	197
SEM	6,6	8	7,5	7,0	7	9,9	7,9
p-Werte	0,01 ^{a,d} 0,001 ^{a,e} 0,005 ^{a,f}	0,05 ^{b,d} 0,01 ^{b,e}	n.s.	n.s.	0,01 ^{a,d} 0,05 ^{b,d}	0,001 ^{a,e} 0,01 ^{b,e}	0,005 ^{a,f}
%positive Drüsen							
Mittelwert	99,7	100	100	99,2	100	98,6	98,8
SEM	0,18	0	0	0,76	0	1,1	1,09
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: EN = Endometriose, EM = Endometrium, AM = Adenomyose, AM-Pat = Patientinnen mit Adenomyose, OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, TIE = tief infiltrierende Endometriose, n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,d} bedeutet a verglichen mit d

4.2.4 Auffälligkeiten im Expressionsmuster von Claudin 1

Bei der Analyse der Proben hinsichtlich der Claudin 1 Expression konnte in einzelnen Gewebeausschnitten ein abnormes Expressionsmuster beobachtet werden. Dieses Muster zeigte sich sowohl in Endometrien (Abb. 18A), Adenomyosen (Abb. 18B) und extrauterinen Läsionen (Abb. 18C). Es waren einzelne membranös sehr stark angefärbte Zellen in einem eher schwach angefärbten Epithelverbund zu erkennen. Die betroffenen Zellen imponierten mit einer starken Claudin 1-positiven Färbung aller Zellgrenzen und des Zytoplasmas, nicht jedoch des Zellkerns. Das umliegende Stroma zeigte ebenfalls keinerlei Färbung. In den Endometrien war hinsichtlich der Häufung dieser Zellen kein Unterschied zwischen Basalis und Funktionalis zu erfassen.

Die Abbildung 18A zeigt die Claudin 1 Expression im luminalen Epithel des Endometriums einer 36-jährigen Frau ohne Endometriose. In diesem Präparat fiel auf, dass die stark angefärbten Epithelzellen konzentriert im Bereich der Invagination aufzufinden waren. Der Ausschnitt 18B repräsentiert das abnorme Expressionsmuster in der Adenomyose. Zu erkennen ist das Drüsenepithel einer Adenomyoseläsion mit starker Anfärbung der membranösen Zellgrenzen einzelner Epithelzellen. Bei genauer Betrachtung können bei den Epithelzellen mit Kontakt zum Drüsenlumen Kinozilien an den apikalen Zellpolen erkannt werden. Auch in extrauterinen endometriotischen Läsionen, beispielhaft dargestellt in Ausschnitt C, konnte das auffällige Expressionsmuster beobachtet werden. Einzelne Epithelzellen dieser tief infiltrierenden Endometrioseeläsion zeigen eine starke zytoplasmatische und membranöse Expression von Claudin 1, wohingegen ihre Nachbarzellen eine eher schwache Expression dieses Tight Junction Proteins aufweisen. Außerdem ist in Ausschnitt 18C endometriotisches Drüsengewebe im Lumen einer weiteren Drüse zu erkennen. Das angrenzende Stroma erscheint aufgelockert und weist wenige unspezifische Färbereaktionen auf.

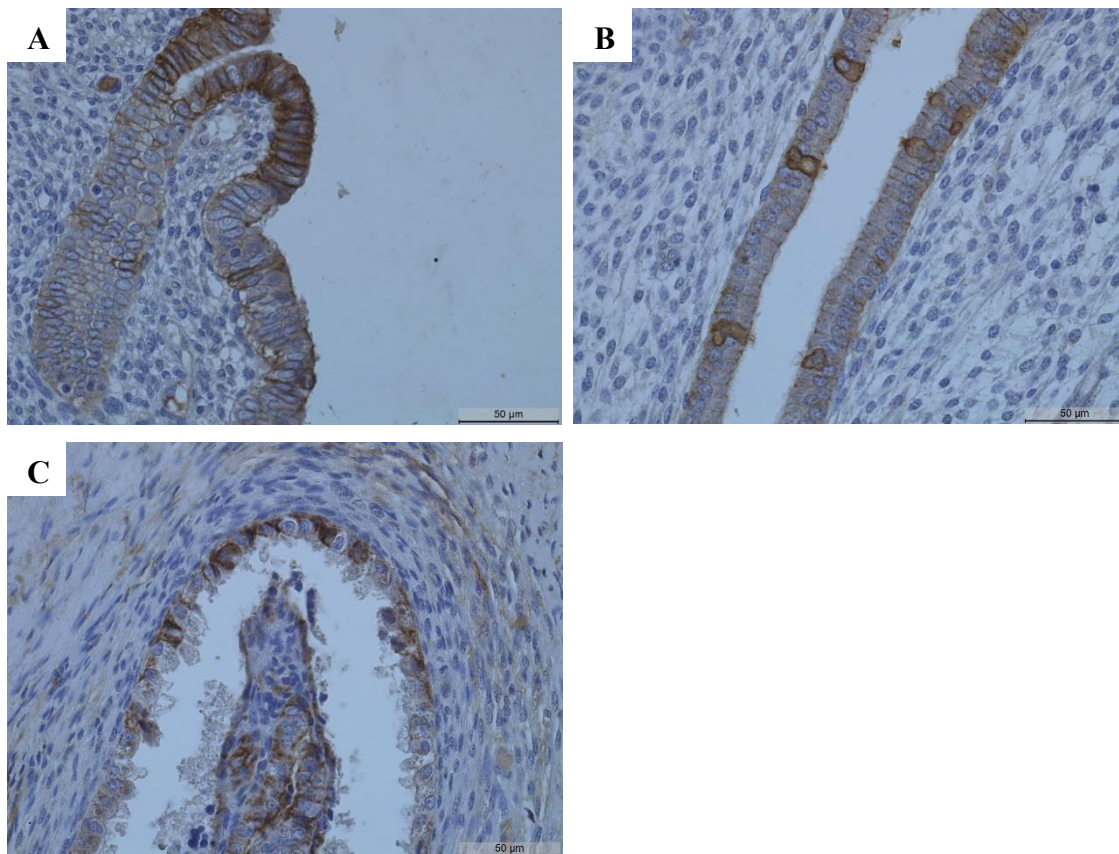


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellungen des abnormen Expressionsmusters von Claudin 1 im Endometrium (**A**), in der Adenomyose (**B**) und in der tief infiltrierenden Endometrioseläsion im Rektum (**C**). A+B+C: Vergrößerung 400-fach, Größenmaßstab 50 µm

4.2.5 Analyse der Co-Lokalisation von Endometrioseläsionen und Nerven

Einzelne Nervenfasern größerer peripherer Nerven sind in Faszikeln zusammengefasst, welche von einer bindegewebigen Hülle, dem Perineurium, umgeben sind. Diese Bindegewebshülle dient unter anderem dem mechanischen Schutz der Nerven und hat die Funktion einer Diffusionsbarriere. Das Perineurium besteht aus mehreren abwechselnden Schichten von Epithelzellen und Kollagenfibrillen und ist innen und außen mit einer Basallamina bedeckt. Wichtig für die Funktion als Diffusionsbarriere ist die Ausstattung der Zellen mit einer hohen Zahl an Tight Junctions (Lüllmann-Rauch, 2009). Bei der Auswertung der immunhistologischen Färbungen mit Claudin 1 fiel auf, dass neben den glandulären und luminalen Epithelzellen die Perineurien angeschnittener Nervenbündel eine deutliche Positivität zeigten (Abb. 19).

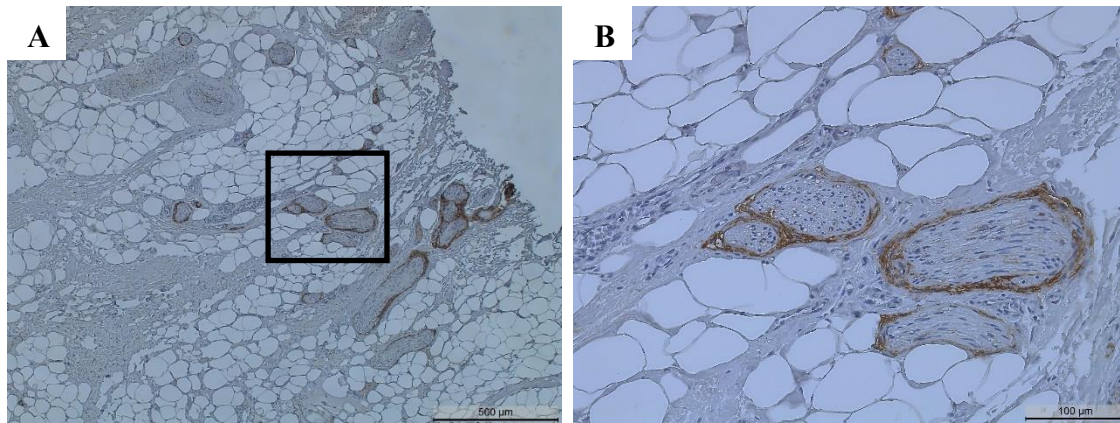


Abbildung 19: Nachweis von Claudin 1 im Spatium rektovaginale einer 38-jährigen Patientin mit mehreren angeschnittenen Nervenbündeln. Zu erkennen ist eine deutliche Anfärbung der Perineurien der Nervenfasern und keine Anfärbung von umliegendem Organstroma, Fettgewebe und Gefäßanschnitten. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Die Anfärbung der Perineurien wurde genutzt um im Folgenden die Co-Lokalisation von extrauterinen Endometrioseläsionen und peripheren Nervenfasern zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde eine Co-Lokalisation angenommen, wenn Läsion und Nerv auf einem 200-fach vergrößerten Gewebeausschnitt gleichzeitig zu erkennen waren. Eine Co-Lokalisation von peritonealer Endometrioseläsion und nervaler Struktur wurde bereits von Mechsner et al. (2007) untersucht und in 74,5% der Proben bestätigt. Im folgenden Abschnitt wird dargestellt, wie die Proben mit extrauterinen Endometrioseläsionen zunächst auf eine solche Co-Lokalisation untersucht und in einem weiteren Schritt auf eine Korrelation von histologischem Befund und Klinik überprüft wurden. Der Periodenschmerz wurde anhand der numerischen Ratingskala ermittelt, bei der 0 Punkte keine und 10 Punkte die stärkste empfundene Schmerzempfindung darstellten. In Abbildung 20 ist die Co-Lokalisation von einer tief infiltrierenden Endometrioseläsion und einer nervalen Struktur grafisch dargestellt. Sie zeigt erneut die deutliche Claudin 1-Positivität des Drüsenepithels und der bindegewebigen Hülle der angeschnittenen zwei Nerven, die im Randbereich des endometriotischen Stromas liegen. In den Gewebeschnitten mit einer tief infiltrierenden Endometriose wurde eine Co-Lokalisation von Läsionen und nervalen Strukturen in 21 von 24 Fällen (87,5%) beobachtet (Tab. 15). Von diesen 21 Frauen mit tief infiltrierender Endometriose und nachgewiesener Co-

Lokalisation von Läsion und Nerv waren von 18 Frauen die Schmerzstärke der Dysmenorrhoe bekannt. Die durchschnittliche Schmerzstärke der Patientinnen lag bei 7,8 Punkten, der Median bei 9,5 (Tab. 15). Nur vier der 18 Frauen gaben eine Schmerzempfindung unter 8 Punkten an. Bei den drei Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose ohne festgestellte Co-Lokalisation waren von zwei Frauen die Periodenschmerzintensität bekannt. Der durchschnittliche Schmerz lag bei 5,5 Punkten (Tab. 15). Der statistische Vergleich dieser beiden Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied (Tab 15).

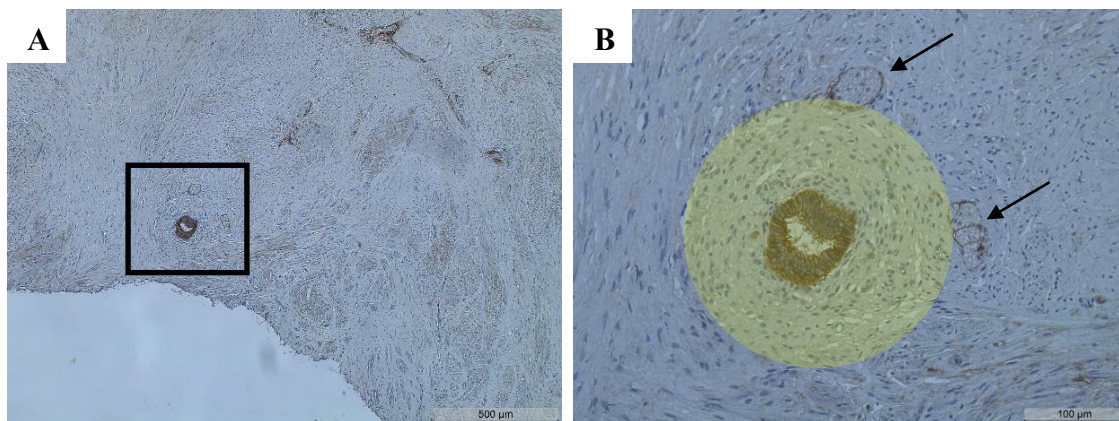


Abbildung 20: Nachweis von Claudin 1 in der tief infiltrierenden Endometriose-Läsion im Rektum einer 37-jährigen Patientin mit Anfärbung der endometriotischen Epithelzellen und der Perineurien angeschnittener Nervenfasern. Die zwei Nervenfasern (schwarze Pfeile) liegen im Randbereich des Stromas der Endometriose-Läsion (gelbe Markierung). Das Stroma und die Gefäßanschnitte stellen sich negativ dar; teilweise sind unspezifische Anfärbungen im Rektumgewebe zu erkennen. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 15: Darstellung der Proben mit tief infiltrierender Endometriose und Co-Lokalisation in Korrelation zum Periodenschmerz

TIE	mit Co-Lok	ohne Co-Lok	Gesamt
Anzahl (n)	21	3	24
Alter (MW±SD)	35±6,9	37±5,7	35±6,7
Schmerzstärke			
Mittelwert	7,8 (18)*	5,5 (2)*	7,6 (20)*
Median	9,5 (18)*	5,5 (2)*	9 (20)*
SEM	0,8	2,5	0,76
p-Werte	n.s.	n.s.	

Abkürzungen: TIE=tief infiltrierende Endometriose, Co-Lok = Co-Lokalisation, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n.s. = nicht signifikant, SEM = Standardfehler, *7,8 (18) = durchschnittliche Schmerzstärke von 18 Frauen

Bei der Analyse der Proben mit peritonealer Endometriose konnte in 16 von 23 (69,6%) Fällen eine Co-Lokalisation, wie sie in Abbildung 21 dargestellt ist, beobachtet werden. Von 13 dieser 16 Frauen war der Periodenschmerz bekannt, welcher durchschnittlich bei 8,5 Punkten und der Median bei 9 Punkten lag (Tab. 16); drei der 13 Frauen gaben Schmerzen unter 8 Punkten an. Bei den fünf Frauen mit peritonealer Endometriose ohne bestätigte Co-Lokalisation und bekanntem Periodenschmerz lag die Schmerzstärke durchschnittlich bei 7,6 und im Median bei 9 Punkten (Tab. 16). Der Tabelle 16 ist zu entnehmen, dass die statistische Analyse der Schmerzstärke keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen ergab.

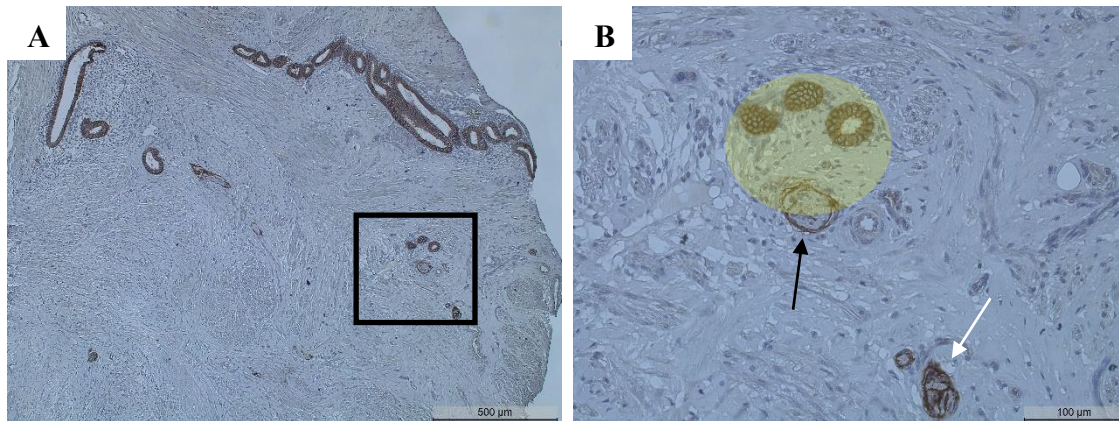


Abbildung 21: Ausschnitt aus dem Blasendach einer Patientin mit peritonealer Endometriose. Zu erkennen ist eine deutliche Positivität des Drüsenepithels und der Perineurien der peripheren Nerven für Claudin 1. Einer der angeschnittenen Nerven (schwarzer Pfeil) liegt in direkter Nähe, im Randbereich des Stromas, zur endometriotischen Läsion (gelbe Markierung). Weitere Claudin 1-positive nervale Strukturen sind im unteren Bildrand von Abbildung B zu erkennen (weißer Pfeil). Das Stroma der Endometrioseläsion und die abgebildeten Gefäßanschnitte sind Claudin 1-negativ. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 16: Darstellung der Proben mit peritonealer Endometriose und Co-Lokalisation in Korrelation zum Periodenschmerz

Perit EN	mit Co-Lok	ohne Co-Lok	Gesamt
Anzahl (n)	16	7	23
Alter (MW±SD)	34±6,1	35±5,4	34±5,8
Schmerzstärke			
Mittelwert	8,5 (13)*	7,6 (5) *	8,2 (18) *
Median	9 (13) *	9 (5) *	9 (18) *
SEM	0,48	1,9	0,6
p-Werte	n.s.	n.s.	

Abkürzungen: Perit EN = peritoneale Endometriose, Co-Lok = Co-Lokalisation, MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler, SD = Standardabweichung, n.s. = nicht signifikant, *8,5 (13) = durchschnittliche Schmerzstärke von 13 Frauen

In den Gewebeschnitten mit ovarieller Endometriose wurden in nur 15,7% der Proben eine Co-Lokalisation von Läsion und Nerv beobachtet. Da die Mehrzahl dieser Patientinnen laut Pathologie- und Operationsberichten neben der ovariellen Endometriose auch an einer peritonealen oder tief infiltrierenden Endometriose erkrankt waren, waren die Angaben bezüglich der Dysmenorrhoe nicht verwertbar.

4.2.6 Zusammenfassung Ergebnisteil Claudin 1

Claudin 1 markierte in allen glandulären Epithelzellen das Zytoplasma und die Zellmembranen, vor allem die lateralen Membranen, als positiv. Das endometriale Stroma und die angeschnittenen Gefäße zeigten keine Färbung für Claudin 1. Es ließen sich keine Zyklusabhängigkeiten bezüglich der Claudin 1 Expression finden. Auch die Endometrien gesunder Frauen und Patientinnen mit Endometriose wiesen hinsichtlich der Proteinexpression von Claudin 1 keine signifikanten Unterschiede auf. In den Adenomyoseläsionen und in den extrauterinen Läsionen war eine Tendenz zur erhöhten Claudin 1 Expression zu erkennen. Nur in den extrauterinen Läsionen zeigte sich dieser Unterschied als statistisch signifikant. Neben der Anfärbung von Epithelzellen war eine deutliche Claudin 1 Positivität der Perineurien der peripheren Nerven zu beobachten. Dies wurde genutzt um in 69,6% der peritonealen und 87,5% der tief infiltrierenden Endometriose-Läsionen eine Co-Lokalisation von peripheren Nerven und Läsionen nachzuweisen.

4.3 Qualitative und quantitative Analyse von Claudin 5

4.3.1 Vergleichsfärbung mit CD31

Claudin 5 ist ein endotheliales Tight Junction Protein, das zusammen mit Cadherin 5 am Aufbau und an der barrierebildenden Funktion von Gefäßen beteiligt ist (Hata et al. 2014). Wohingegen zum Beispiel Cadherin 5, CD31 und CD34 als etablierte Marker für endotheliale Zellen gelten, wurde Claudin 5 nach aktuellem Wissensstand in den Endometrien bisher nicht als solcher verwendet. Um mittels Claudin 5 Aussagen über die Vaskularisierung zu treffen, musste zuvor untersucht werden, ob dieses Protein in allen Endothelien exprimiert wird und somit als Marker hierfür dienen könnte. Es wurden Vergleichsfärbungen mit dem Pan-Endothelmarker CD31 durchgeführt. CD31, auch bekannt als platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), wird in hohen Maßen an den Verbindungsstellen der Endothelzellen exprimiert, wo es eine wichtige Rolle beim Erhalt der Integrität der Endothelzellen und der parazellulären Permeabilität spielt (Lertkiatmongkol 2016). Die Vergleichsfärbungen zeigten, dass alle mit CD31 gefärbten Strukturen auch mit Claudin 5 angefärbt wurden und somit Claudin 5 ein potentieller Marker für Endothelien und damit für die Quantifizierung der Vaskularisierung ist (Abb. 22, 23).

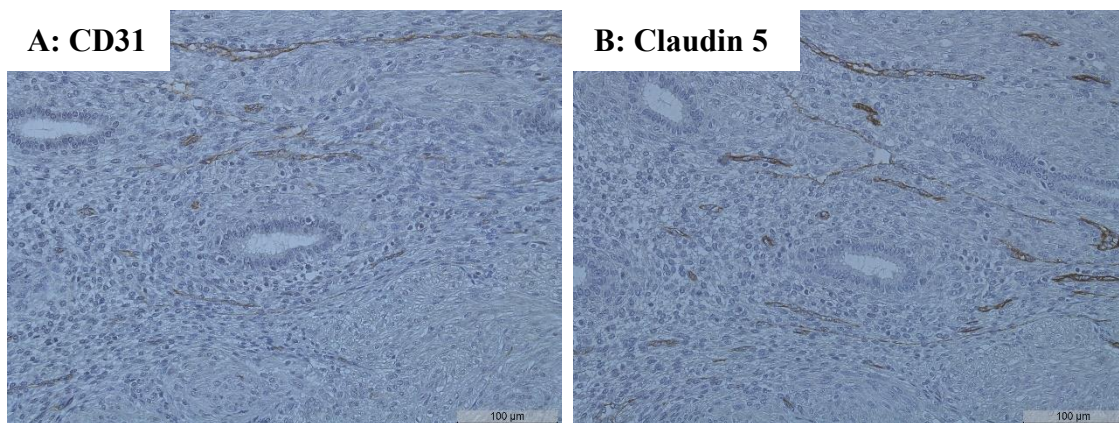


Abbildung 22: Die Abbildungen A und B zeigen denselben Ausschnitt eines sekretorischen Endometriums einer 41-jährigen gesunden Patientin. In beiden Ausschnitten ist eine deutliche Anfärbung aller angeschnittenen Gefäßendothelien zu erkennen. Die endometrialen Drüsen und das Stroma sind negativ. A+B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

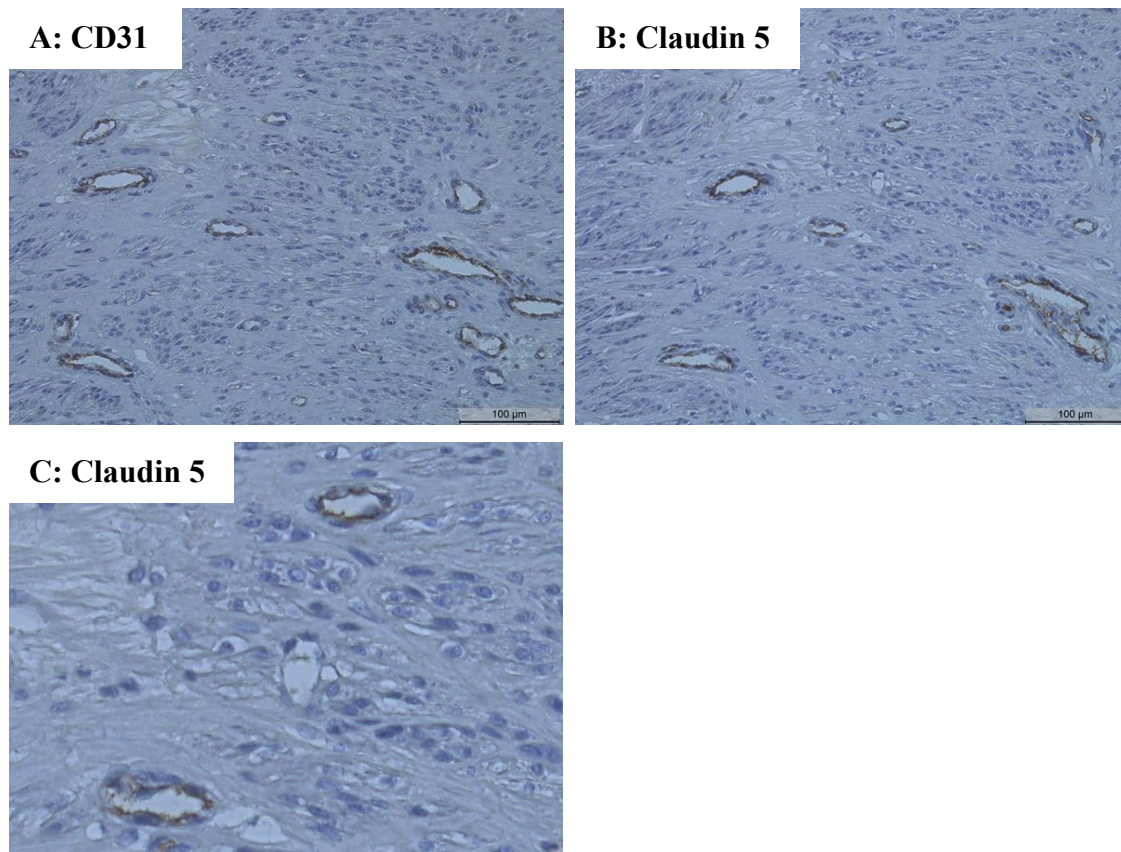


Abbildung 23: Vergleich der Lokalisationen von CD 31 (A) und Claudin 5 (B, C) im selben Myometriumsausschnitt eines Uteruspräparats einer gesunden 30-jährigen Patientin. In beiden Ausschnitten ist eine deutliche Positivität der Gefäßendothelien zu erkennen. Das umliegende Binde- und Muskelgewebe zeigt keine Färbung. A+B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm; C: digitale nachträgliche Vergrößerung mittels Bildbearbeitungssoftware GIMP

4.3.2 Analyse des uterinen Expressionsmusters von Claudin 5

Nachdem nachgewiesen wurde, dass Claudin 5 in allen Gefäßendothelien exprimiert wird und analog zu CD31 als endothelialer Marker betrachtet werden kann, wurden Gewebeproben (Tab. 5,6) mittels Immunhistochemie auf die Expression von Claudin 5 untersucht. Zunächst wurden endometriale Proben von Frauen ohne und mit Endometriose mithilfe des Vaskularisierungsscores unter Berücksichtigung der angefärbten Fläche als auch der Färbeintensität vergleichend analysiert.

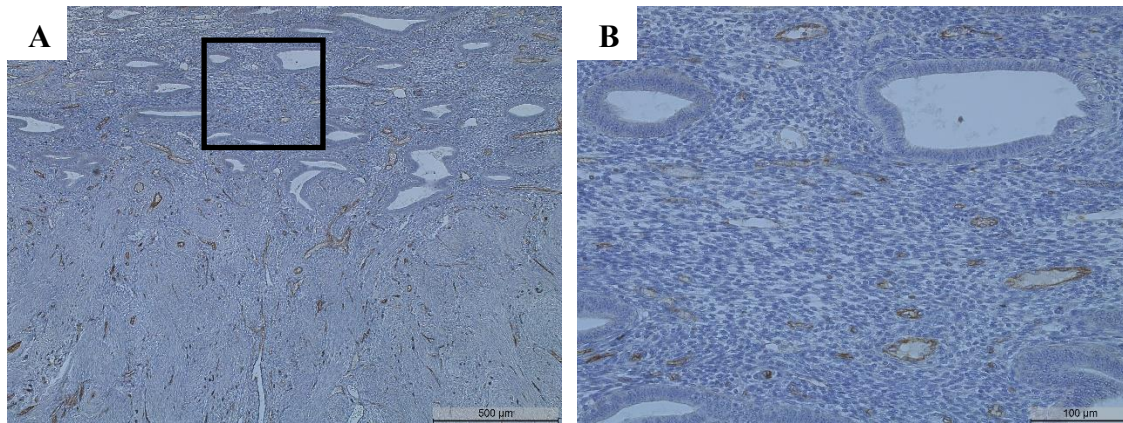


Abbildung 24: Nachweis von Claudin 5 in einem sekretorischen Endometrium einer 42-jährigen Patientin ohne Endometriose. Alle angeschnittenen Gefäßendothelien zeigen eine Positivität für Claudin 5. Das endometriale Stroma, das Drüsenepithel und das angrenzende Myometrium sind Claudin 5-negativ. Der Vaskularisierungsscore dieses Präparats betrug 9,4. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Wie in den repräsentativen Ausschnitten auf den Abbildungen 24 bis 26 zu sehen ist, markierte Claudin 5 alle endothelialen Zellen der Blutgefäße positiv, wohingegen das umliegende Stroma und die Drüsenepithelien keine Färbung zeigten. Tabelle 17 fasst die Ergebnisse des Vergleichs der endometrialen Proben von Frauen ohne und mit Endometriose anhand des Vaskularisierungsscores zusammen. Es wurde hierbei eine hohe Ähnlichkeit und keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Daneben ist der Tabelle 17 zu entnehmen, dass die vergleichende Analyse der proliferativen und sekretorischen Proben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigte.

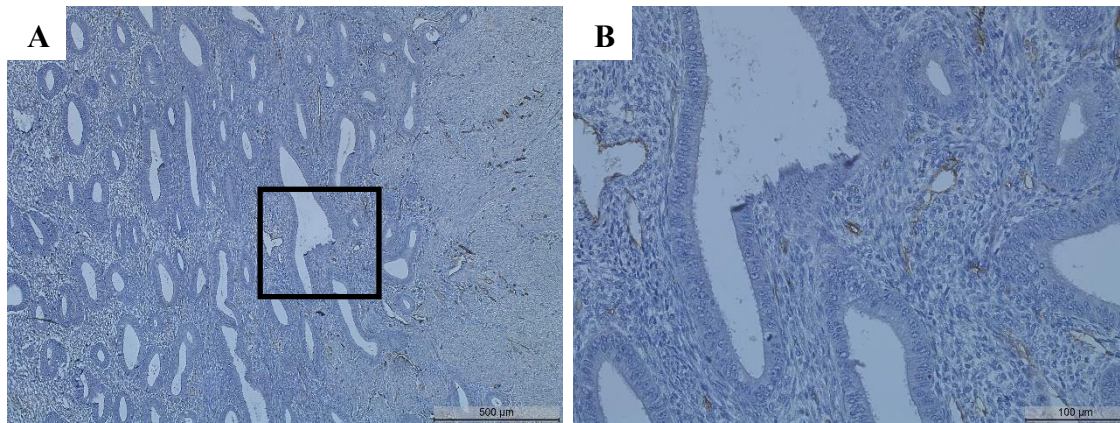


Abbildung 25: Proliferatives Endometrium einer 39-jährigen Patientin mit Endometriose als repräsentatives Beispiel für Präparate mit einem niedrigen Vaskularisierungsscore. Alle Gefäßendothelien zeigen eine Färbung für Claudin 5. Die Drüsenstrukturen, das Stroma und das Myometrium zeigen keine Expression von Claudin 5. Die Dichte der Gefäße ist im Vergleich zu den Abbildungen 3 und 5 niedrig und die Intensität der Färbung schwach. Der Score dieses Präparats lag bei 5,61. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

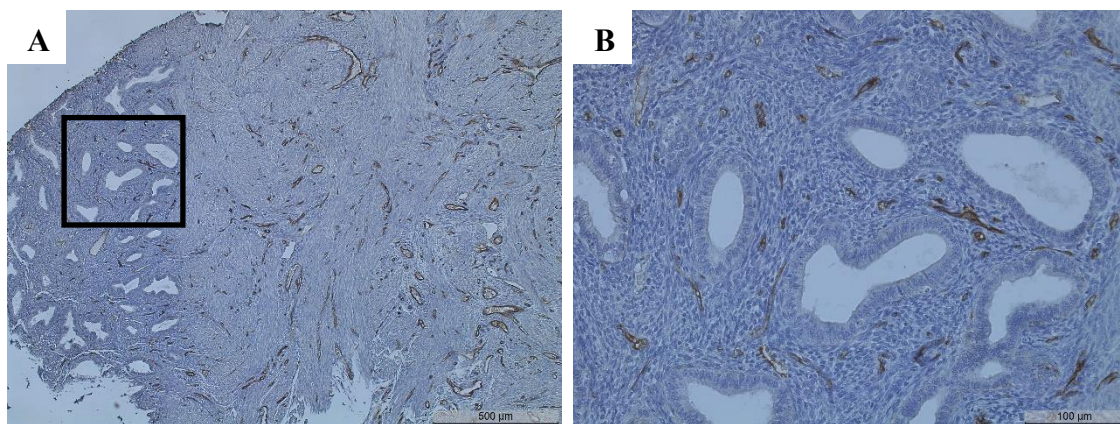


Abbildung 26: Nachweis von Claudin 5 in einem sekretorischen Endometrium einer 34-jährigen Patientin mit Endometriose und einem Vaskularisierungsscore von 10,8. Dieses Präparat weist eine hohe endometriale Gefäßdichte auf. Die Endothelien der Blutgefäße zeigen eine durchgehende starke Färbung für Claudin 5, während das umgebende Stroma und die Drüsenepithelzellen negativ sind. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 17: Vergleich der Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose anhand des Vaskularisierungsscores

	Endometrien ohne Endometriose		Endometrien mit Endometriose	
	Proliferativ	Sekretorisch	Proliferativ	Sekretorisch
Alle Proben (n)	11	8	7	12
Alter (MW±SD)	44 ±8,9	42±4,5	33±4,9	39±7,4
Vaskularisierungsscore				
Mittelwert	10,11	3,66	5,44	8,22
SEM	2,5	0,96	1,7	2,54
p-Werte	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler

Da sich bei der Analyse der endometrialen Proben keine signifikanten Unterschiede ergaben, wurden diese für die weitere Betrachtung zusammengefasst.

4.3.3 Analyse des Expressionsmusters von Claudin 5 in der Adenomyose und in der extrauterinen Endometriose

Im nächsten Schritt erfolgte auf die gleiche Weise die Untersuchung der Proteinexpression von Claudin 5 in den Läsionen der Adenomyose. Auch in den Adenomyoseläsionen zeigte sich eine durchgehende Färbung aller Gefäßendothelien mit Claudin 5. Abbildung 27 präsentiert repräsentative Ausschnitte aus dem Endometrium und der Adenomyose. Zwischen den zwei beispielhaft abgebildeten Ausschnitten war sowohl optisch als auch anhand des Vaskularisierungsscores ein deutlicher Unterschied der Gefäßdichte und der Färbeintensität zu erkennen (Abb.27 B, D). Diese Beobachtung ließ sich als signifikanter Unterschied in der vergleichenden Analyse von Endometrien und Adenomyosen für die Färbung mit Claudin 5 darstellen (Tab. 18).

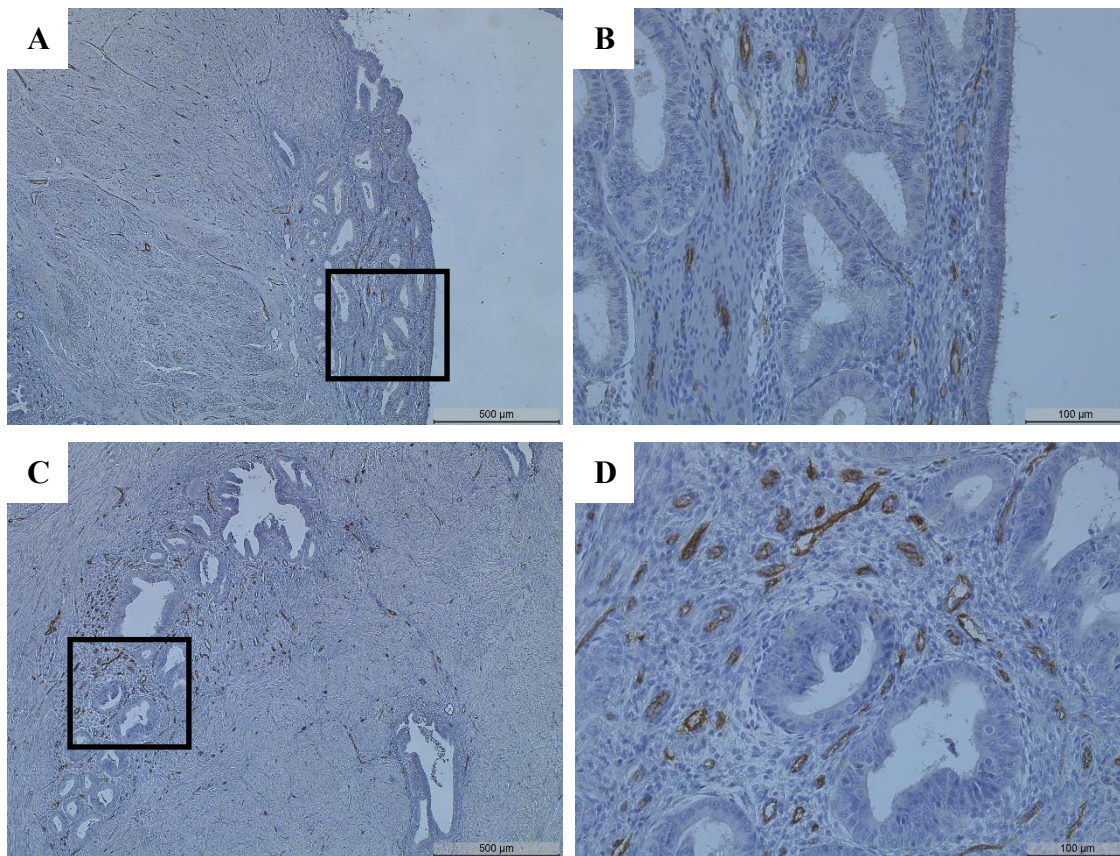


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin 5 in einem Uteruspräparat einer 38-jährigen Patientin mit Adenomyose. Sowohl im Endometrium (A+B) als auch in der Adenomyoseläsion (C+D) zeigen alle Gefäßendothelzellen eine Positivität für Claudin 5. Das Ausmaß der Vaskularisierung und die Intensität der Färbung ist in der Adenomyose (D) gegenüber dem Endometrium (B) deutlich erhöht. Die Analyse ergab für das Endometrium einen Vaskularisierungsscore von 16,04 und für die Adenomyose einen Wert von 65,93. Das Drüsenepithel, das Stroma und das Myometrium stellen sich in allen Ausschnitten negativ dar. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. Abbildung D ist eine Vergrößerung des in Abbildung C markierten Bereichs. A+C: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B+D: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

In einem weiteren Schritt wurde die Vaskularisierung in den extrauterinen Endometrioseläsionen mithilfe des immunhistochemischen Nachweises von Claudin 5 untersucht. Abbildungen 28 bis 30 zeigen repräsentative Ausschnitte aus den drei endometriotischen Entitäten. In allen drei Entitäten präsentierte sich Claudin 5 im bekannten Expressionsmuster, einer selektiven Anfärbung der Endothelzellen aller Gefäße, unabhängig von der Größe. Die Proteinexpression in der ovariellen Endometriose

ähnelte stark der Expression in den Endometrien, wohingegen sich die peritoneale und die tief infiltrierende Endometriose davon signifikant unterschieden. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der vergleichenden Analyse anhand des Vaskularisierungsscores dargestellt. Die Analyse des Vaskularisierungsscores in der peritonealen Endometriose ergab einen ca. 2,4-fach höheren und in der tief infiltrierenden Endometriose einen ca. 2-fach höheren Wert als in den Endometrien (Tab. 18).

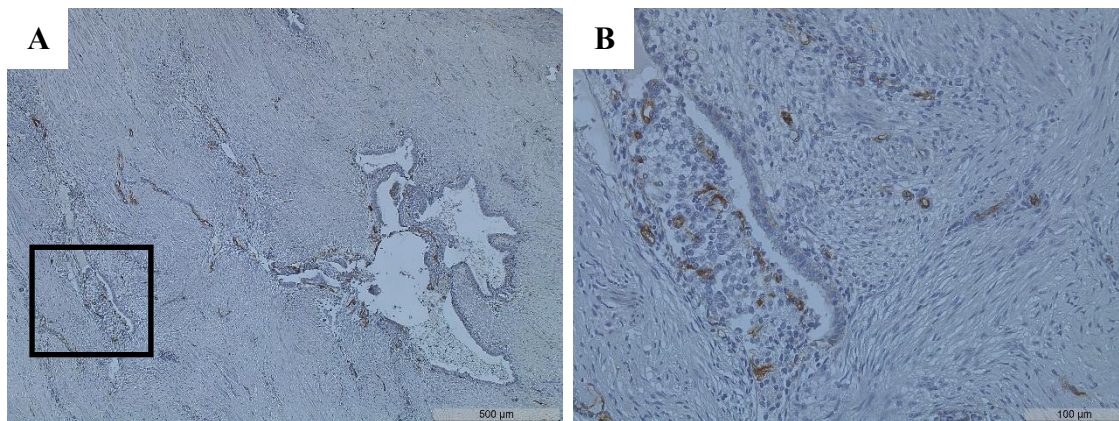


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin 5 in einer peritonealen Endometriose einer 19-jährigen Patientin mit teilweise schlecht erhaltener Drüsenstruktur und stark vaskularisiertem Stroma. Das Gefäßendothel aller abgebildeter Gefäße zeigt eine durchgehende deutliche Färbung für Claudin 5. Die endometrialen Epithel- und Stromazellen und das angrenzende Organgewebe sind frei von Färbung. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

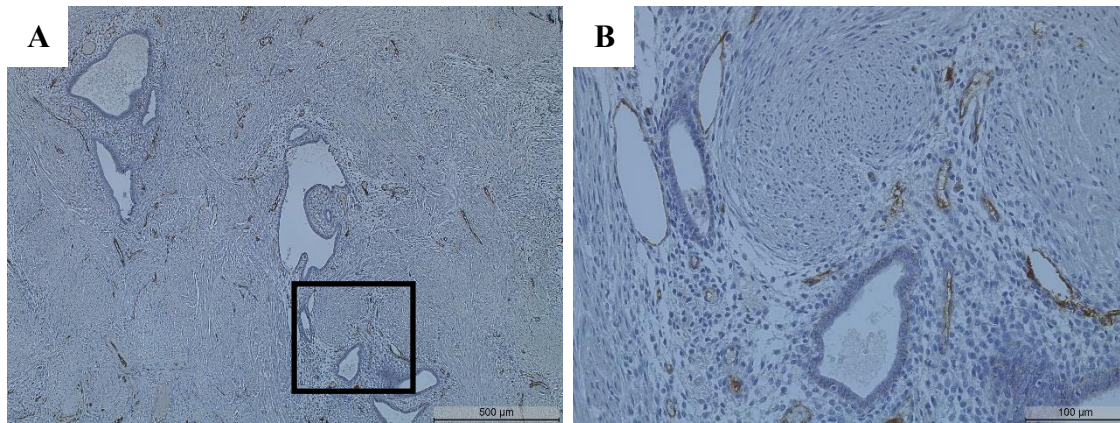


Abbildung 29: Repräsentative Fotografie einer tief infiltrierenden Endometrioseläsion im Rektum einer 31-jährigen Patientin für Claudin 5 und einem Proteinnachweis in allen angeschnittenen Gefäßendothelien. Zu erkennen ist eine hohe Gefäßdichte im Stroma der abgebildeten Endometrioseläsion. Die Drüsenepithelzellen, die Stromazellen und das umliegende Organgewebe weisen keine Positivität auf. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

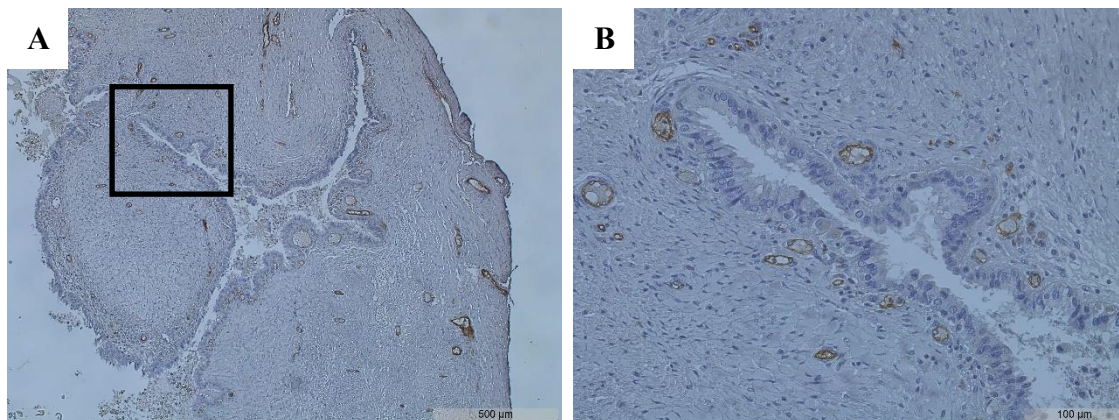


Abbildung 30: Repräsentative Fotografie einer ovariellen Endometriosezyste einer 28-jährigen Patientin mit dem typischen Expressionsmuster von Claudin 5. Das einschichtige Drüsenepithel und das schmale umliegende Stroma sind negativ, wohingegen sich alle Gefäße als Claudin 5-positiv präsentieren. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 18: Vergleich der Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen anhand des Vaskularisierungsscores

	EM (a)	AM (b)	OMA (c)	SPE (d)	TIE (e)
Alle Proben (n)	60	33	10	16 (17)*	17
Alter (MW±SD)	41±6,6	41±4,6	36±7,2	35±6,2	35±6,8
Vaskularisierungsscore					
Mittelwert	8,75	29	9,28	20,74	16,72
SEM	1,07	3,59	2,81	3,67	2,19
p-Werte	0,001 ^{a,b} 0,05 ^{a,e} 0,01 ^{a,d}	0,001 ^{a,b} 0,01 ^{b,c}	0,01 ^{b,c}	0,01 ^{a,d}	0,05 ^{a,e}

Abkürzungen: EM = Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose oder Adenomyose unabhängig von der Zyklusphase, AM = Adenomyose OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, *= 17 Proben von 16 Patientinnen, TIE = tief infiltrierende Endometriose, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,b} bedeutet a verglichen mit b

4.3.4 Analyse des Expressionsmusters von Claudin 5 im Myometrium

Des Weiteren wurde mithilfe des entwickelten Scores die Vaskularisation des Myometriums untersucht. Speziell die Situation des Myometriumgewebes nahe der Adenomyose wurde näher beleuchtet und mit weiter entferntem Myometrium verglichen, um gegebenenfalls mehr über die Ätiologie und die Pathophysiologie der Adenomyose zu erfahren. Wie in Abbildung 31 beispielhaft dargestellt und wie aus Tabelle 19 zu entnehmen ist, ähnelten sich die genannten Myometriumsbereiche in ihrer Vaskularisierung sehr. Es wurden fast identische Werte des Vaskularisierungsscores nachgewiesen und somit kein signifikanter Unterschied festgestellt.

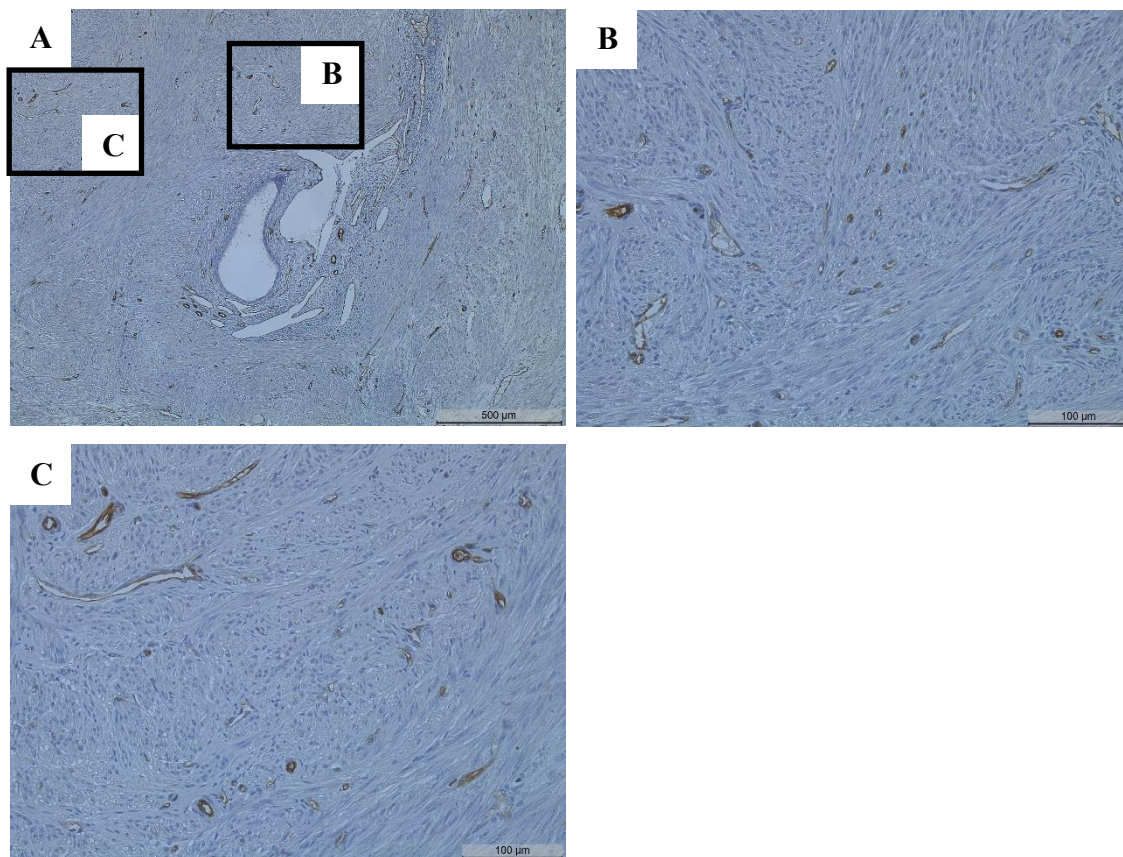


Abbildung 31: Repräsentative Fotografien des typischen Expressionsmusters von Claudin 5 in der Adenomyose einer 48-jährigen Patientin. Alle angeschnittenen Endothelzellen zeigen eine deutliche Färbung für Claudin 5. Das Drüsenepithel, das Stroma, das Bindegewebe und die Muskelzellen sind negativ. Der Ausschnitt B zeigt das vergrößerte Myometrium unmittelbar nahe der Läsion. Die Analyse ergab hierfür einen Vaskularisierungsscore von 7,2. Der Ausschnitt C zeigt vergrößertes Myometriumgewebe in weiterer Umgebung und einen Vaskularisierungsscore von 8,3.

A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B+C: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Außerdem wurde die Vaskularisierung der Endometrien und der Myometrien anhand der Claudin 5-Expression in einer vergleichenden Analyse gegenübergestellt (Abb. 32). Hierbei zeigte sich eine starke Ähnlichkeit der Ergebnisse mit nur einer geringen Schwankungsbreite (Tab. 19).

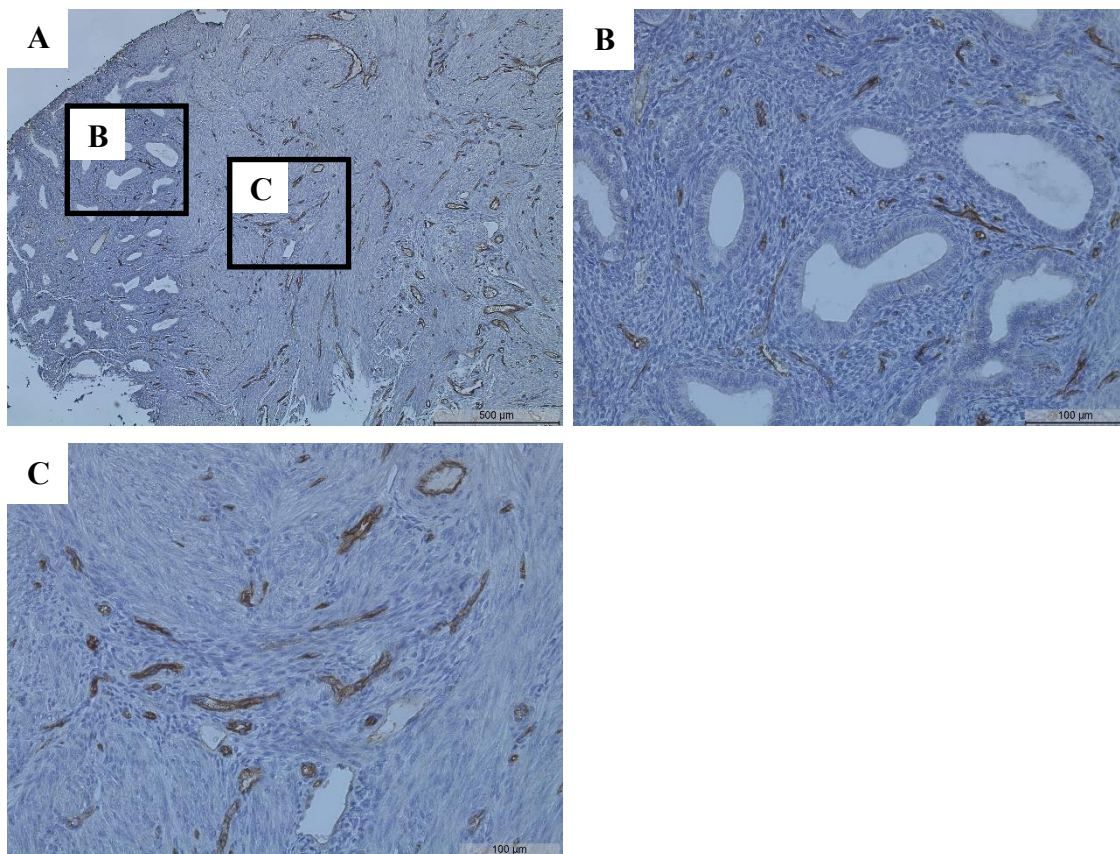


Abbildung 32: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin 5 in einem Uteruspräparat einer 34-jährigen Patientin mit Endometriose. Die Ausschnittsvergrößerung B repräsentiert das Endometrium und die Ausschnittsvergrößerung C das Myometrium. Die Analyse der beiden Ausschnitte ergab für den Vaskularisierungsscore ähnliche Werte. In beiden Ausschnitten ist das spezielle Expressionsmuster von Claudin 5 zu erkennen. Das Endothel kleiner und großer Gefäße zeigt eine durchgehende Färbung, wohingegen Drüsenepithel, Stromazellen und Myometriumgewebe nicht angefärbt sind. A: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 500 µm; B+C: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100 µm

Tabelle 19: Vergleich der Myometrien, Myometriumsausschnitte um die Adenomyose, Endometrien und Adenomyosen anhand des Vaskularisierungsscore

	Myometrium (a)	Myometrium um AM (b)	EM (c)	AM (d)
Alle Proben (n)	57	33	60	33
Alter (MW±SD)	42±6	41±4,6	41±6,6	41±4,6
Vaskularisierungsscore				
Mittelwert	10,62	9,12	8,75	29
SEM	1,07	1,5	1,07	3,59
p-Werte	0,001 ^{a,d}	0,001 ^{b,d}	0,001 ^{c,d}	0,001 ^{a,d} 0,001 ^{b,d} 0,001 ^{c,d}

Abkürzungen: EM = Endometrium, AM = Adenomyose, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,d} bedeutet a verglichen mit d

Wie bereits in Kapitel 5.3.3. beschrieben, zeigte sich die Vaskularisierung in der Adenomyose im Vergleich zu den Endometrien stark erhöht. Auch der Vergleich der Adenomyosen mit den Myometrien ergab signifikante Unterschiede. Für die Adenomyosen wurden gegenüber den Myometrien ca. dreifach höhere Werte für den Vaskularisierungsscore nachgewiesen (Tab. 19).

4.3.5 Vergleich der Claudin 5 Expression in extrauterinen Endometrioseläsionen und ihrer Umgebung

In Kapitel 5.3.3 wurden die Präparate mit extrauterinen Endometrioseläsionen bereits mit eutopen Endometriumpräparaten verglichen. Im Folgenden soll der Vergleich der Claudin 5 Expression zwischen den extrauterinen Endometrioseläsionen und dem gesunden Gewebe der Organe im kleinen Becken aufgezeigt werden. Aus Tabelle 20 wird deutlich, dass die Analyse der Vaskularisierung der Organe des kleinen Beckens, eingeschlossen der Ovarien, eine stabile fast identische Expression von Claudin 5 ergab. Die untersuchten Gewebeproben zeigten alle einen Wert zwischen 5,5 und 6.

Der Vergleich der peritonealen Endometrioseläsionen und dem gesunden umliegenden Gewebe zeigte durch einen ca. 3,5-fach höheren Wert eine signifikante Steigerung der Vaskularisierung in den peritonealen Läsionen auf (Tab. 20).

Ähnlich verhielten sich die Werte des Vaskularisierungsscore beim Vergleich der tief infiltrierenden Endometrioseläsionen und der nicht betroffenen Umgebung. Auch dieser Vergleich erwies sich als statistisch signifikant (Tab. 20).

Bei der ovariellen Endometriose konnte ebenfalls eine deutliche, aber nicht signifikante Erhöhung der Vaskularisierung der Läsionen gegenüber dem gesunden Ovargewebe beobachtet werden. Mit einer höheren Probenanzahl wäre vermutlich eine Signifikanz zu erwarten.

Tabelle 20: Vergleich extrauteriner Endometrioseläsionen und ihrem gesunden umliegenden Gewebe anhand des Vaskularisierungsscores

	OMA (a)	Ov UG (b)	SPE (c)	Perit UG (d)	TIE (e)	TIE UG (f)
Alle Proben (n)	10	11	16(17)*	16(17)*	17	17
Alter (MW±SD)	36±7,2	36±6,9	35±6,2		35±6,8	
Vaskularisierungsscore						
Mittelwert	9,28	5,55	20,74	5,94	16,72	5,56
SEM	2,81	0,66	3,67	0,78	2,19	0,67
p-Werte	n.s.	n.s.	0,0005 ^{c,d}	0,0005 ^{c,d}	0,0002 ^{e,f}	0,0002 ^{e,f}

Abkürzungen: OMA = Ovarialendometriose, Ov UG. = gesundes ovarielles Umgebungsgewebe, SPE = peritoneale Endometriose, Perit UG = gesundes peritoneales Umgebungsgewebe, TIE = tief infiltrierende Endometriose, TIE UG = gesundes Umgebungsgewebe einer tief infiltrierenden Endometrioseläsion, *= 17 Proben von 16 Patientinnen, n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{c,d} bedeutet c verglichen mit d

4.3.6 Aufschlüsselung des Vaskularisierungsscores

In den bereits dargestellten Analysen der immunhistochemischen Färbungen mit Claudin 5 wurde für die Beurteilung der Vaskularisierungsscore verwendet (Kapitel. 4.2.3.). Der Vaskularisierungsscore beinhaltet die Analyse der gefärbten Fläche und der Farbeintensität. Im Folgenden wurden die bereits analysierten Gewebeproben erneut beurteilt und für die beiden Parameter, endotheliale Fläche und Intensität, getrennt analysiert. Dadurch wurde untersucht, welcher der beiden Parameter für die signifikanten Erhöhungen des Vaskularisierungsscore in der Adenomyose und den extrauterinen Endometrioseläsionen ausschlaggebend war (Tab 18).

Analyse der endothelialen Fläche

Der Tabelle 21 ist zu entnehmen, dass sich die angefärbte Fläche in der Adenomyose, der peritonealen Endometriose und in der tief infiltrierenden Endometriose gegenüber den eutopen Endometrien signifikant erhöht zeigte, während die endotheliale Fläche der ovariellen Endometriose nur eine leichte, nicht signifikante Erhöhung aufwies.

Tabelle 21: Vergleich der Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen anhand der angefärbten endothelialen Fläche für Claudin 5

	EM	AM	OMA	SPE	TIE
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Alle Proben (n)	60	33	10	16(17)*	17
Alter (MW±SD)	41±6,6	41±4,6	36±7,2	35±6,2	35±6,8
angefärbte Fläche (pixel²)					
Mittelwert	0,056	0,158	0,092	0,144	0,122
SEM	0,0055	0,0165	0,0299	0,0171	0,0142
p-Werte	0,001 ^{a,b} 0,01 ^{a,c} 0,001 ^{a,d}	0,001 ^{a,b}	n.s.	0,001 ^{a,d}	0,01 ^{a,e}

Abkürzungen: EM = Endometrium, AM = Adenomyose, OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, * = 17 Proben von 16 Patientinnen, TIE = tief

infiltrierende Endometriose, n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,b} bedeutet a verglichen mit b

Analyse der Färbeintensität

Bei der isolierten Betrachtung der Färbeintensität der immunhistochemischen Färbungen mit Claudin 5 konnte in den Adenomyosen eine signifikante Erhöhung gegenüber den eutopen Endometrien beobachtet werden (Tab. 22). Die extrauterinen Läsionen zeigten im Gegensatz dazu keine Zunahme, tendenziell eher eine leichte, nicht signifikante Reduktion der Färbeintensität (Tab. 22).

Tabelle 22: Vergleich der Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen anhand der Färbeintensität für Claudin 5

	EM	AM	OMA	SPE	TIE
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Alle Proben (n)	60	33	10	16(17)*	17
Alter (MW±SD)	41±6,6	41±4,6	36±7,2	35±6,2	35±6,8
Intensität					
Mittelwert	40,85	50,27	26,68	35,11	33,85
SEM	22,22	2,28	5,63	2,668	2,42
p-Werte	0,05 ^{a,b}	0,05 ^{a,b} 0,001 ^{b,c} 0,01 ^{b,e} 0,05 ^{b,d}	0,001 ^{b,c}	0,05 ^{b,d}	0,01 ^{b,e}

Abkürzungen: EM = Endometrium, AM = Adenomyose, OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, *= 17 Proben von 16 Patientinnen, TIE = tief infiltrierende Endometriose, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,b} bedeutet a verglichen mit b

Damit war klar, dass die erhöhten Vaskularisierungsscores in den Adenomyosen und den peritonealen und tief infiltrierenden Endometrioseläsionen überwiegend auf der Zunahme der endothelialen Fläche beruhten. In der Adenomyose trug neben der erhöhten endothelialen Fläche auch der Anstieg der Färbintensität dazu bei.

4.3.7 Morphometrische Analyse der Gefäßfläche

Während der Auswertung der Gewebeproben zur Analyse des Expressionsmusters von Claudin 5 fielen deutliche Unterschiede in der Morphometrie der Gefäße auf. Mithilfe von Image J wurden diese Unterschiede quantifiziert und die durchschnittliche Gefäßfläche der verschiedenen Gewebearten miteinander verglichen. Die Abbildungen 33 und 34 stellen repräsentative Ausschnitte aus den Endometrien und den Läsionen von Patientinnen mit Adenomyose dar und zeigen das spezifische Expressionsmuster von Claudin 5. Auf den Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass die Gefäße im Stroma der Adenomyoseläsionen im Vergleich zu den Gefäßen in den Endometrien deutlich größere Flächeninhalte aufweisen. Mittels Image J konnten, wie im Kapitel 4.2.3. gezeigt, diese Unterschiede quantifiziert werden. Aus Tabelle 23 ist ersichtlich, dass die durchschnittliche Gefäßfläche der Adenomyoseläsionen mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit in einem Intervall zwischen $460 \mu\text{m}^2$ und $645 \mu\text{m}^2$ liegt, wohingegen das 95%-Konfidenzintervall der endometrialen Gefäßflächen durch die Werte $112 \mu\text{m}^2$ und $141 \mu\text{m}^2$ begrenzt wird. Das schmale Konfidenzintervall der Endometrien beruht auf einer großen Anzahl an ausgemessenen Gefäßen und einer geringen Streubreite. Das breite Intervall der Adenomyose ist bei ähnlichem Stichprobenumfang auf eine größere Streuung der Werte zurückzuführen. Die Grenzen der Konfidenzintervalle der extrauterinen Entitäten ähneln den Grenzen des Konfidenzintervalls des Endometriums. Die Breite des Intervalls der ovariellen Endometriose ist auf die geringe Anzahl an ausgemessenen Gefäße zurückzuführen. Der Vergleich der Mittelwerte des morphometrischen Parameters macht deutlich, dass die Gefäße der Adenomyosen mit einer durchschnittlichen Gefäßfläche von $540 \mu\text{m}^2$ etwa 4-fach größer waren als die des Endometriums und sich damit signifikant unterschieden. Die extrauterinen Entitäten hingegen zeigten gegenüber den Endometrien keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gefäßfläche auf.

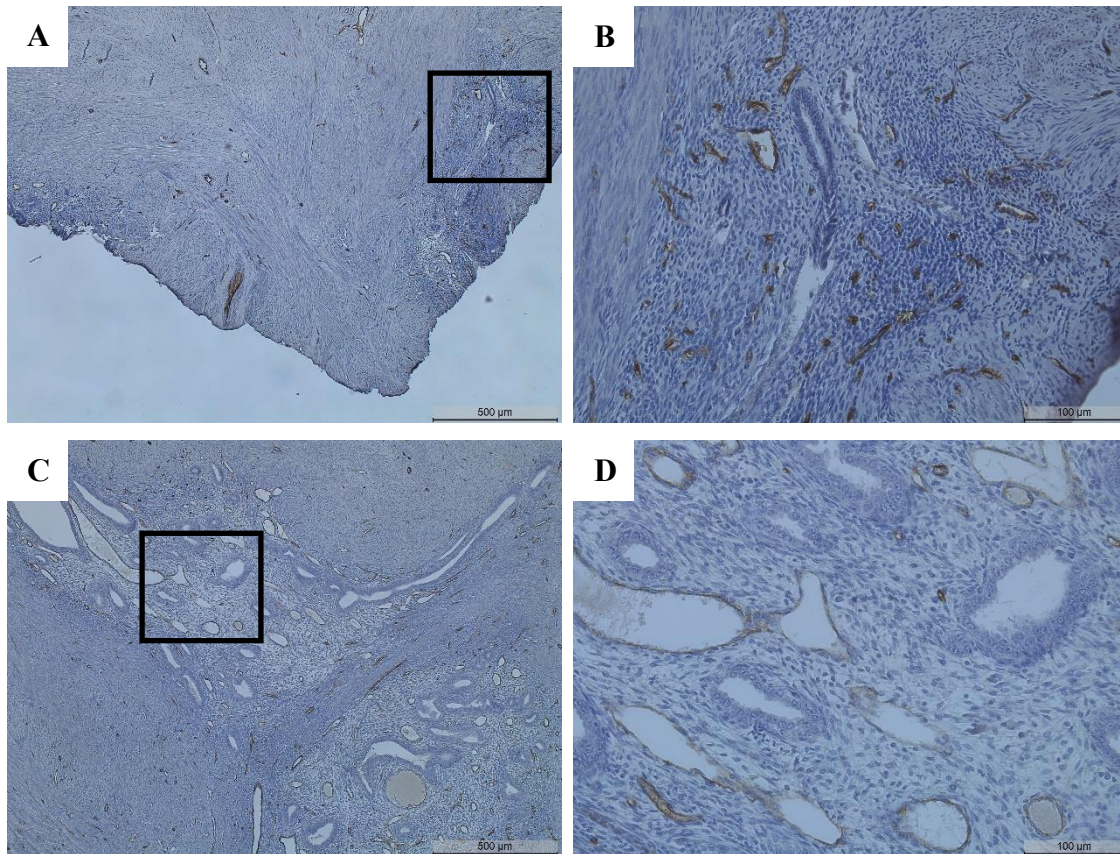


Abbildung 33: Repräsentative Fotografien vom Endometrium (A+B) und der Adenomyose (C+D) einer 44-jährigen Patientin mit dem spezifischen Expressionsmuster von Claudin 5. Die Gefäßendothelien zeigen eine deutliche Positivität für Claudin 5, wohingegen Drüsenepithel und Stroma negativ sind. Die morphometrische Analyse der Gefäße des Endometriums ergab eine durchschnittliche Gefäßfläche von $91 \mu\text{m}^2$; die durchschnittliche Gefäßfläche in der Adenomyose betrug $589 \mu\text{m}^2$ und war damit im Vergleich ungefähr 6,5-fach größer. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. Abbildung D ist eine Vergrößerung des in Abbildung C markierten Bereichs. A+C: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab $500 \mu\text{m}$; B+D: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab $100 \mu\text{m}$

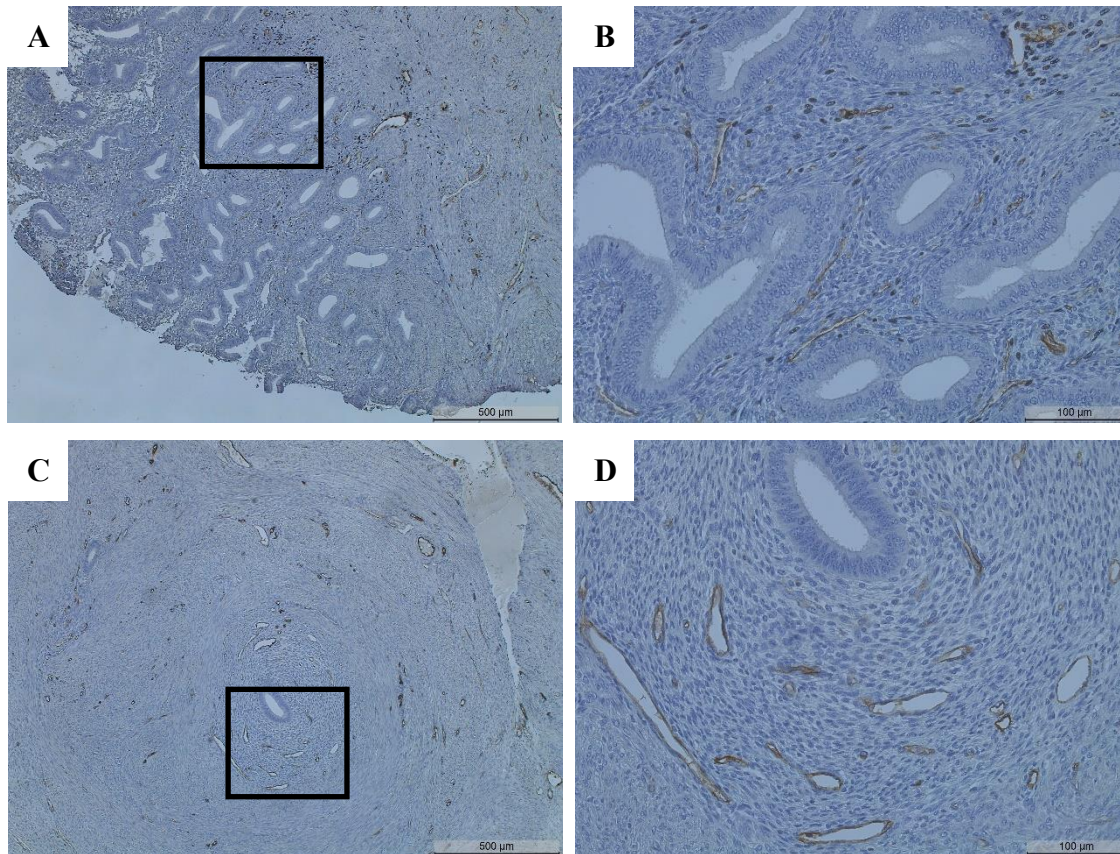


Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin 5 in einem Uteruspräparat einer 39-jährigen Patientin mit diagnostizierter Adenomyose und tief infiltrierender Endometriose. Sowohl im Endometrium (A+B) als auch in der Adenomyoseläsion (C+D) zeigt sich die charakteristische Expression von Claudin 5. Die Flächenanalyse der Gefäße im Stroma der Adenomyoseläsion ergab eine durchschnittliche Gefäßgröße von $374 \mu\text{m}^2$, ein vergleichsweise deutlich höheren Wert als der der Gefäße im Endometrium. Die mittlere Gefäßgröße im Endometrium betrug $219 \mu\text{m}^2$. Abbildung B ist eine Vergrößerung des in Abbildung A markierten Bereichs. Abbildung D ist eine Vergrößerung des in Abbildung C markierten Bereichs. A+C: Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab $500 \mu\text{m}$; B+D: Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab $100 \mu\text{m}$

Tabelle 23: Vergleich der Gefäßfläche in Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen

	EM	AM	OMA	SPE	TIE
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Alle Proben (n)	20	21	9	10	10
Anzahl ausgemessener Gefäße	1134	1094	286	762	607
Alter (MW±SD)	39±8,3	41±8,1	36±7,7	35±4,9	35±6,2
Gefäßfläche (µm²)					
Mittelwert	134	540	133	141	160
SEM	11,32	41,74	19,83	22,98	18,4
95%- Konfidenzintervall	112-141	460-644	92-162	109-143	134-178
p-Werte	0,001 ^{a,b}	0,001 ^{a,b} 0,001 ^{b,c} 0,01 ^{b,e} 0,001 ^{b,d}	0,001 ^{b,c}	0,001 ^{b,d}	0,01 ^{b,e}

Abkürzungen: EM = Endometrium, AM = Adenomyose, OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, TIE = tief infiltrierende Endometriose, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, ^{a,b} bedeutet a verglichen mit b

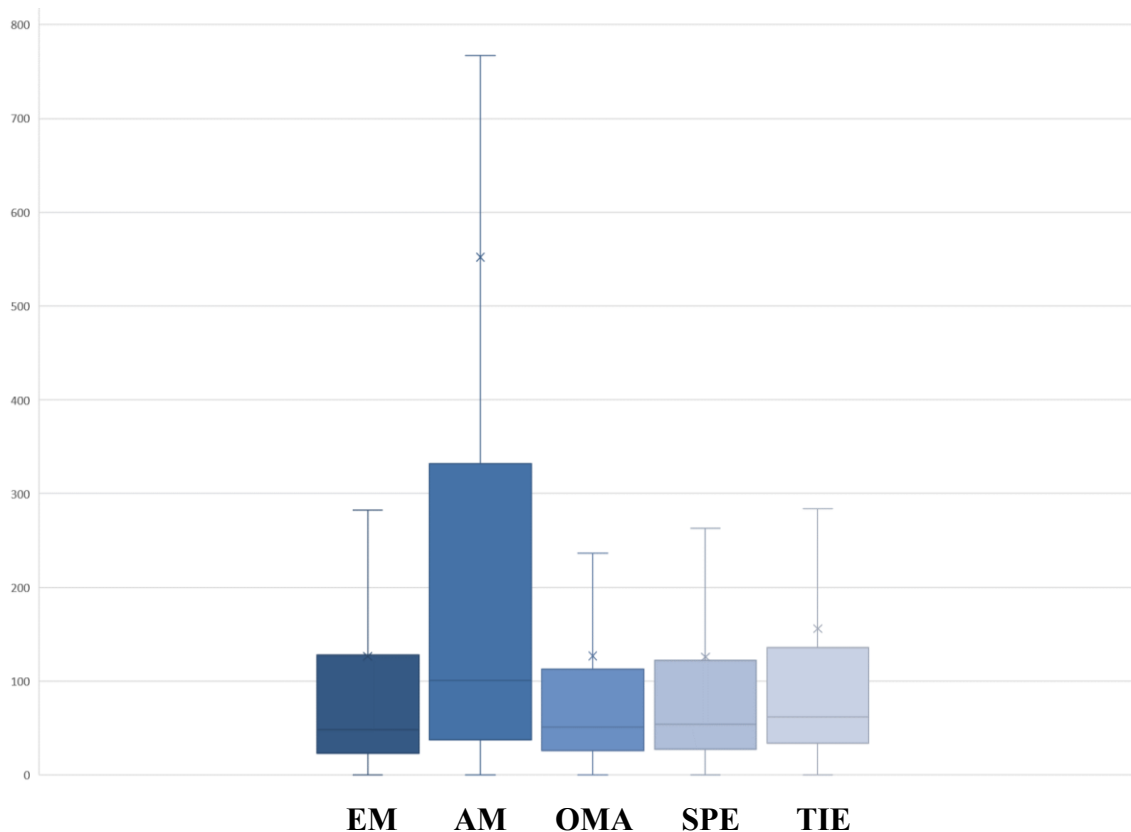


Abbildung 35: Grafische Darstellung der Verteilung der Gefäßflächen der verschiedenen Entitäten. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Entitäten präsentiert, die Y-Achse gibt die Gefäßfläche in μm^2 an.

Abkürzungen: EM = Endometrium, AM = Adenomyose, OMA = Ovarialendometriose, SPE = peritoneale Endometriose, TIE = tief infiltrierende Endometriose

4.3.8 Zusammenfassung Claudin 5

Zusammenfassend lässt sich zu den immunhistochemischen Färbungen mit Claudin 5 sagen, dass sich zwischen den Endometrien gesunder und an Endometriose erkrankter Frauen keine signifikanten Unterschiede darstellen ließen. Ähnlich verhielt es sich mit dem Vergleich der Endometrien der proliferativen und der sekretorischen Phase, die ebenfalls ähnliche Werte zeigten. Die Adenomyosen zeigten gegenüber den Endometrien einen ca. dreifach höheren Vaskularisationsscore. Das Myometrium unmittelbar um die Adenomyoseläsion erwies sich als fast identisch zum restlichen Myometrium.

Des Weiteren war der Vaskularisierungsscore der peritonealen und der tief infiltrierenden Endometrioseläsionen im Vergleich zu den eutopen Endometrien signifikant erhöht.

Auch die Vergleiche der Läsionen mit der nicht betroffenen Umgebung lieferten signifikante Werte und wiesen auf eine erhöhte Vaskularisierung der Läsionen hin.

Die getrennten Analysen von Fläche und Intensität ergaben in den Adenomyoseläsionen sowohl eine Zunahme der Fläche als auch der Intensität, wohingegen es bei den extrauterinen Endometrioseeläsionen lediglich zu einem Anstieg der Fläche kam, aber die Intensität nicht entscheidend zum erhöhten Vaskularisierungsscore beitrug.

Die genauere Betrachtung und Untersuchung der Gefäßgröße in den Endometrien, Adenomyosen und endometriotischen Entitäten zeigte, dass die Gefäße in den Adenomyoseläsionen gegenüber den anderen Gruppen hochsignifikant 4-fach vergrößert waren.

5 Diskussion

5.1 Analyse der Expression von Claudin 10

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Integrität des Zellverbands und die Ausstattung an Zell-Zell-Kontakten in eutopen und ektopen Endometriumzellen zu untersuchen. Es werden Unterschiede im eutopen Endometrium gesunder und erkrankter Frauen beschrieben, die vermuten lassen, dass die ersten Schritte der Entstehung der Endometriose bereits im Endometrium stattfinden (Benagiano et al. 2014). Als möglicher pathophysiologischer Mechanismus wird häufig die epithelial-mesenchymale Transition genannt. Laut De Wever et al. (2008) ist eine Reduktion der epithelialen Zell-Zell-Adhäsionen ein zentraler Vorgang der EMT. Das klassische Tight-Junction Protein Claudin 10 ist ein wichtiger Baustein des epithelialen Zellverbands und damit ermöglicht die Analyse des Expressionsmusters von Claudin 10 uns Aussagen über eine mögliche EMT im Endometrium treffen zu können. Inwieweit Claudin 10 in der Endometriose eine Rolle spielt, wurde bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Forschungsarbeit erfolgt erstmalig eine vergleichende Analyse des Expressionsmusters von Claudin 10 in Epithelzellen des Endometriums gesunder, an Endometriose und an Adenomyose erkrankter Frauen sowie an extrauterinen Läsionen der drei pelvinen Entitäten, peritoneal, ovariell und tief infiltrierend. Durch Vorexperimente konnte für Claudin 10 eine spezifische auf den apikalen Zellpol begrenzte zytoplasmatische und membranöse Anfärbung von Epithel und sehr selten von Stroma, Muskulatur und Gefäßen gefunden werden. Diese Ergebnisse gehen mit den Befunden von Schuhmann et al. (2015) einher, die die Expression von Claudin 10 im luminalen und glandulären Epithel im gesunden Endometrium von Mäusen untersuchten. Dieses spezifische Expressionsmuster von Claudin 10 wurde außerdem bereits in den Epithelzellen der menschlichen Gallengänge (Németh et al. 2009) und im konjunktivalen Epithel beobachtet (Yoshida et al. 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Claudin 10 in nahezu allen eutopen und ektopen endometrialen Epithelzellen exprimiert wird, ausgenommen einer signifikanten Reduktion in den eutopen Endometrienzellen von Frauen, die sowohl an einer Endometriose als auch an einer Adenomyose erkrankt sind. Da diese Beobachtung nur in dieser Gruppe gemacht wurde und in den Endometrien der Frauen, die isoliert an einer Endometriose oder an einer Adenomyose erkrankt sind, nicht zu beobachten war, erscheint ein pathophysiologischer Zusammenhang unwahrscheinlich. Die Signifikanz ergibt sich am ehesten durch die begrenzte Probenanzahl der Frauen mit gleichzeitig

vorliegender Endometriose und Adenomyose. Es zeigen sich in der Analyse der Claudin 10 Expression keine zyklusabhängigen Unterschiede, was bereits von Schuhmann et al. (2015) in Endometrien von Frauen, die eine Hysterektomie aufgrund von benignen Erkrankungen des Uterus erhielten, beschrieben wurde. In beiden Zyklusphasen wurde Claudin 10 im glandulären und lumenalem Epithel des Endometriums nachgewiesen (Schuhmann et al. 2015).

Die vergleichende Analyse der eutopen Endometriumzellen aller Gruppen, sowohl gesunder als auch an Endometriose oder Adenomyose erkrankter Frauen, ergibt eine große Ähnlichkeit. Die vorliegenden Erkenntnisse wurden 2022 von Löffelmann et al. publiziert und bekräftigen die von bereits vielen Autoren beschriebenen Ergebnissen (Horné et al. 2019, Konrad et al. 2019a, Hoerscher et al. 2020). Dennoch gibt es Autoren, die von zellulären, hormonellen und immunologischen Unterschieden in Endometrien gesunder und erkrankter Frauen berichten und postulieren, dass die auslösenden Schritte der Endometriose hier ihren Ursprung haben (Benagiano et al. 2014). Die Frage, ob die beobachteten Unterschiede mit ätiologischen Prozessen oder in erster Linie mit den auftretenden Symptomen zusammenhängen, geschweige denn überhaupt von klinischer Signifikanz sind, bleibt in der genannten Studie ungeklärt. Außerdem wird von Benagiano et al. (2014) darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse nach mehrfachen Wiederholungen der Untersuchungen teilweise nicht reproduzierbar waren und widersprüchliche Ergebnisse ergaben. Zudem können Beeinflussungen durch diagnostische Einschränkungen und eine fehlende Berücksichtigung von zyklusabhängigen Schwankungen nicht ausgeschlossen werden. Vermutlich liegt ein Unterschied in den Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose vor, ohne dass dieser bisher auf zellulärer und molekularer Ebene näher charakterisiert werden kann.

In den extrauterinen Entitäten, speziell in den Läsionen der ovariellen und der tief infiltrierenden Endometriose, ist eine signifikant erhöhte Expression von Claudin 10 zu beobachten. Auch bei der peritonealen Endometriose wäre bei einer größeren Probenanzahl eine Signifikanz zu erwarten. Eine erhöhte Expression von Claudin 10 konnte in verschiedenen Studien, vorwiegend des onkologischen Themenbereichs mit einem erhöhten Invasions- und Migrationspotential assoziiert werden (Németh et al. 2009, Zhou et al. 2018). In hepatozellulären Karzinomen ist die erhöhte Expression von Claudin 10 ein Marker für Progression, Wiederauftreten der Erkrankung (Cheung et al. 2005) und kürzerer Überlebenszeit (Huang et al. 2011). Passend dazu konnte durch die *Down-Regulation* von Claudin 10 in einer invasiven HCC-Zelllinie die Invasivität

deutlich vermindert und das krebsfreie Überleben nach kurativer Therapie verlängert werden (Ip et al. 2007). Die erhöhte Expression von Claudin 10 in den ektopen Läsionen könnte folglich als Ausdruck einer Krankheitsprogression aufgefasst werden. Eine Rolle als potentieller Biomarker wäre denkbar und bietet einen Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die nachgewiesenen Veränderungen der Endometriumzellen nach ektoper Implantation am ehesten durch die veränderte Umgebung zu erklären sind (Koninckx et al. 1999, 2019). Bei oberflächlichen Läsionen kommt es durch den direkten Kontakt mit der Peritonealflüssigkeit zu Einflüssen von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und weiteren inflammatorischen Faktoren (Koninckx et al. 1999). Bei ovariellen Läsionen muss zusätzlich der hormonelle Einfluss in Betracht gezogen werden.

Die aufgezeigte Ähnlichkeit der Proteinexpression von Claudin 10 in den drei verschiedenen Entitäten der extrauterinen Endometriose spricht eher gegen ältere Annahmen, die den drei Entitäten jeweils eigenständige Pathogenesen postulieren (Nisolle & Donnez 1997) und bekräftigt die These eines gemeinsamen Ursprungs (Clement 2007, Konrad et al. 2019, Hoersch et al. 2020). Die Gemeinsamkeiten mit den eutopen Endometriumzellen unterstützen die These, dass das Endometrium die Hauptquelle der extrauterinen Läsionen ist und sprechen folglich für die Implantationstheorie von Simpson (Simpson 1927). Eutope Endometriumzellen wandern im Rahmen der retrograden Menstruation durch die Tuben in die Bauchhöhle, heften sich an extrauterinem Gewebe an, es folgt die Implantation und die Entstehung extrauteriner Läsionen. In einer Arbeit von Shakiba et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass die Wiederholungsrate der Endometriose nach einer Laparoskopie inklusive Hysterektomie im Gegensatz zu Patientinnen bei denen nur eine laparoskopische Entfernung der extrauterinen Endometrioseherde erfolgte deutlich gesenkt werden konnte. Eine weitere Studie, die die Annahme bekräftigt, dass das Endometrium die Hauptquelle für die Endometriose ist, ist die Studie von Rizk et al. (2014). In dieser Studie wird außerdem aufgezeigt, dass es sich bei den Krankheitsrezidiven nach Hysterektomie am ehesten nicht um ein Wiederauftreten der Endometriose sondern um eine Krankheitspersistenz durch unvollständige Entfernung aller Läsionen handelt (Rizk et al. 2014).

Interessanterweise ist bei der qualitativen Analyse der Claudin 10 Proteinexpression eine signifikante Verschiebung der Lokalisation, von der apikal betonten Lokalisation in den Epithelzellen eutoper Endometrien zu einer mehr basalen Lokalisation in den ektopen Endometriumdrüsen zu beobachten. Insbesondere in der ovariellen Endometriose ist

diese Dislokation sehr eindrücklich. Als Bestandteil von Tight Junctions würde man Claudin 10 eher in einer apikolateralen Lokalisation erwarten (Krug et al. 2012), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Expression im eutopen Endometrium den Regelfall darstellt. Eine solche Lokalisationsverschiebung, weg von der zu erwartenden apikolateralen Lokalisation, wurde bereits an anderer Stelle beobachtet. So berichten Okada et al. (2020) von einer zytoplasmatischen Verschiebung von Claudin 2 in endometrioiden Endometriumkarzinomen, Horné et al. (2019) von einem ähnlichen Prozess bei Claudin 11 in der Endometriose und Huang et al. (2011) von einer zytoplasmatischen Verschiebung von Claudin 10 im hepatozellulären Karzinom. Außerdem identifizierten Bongers et al. (2017) eine ähnliche Veränderung in der Tight Junction Formation in der menschlichen Niere, was zur Entstehung einer Tubulopathie führte. Ursächlich für die zytoplasmatische Verschiebung des membranösen Proteins Claudin 10 war hierbei eine Mutation in der vierten transmembranösen Domäne (Bongers et al. 2017). Eine abnorme Proteinlokalisierung kann, wie in diesem Fall, aufgrund einer Mutation in der Signalsequenz entstehen, kann aber auch Veränderungen von Transportproteinen oder posttranslationalen Modifikationen geschuldet sein (Hung & Link 2011). Die Ursachen für die oben beschriebene Verschiebung in Krebszellen oder die in der vorliegenden Arbeit beobachteten veränderten Claudin 10 Lokalisation bleiben unklar. Die entstandene Tubulopathie nach subzellulärer Verschiebung der Claudin 10 Lokalisation (Bongers et al. 2017) lässt vermuten, dass eine Veränderung der Proteinlokalisierung auch funktionelle Auswirkungen auf die Zelle hat. Claudin 10 hat neben der bekannten Funktion als klassisches Tight Junction Protein auch eine Funktion in der Regulation des parazellulären Transports (Breiderhoff et al. 2012). Die epitheliale Barriere und die selektive Permeabilität sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der spezifischen ovariellen Mikroumgebung und damit unerlässlich für erfolgreiche reproduktive Vorgänge (Chan et al. 2007). Calcium ist in den Oozyten eines der wichtigsten Signalmoleküle für die Modulation des Zellzyklus und der Apoptose (Tiwari et al. 2017). Ein moderater Calcium Anstieg vermittelt eine spontane Wiederaufnahme der Meiose (Ferrer-Buitrago et al. 2018), wohingegen ein sehr starker Anstieg von Calcium den meiotischen Zellarest und die Apoptose einleitet (Tiwari et al. 2017). Es ist eine interessante Überlegung, ob die veränderte Lokalisation und die erhöhte Expression von Claudin 10 in der ovariellen Endometriose über eine gestörte Ionenhomöostase zur Unfruchtbarkeit beitragen könnte (Löffelmann et al. 2022).

Eine Stärke der vorliegenden Arbeit liegt in der zusätzlichen Untersuchung von Patientinnen mit Adenomyose. Die vergleichende Analyse der Endometrien gesunder und an Adenomyose erkrankter Patientinnen ergibt, wie bereits angesprochen und von einigen Autoren beschrieben, eine hohe Ähnlichkeit (Dior et al. 2019, Maier et al. 2020, Löffelmann et al. 2022). Gleiches gilt für den Vergleich der Drüsenzellen der Adenomyoseläsionen und den eutopen Epithelzellen. Das fast identische Proteinprofil spricht dafür, dass die adenomyotischen Drüsenzellen ursprünglich dem Endometrium entstammen und bekräftigt hiermit die Invaginationstheorie. Entstehungstheorien, wie die *de novo* Entwicklung aus embryonalen Überresten der Müllerschen Gänge oder aus eingewanderten Stammzellen erfordern die Differenzierung in zwei völlig verschiedene zelluläre Phänotypen, epithelial und stromal. Aufgrund der beschriebenen hohen Ähnlichkeit der adenomyotischen und endometrialen Drüsenzellen erscheint dieser Mechanismus als eher unwahrscheinlich. Ist eine adenomyotische Läsion entstanden, scheinen Invasion und Migration zentrale Prozesse in der Progression der Erkrankung zu sein. Aufgrund nachgewiesener reduzierter E-Cadherin Expression und erhöhter Vimentin und N-Cadherin Expression in Epithelzellen der Adenomyose wird von vielen Autoren auch in der Pathogenese der Adenomyose eine EMT vermuten (Chen et al. 2010, Qi et al. 2015). In Zusammenschau der anerkannten Invaginationstheorie und dem hyperöstrogenen Status der adenomyotischen Läsionen vermutet Chen et al. (2010) eine östrogenabhängige Aktivierung des Prozesses. Alternativ könnte eine durch den TIAR Mechanismus ausgelöste Plättchenaktivierung und – aggregation die EMT induzieren (García-Solares et al. 2018). Die vorliegende Forschungsarbeit ergibt keine Hinweise auf einen Verlust der Zell-Zell Kontakte in den eutopen Endometrien oder in den Läsionen der Patientinnen mit Adenomyose. Der epitheliale Phänotyp der Zellen bleibt erhalten. Folglich sprechen die hiesigen Ergebnisse gegen eine komplette EMT als zentralen Mechanismus der Adenomyoseentstehung.

5.2 Analyse der Expression von Claudin 1

Durch das ubiquitäre Vorkommen kann die fundamentale Rolle von Claudin 1 am Aufbau und Erhalt von Tight Junctions laut Reinhold & Rittner (2017) durch kein anderes Mitglied der Claudin-Familie ersetzt werden. In der vorliegenden Studie erfolgt erstmalig eine umfassende vergleichende Analyse der Expression von Claudin 1 im eutopen

Endometrium gesunder Frauen, an Endometriose oder Adenomyose erkrankter Frauen und extrauterinen pelvinen Läsionen im Ovar, des Peritoneums und anderer Bauchorgane. In den Untersuchungen der eutopen Endometrien gesunder und erkrankter Frauen konnten in keiner der beiden Gruppe zyklusabhängige Unterschiede gezeigt werden. Diese Beobachtung unterstreicht die Befunde von Gaetje et al. (2008). Während mittels Microarray-Untersuchungen für die Claudine 3,4 und 7 eine strenge zyklusabhängige Regulation gezeigt werden konnte, waren für die Claudine 1 und 5 keine Unterschiede während der verschiedenen Phasen des Menstruationszyklus zu finden (Galette et al. 2008). Sobel et al. (2006) hingegen berichteten von einer zyklusabhängigen Regulation von Claudin 1 mit einer erhöhten Expression in der sekretorischen Phase. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz könnte in der geringen Probenanzahl dieser Studie liegen. Zudem beurteilte er die Expression nur mit dem Prozentsatz an positiven Drüsen und nicht wie in der vorliegenden Studie mittels H-Score.

Der Vergleich der Endometrien gesunder und erkrankter Frauen ergibt in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Proteinexpression von Claudin 1 keine signifikanten Unterschiede, was wie bereits im Diskussionsteil von Claudin 10 erörtert, für den Erhalt der Zell-Zell Kontakte spricht.

In den Epithelzellen der endometriotischen und adenomyotischen Läsionen konnte ebenfalls eine starke Expression von Claudin 1 aufgezeigt werden und eine Tendenz zur erhöhten Expression war zu erkennen. Nur in den extrauterinen Läsionen zeigt sich dieser Unterschied als statistisch signifikant, was in Übereinstimmung mit den Befunden von Gaetje et al. (2008) steht, die mittels Microarray-Analyse eine erhöhte Expression von Claudin 1 in peritonealen Läsionen im Vergleich zum eutopen Endometrium aufzeigten. Eine erhöhte Expression von Claudin 1 wurde bei einigen Krebsarten, unter anderem bei Colon-, Pankreas- und Mundhöhlenkarzinomen beobachtet (Dhawan et al. 2005, Tsukahara et al. 2005, Oku et al. 2006). Im Gegensatz dazu wurden auch einige Krebsarten identifiziert, bei denen eine Herunterregulation von Claudin 1 und damit ein Verlust von epithelialer Integrität und Zellpolarität nachgewiesen werden konnte (Higashi et al. 2007, Paschoud et al. 2007, Väre et al. 2008, Seo et al. 2010). Claudin 1 ist eines der am häufigsten deregulierten Claudine bei Krebs und die Funktion als Tumor Promotor oder Suppressor hängt von der Lokalisation und der Art des Karzinoms ab. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass die Übertragung der Ergebnisse aus dem Bereich der Krebsforschung auf die Endometriose einen vorsichtigen und differenzierten Ansatz erfordern. Wir gehen davon aus, dass die erhöhte Expression von Claudin 1 in den

extrauterinen Läsionen nicht von pathogenetischer Relevanz ist. Dennoch bestätigt unsere Beobachtung erneut den Erhalt der Zell-Zell-Kontakte in den extrauterinen Läsionen.

Bei der Auswertung der immunhistologisch gefärbten Präparate ist in einigen Präparaten ein abnormes Färbemuster zu beobachten. Es sind einzelne membranös sehr stark angefärbte Zellen in einem eher schwach angefärbten Epithelverbund zu erkennen (Abbildung 6). Da dieses Färbemuster sowohl in Endometrien, als auch in Adenomyoseläsionen und in ektopen Endometriosläsionen zu beobachten ist, gehen wir davon aus, dass diese Beobachtung keinen pathophysiologischen Bezug zur Endometriose oder zur Adenomyose hat. Vielmehr vermuten wir, dass dieses Färbemuster auf einen weiteren Zelltyp hinweist, der neben den glandulären Epithelzellen die Uterusdrüsen charakterisiert.

Wie bereits erwähnt, spielt Claudin 1 als barrierebildendes Protein in vielen Bereichen des Körpers eine entscheidende Rolle, unter anderem bei der Aufrechterhaltung der Blut-Nerven Schranke (Reinhold & Rittner 2017). Die Funktion von Claudin 1 als einer der wichtigsten perineuralen Zellmarker (Reinhold et al. 2018) nutzten bereits Manole et al. (2015) zur Untersuchung von demyelinisierenden peripheren Neuropathien.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Claudin 1 in Perineurien genutzt, um Co-Lokalisationen von Endometrioseläsion und nervalen Strukturen zu identifizieren und eine mögliche Schmerzkorrelation zu untersuchen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass Mechsner et al. (2007) in ungefähr 75% der Fälle eine direkte Co-Lokalisation von Nervenfasern und peritonealen endometriotischen Läsionen darstellen konnten. Dass die Nähe dieser beiden Strukturen womöglich Auswirkungen auf klinische Beschwerden, vor allem auf die Schmerzen im Becken, die Dysmenorrhoe und die Dyspareunie haben könnte, beschrieben auch andere Autoren (Anaf et al. 2000, Tulandi et al. 2001). In unseren Präparaten sind in 88% der tief infiltrierenden, 70% der peritonealen und 16% der ovariellen Endometrioseläsionen eine Co-Lokalisation von peripheren Nerven und Läsionen nachzuweisen. Der durchschnittliche Periodenschmerz bei den Frauen mit tief infiltrierender Endometriose liegt bei 7,6 Punkten, bei Frauen mit peritonealer Endometriose bei 8,2 und bei den Patientinnen mit ovarieller Endometriose bei 7,2 Punkten. Diese Ergebnisse zeigen folglich, dass Patientinnen mit vermehrten Co-Lokalisationen nicht unbedingt auch einen stärkeren Periodenschmerz empfinden.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei nur zwei der befragten Frauen mit ovarieller Endometriose die Krankheit auf die Ovarien begrenzt war. Bei der Mehrzahl der Frauen liegt neben der ovariellen Endometriose eine

weitere Entität vor. Da die Endometriose eine multifaktorielle Erkrankung ist, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Nähe von Endometrioseläsion und peripherem Nerv ein weiterer Faktor ist, der zur Schmerzbildung beiträgt. Außerdem lassen diese Beobachtungen die Überlegung zu, dass die Dysmenorrhoe primär durch den Uterus selbst bedingt sein könnte, während die extrapelvinen Läsionen für die Auslösung anderer Schmerzarten verantwortlich sind. Weiterführende Analysen in Richtung einer möglichen Korrelation mit Angaben zur Dyspareunie, Dysurie und Dyschezie wären von Interesse gewesen um gegebenenfalls läsionsinduzierte Schmerzphänomene genauer zu identifizieren. Diese konnten jedoch an dieser Stelle aufgrund von unzureichenden Daten nicht durchgeführt werden.

5.3 Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf eine Epithelial-mesenchymale Transition
Zusammenfassend kann ein Verlust an Zell-Zell-Kontakten und damit ein möglicher Verlust des epithelialen Phänotyps in unseren Experimenten mit Claudin 1 und 10 sowohl in der Endometriose als auch in der Adenomyose nicht beobachtet werden. In der Übersichtsarbeit von Konrad et al. (2020) wurden Studien, die weitere epitheliale Marker, unter anderem E-Cadherin in den eutopen Endometrien erkrankter und gesunder Frauen untersuchten, verglichen. In sechs von acht Studien konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. In den Vergleichen mit endometriotischen Läsionen fiel hingegen eine reduzierte Expression von E-Cadherin auf. In Übereinstimmung mit dem Konzept der EMT wurde in der überwiegenden Mehrheit der Studien zusätzlich ein inverser Anstieg der mesenchymalen Marker in den ektopen Läsionen beobachtet. Entscheidend ist die Beobachtung, dass in den genannten Studien die Veränderungen der epithelialen und mesenchymalen Markern vorwiegend nach der Implantation in ektopes Gewebe stattfinden und folglich die epithelial-mesenchymale Transition nicht der auslösende Faktor für die Dissemination der endometrialen Zellen sein kann. In Anbetracht der publizierten Studien, insbesondere der zusammenfassenden Übersichtsarbeit von Konrad et al. (2020) scheint die EMT kein „all-or-nothing process“ zu sein, sondern ein Vorgang mit verschiedenen Zwischenstadien. Durch den Zugewinn mesenchymaler Marker und den jedoch zeitgleich weiterhin bestehenden stabilen Zell-Zell-Kontakten kann unseres Erachtens von einer partiellen EMT in den Endometrioseläsionen gesprochen werden (Konrad et al. 2020). Es erscheint plausibel, dass diese Veränderungen am ehesten durch die Unterschiede in der direkten Umgebung

der extrauterinen Läsionen ausgelöst werden. Verschiedene Aspekte, unter anderem veränderte inflammatorischen Faktoren und epigenetische Ereignisse werden in diesem Zusammenhang diskutiert (Koninckx et al. 2019, Konrad et al. 2020).

5.4 Analyse der Expression von Claudin 5

Neben der retrograden Menstruation scheinen noch weitere Faktoren in der Entstehung der Endometriose eine Rolle zu spielen, da nur ungefähr 10% der Frauen eine symptomatische Endometriose entwickeln (McLaren 2000). Für eine erfolgreiche Adhäsion, die Implantation und das Überleben des versprengten Gewebes ist eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen notwendig. Vor diesem Hintergrund und der häufig genannten Parallele zur Metastasierung bei Tumorerkrankungen vermuten einige Autoren, dass die Angiogenese eine entscheidende Komponente in der Pathophysiologie der Endometriose ist (Groothuis et al. 2005, Laschke & Menger 2007). Es wird beschrieben und angenommen, dass die Vaskularisierung der Läsionen durch das Einwachsen neuer Blutgefäße aus dem umgebenden Gewebe entsteht (Laschke et al. 2011). An diesem Punkt greift die vorliegende Arbeit an und untersucht neben der Vaskularisierung in den Endometrien, den extrauterinen Läsionen und den Adenomyoseläsionen auch die Vaskularisierung in der näheren Umgebung um die extrauterinen Läsionen.

Wir entschieden uns für den Endothelmarker Claudin 5, der nach aktuellem Wissenstand im Gegensatz zu den etablierten Endothelmarkern Cadherin 5, CD31 und CD34 erstmalig in den Endometrien als solcher verwendet wird. Als Hauptkomponente der Tight Junctions in vaskulären Endothelzellen (Hata et al. 2014) ist dieses Protein ein exzellenter immunhistochemischer Endothel-Marker (Escudero-Esparza et al. 2012). In unseren Färbungen zeigt sich eine starke Positivität der Endothelien, nicht jedoch der epithelialen Drüsenzellen, was von den Befunden von Mendoza-Rodríguez et al. (2005) abweicht, die Claudin 5 im Drüsenepithel nachwiesen. Vergleichsfärbungen bestätigen, dass alle durch den weithin anerkannten und häufig genutzten Endothelmarker CD31 angefärbten Gefäße auch eine Positivität für Claudin 5 zeigen. Diese Doppelfärbung wurde bereits von Herr et al. (2012) in peritonealem Gewebe dargestellt. Die immunhistologischen Färbungen mit Claudin 5 ermöglichen neben der Quantifizierung der Vaskularisation im Gegensatz zu CD31 auch eine Beurteilung der Permeabilität der Gefäße aufgrund der barrierebildenden Tight Junction Funktion des Proteins Claudin 5.

Die Untersuchung der Endometrien gesunder und an Endometriose erkrankter Frauen ergibt keinen signifikanten Unterschied in der Vaskularisierung, was die Befunde von Matsuzaki et al. (1998) unterstreicht. Unsere Beobachtungen stehen jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Healy et al. (1998), die dem eutopen Endometrium die Eigenschaft zur verstärkten Proliferation zusprachen.

Der monatliche Zyklus des Endometriums erfordert neben wiederholtem Wachstum neuer Drüsen und Stroma auch die Angiogenese. Die endometriale Vaskularisierung wird unter anderem über den vascular endothelial growth factor (VEGF) kontrolliert, welcher wiederum den zyklisch schwankenden Konzentrationen der ovariellen Hormone unterliegt (Shifren et al. 1996). Dennoch konnten in den meisten Studien bisher keine zyklusabhängigen Veränderungen der Gefäßdichte in den Endometrien beobachtet werden (Schindl et al. 2001, Li et al. 2006, Gaetje et al. 2008). Auch in unseren Untersuchungen sind sowohl in den Endometrien gesunder als auch in den Endometrien erkrankter Frauen keine zyklusabhängigen Unterschiede festzustellen.

Die Analyse der extrauterinen Läsionen ergibt eine signifikant erhöhte Vaskularisierung in den peritonealen und tief infiltrierenden Läsionen im Vergleich zu den eutopen Endometrien. Diese Beobachtung geht einher mit den Ergebnissen von Robin et al. (2016), die in diesen Entitäten ebenfalls eine erhöhte Gefäßdichte darstellten. Auch Machado et al. (2008) und Stratopoulou et al. (2021) beschrieben eine erhöhte Vaskularisierung in den Läsionen der tief infiltrierenden Endometriose. Die Analyse der ovariellen Endometriose ergibt keine signifikanten Werte, was am Ehesten auf die geringe Probenanzahl zurückzuführen ist.

In den umliegenden Gewebearealen der endometriotischen Läsionen ist jedoch keine erhöhte Vaskularisierung darzustellen. Diese Beobachtung spricht gegen die Annahme von Laschke et al. (2011), die von einem Einwachsen der Blutgefäße aus dem Umgebungsgewebe berichten. Nach Sichtung der aktuellen Literatur hat bisher kein Autor eine Gefäßverbindung zwischen der Läsion und dem Umgebungsgewebe darstellen können. Es wäre vorstellbar, dass die Gefäße der Läsion bereits von der Läsion selbst mitgebracht wurden und die verstärkte Vaskularisierung in den Läsionen durch stimulierende Faktoren der Läsion selbst induziert wurde, um das extrauterine Überleben zu sichern. Es scheint plausibel, dass durch die retrograde Menstruation nicht nur epitheliale und stromale Zellen, sondern auch endotheliale Zellen verschleppt werden. Somit sind in Zusammenschau der Befunde unsere Ergebnisse ein weiteres Argument für die Implantationstheorie nach Sampson und sprechen eher gegen die Stammzelltheorie,

denn eine Differenzierung von Stammzellen in drei verschiedene Zelltypen ist schwer vorstellbar. Um die hier aufgeführten Überlegungen zu bestätigen, wären Analysen von Serienschnitten und Untersuchungen mit Endothelmarkern, die nur im Endometrium nachzuweisen sind notwendig. Letztendlich geben die vorliegenden Ergebnisse Hinweise darauf, dass eine ausgeprägte Angiogenese, wie sie zum Beispiel für die Metastasierung bei malignen Erkrankungen erforderlich ist, für das Überleben einer Endometrioseläsion vermutlich nicht notwendig ist. Im Gegensatz zu der überwiegenden Anzahl von Metastasen bleiben Endometrioseläsionen im Vergleich eher klein und präsentieren sich in ihrer Ausdehnung im Verlauf konstant. Die durch die Desquamation mitgebrachte Vaskularisierung der Läsion und der Erweiterung dieser bereits bestehender Gefäße scheint für das Überleben ausreichend zu sein.

Ähnlich zu den extrauterinen Läsionen und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tokyol et al. (2009) und Li et al. (2006) ist in den Adenomyoseläsionen eine signifikant erhöhte Vaskularisierung aufzufinden. Es zeigt sich jedoch erneut, dass das umliegende myometriale Gewebe im Vergleich zum gesunden Myometrium keine erhöhte Vaskularisierung aufweist. Folglich ist es schwer vorstellbar, dass das umliegende Gewebe durch Neoangiogenese die Läsion versorgt. Vielmehr erhalten wir Hinweise darauf, dass die Läsion, sowohl adenomyotischer als auch endometriotischer Natur ihre Vaskularisierung mitbringt.

Die aktuell führende Theorie zur Entstehung der Adenomyose ist die Invaginationstheorie. Durch physiologische Prozesse, wie zum Beispiel der Menstruation kommt es zur verstärkten Uterusperistaltik was Schäden an der junctionalen Zone auslöst. Liegt zusätzlich eine genetische Prädisposition vor oder kommt es zur Traumatisierung der Gebärmutter kann es an der Junctionszone zur Invagination von endometrialen Endometriumzellen in das Myometrium kommen und damit zur Entstehung von ektopen Herden (Leyendecker & Wildt et al. 2009). Durch die ausgelösten lokalen inflammatorischen und hypoxischen Reaktionen kommt es unter anderem über hormonelle Prozesse zur Produktion von VEGF und damit zur erhöhten Vaskularisierung (Goteri et al. 2009). Eine erhöhte Vaskularisierung des eutopen Endometriums von Patientinnen mit Adenomyose ist in unserer Arbeit jedoch nicht zu beobachten. In dem systemischen Review von Harmsen et al. (2019) wurde aufgezeigt, dass es wohl einige Studien gibt, die ähnliche Ergebnisse nachweisen konnten (Schindl et al. 2001, Tokyol et al. 2009), viele Studien jedoch auch eine erhöhte Vaskularisierung der eutopen Endometrien von Patientinnen mit Adenomyose aufzeigen (Li et al. 2006,

Huang et al. 2014, Wang et. al 2016). Ein möglicher Erklärungsversuch dieser diskrepanten Ergebnisse sind die unterschiedlichen Krankheitsstadien, in denen sich die untersuchten Patientinnen befinden. Im Anfangsstadium der Adenomyose kommt es zum Zeitpunkt der Untersuchung zur Invagination von endometrialen Drüsen und Stroma in Richtung des Myometriums. Für diesen aktiven Prozess ist möglicherweise eine erhöhte Vaskularisierung zur Versorgung mit Nährstoffen notwendig. Ist die Invagination in das Myometrium bereits erfolgt, findet im Endometrium kein aktiver Prozess mehr statt und es bedarf keiner gesteigerten Nährstoffversorgung mehr.

Bei der Analyse der Adenomyoseläsionen fällt außerdem auf, dass die Gefäße im Vergleich zu den Gefäßen in den Endometrien und den endometriotischen Läsionen ein größeres Lumen haben. Diese morphometrische Auffälligkeit wurde durch eine computerunterstützte vergleichende Analyse der Gefäßflächen bestätigt. Die Gefäße der Adenomyose sind um ca. das 4-fache größer als die des Endometriums. Die extrauterinen Entitäten hingegen zeigen gegenüber den Endometrien keine signifikanten Unterschiede. Eine Veränderung des Gefäßdurchmessers wurde bereits von Ota et al. (1998) beschrieben, die von einer ca. 4fach vergrößerten mittleren Gefäßoberfläche der endometrialen Gefäße bei Frauen mit Adenomyose verglichen zu der Kontrollgruppe berichten. Oh et al. (2013) berichten von einem verstärkten Vorkommen der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) in den Endometrien und den Myometrien bei Patientinnen mit Adenomyose. Über die dadurch verstärkte Aktivierung der Cyclooxygenase kommt es zur Freisetzung von Prostaglandin E₂, was durch Stimulation der Uteruskontraktion zur Dysmenorrhoe führt (Salvemini et al. 1993, Oh et al. 2013). Neben der thrombozytenhemmenden Wirkung hat Stickstoffmonoxid außerdem einen vasodilatatorischen Effekt. Hierüber ist gegebenenfalls unsere Beobachtung der vergrößerten Gefäßdurchmesser in den Adenomyoseläsionen zu erklären. Der Vergleich der Endometrien von betroffenen Patientinnen mit Adenomyose (n:9, Mittelwert Gefäßfläche:150µm²) und jenen Patientinnen ohne Adenomyose (n:11, Mittelwert Gefäßfläche 120µm²) liefert keine signifikanten Unterschiede, jedoch ist eine minimale Tendenz zur vergrößerten Gefäßfläche in den Endometrien jener Patienten mit Adenomyose zu erkennen, was folglich zu der Beobachtung von Oh et al. (2013) passt.

Wie bereits angesprochen, ermöglicht der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Vaskularisationsscore Aussagen über die Quantität als auch über die Qualität der Gefäße. Nach der Aufschlüsselung des Scores in getrennte Beurteilungen der Fläche und der Farbeintensität zeigt sich, dass sowohl bei der Adenomyose als auch bei den extrauterinen

Läsionen insbesondere die größere Fläche den hohen Vaskularisationsscore bedingt. Eine Veränderung der Färbeintensität und damit der Barrierefunktion der Endothelien im Vergleich zu den eutopen Endometrien und den gesunden Gewebeproben ist nicht zu erkennen. Eine Herunterregulation von Claudin 5 ist assoziiert mit einer erhöhten endothelialen Permeabilität (Herr et al. 2012, Yu et al. 2013). Es wurde vermutet, dass eine verstärkte Angiogenese zu fragilen Gefäßen mit erhöhter Permeabilität führt und damit eine Hypermenorrhoe bedingen könnte (Leyendecker & Wildt et al. 2009, Harmsen et al. 2019). Dies kann durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Wie die dargestellten Ergebnisse und die Einordnung in die passende Literatur gezeigt haben, ist sowohl für die adenomyotischen als auch für die endometriotischen Läsionen eine hohe Vaskularisierung nachweisbar. Diese Erkenntnisse wurden bereits genutzt und antiangiogene Medikamente getestet. Unter anderem wurden VEGF-Blocker und Inhibitoren in Mausmodellen verwendet, die zur Reduktion der Anzahl von endometriotischen Läsionen, zur verringerten Gefäßdichte, zur erhöhten Apoptoserate und zu reduzierten VEGF Spiegeln in der Peritonealflüssigkeit führten (Ricci et al. 2011, Laschke & Menger 2012, Rocha et al. 2013). Ein möglicher Grund warum sich diese Art der Therapie trotz dieser teils vielversprechenden Ergebnisse in den Tiermodellen in der klinischen Anwendung noch nicht durchgesetzt hat, ist, dass die antiangiogene Therapie auch negative Auswirkungen auf die physiologische Angiogenese hat. So können zum Beispiel Prozesse wie der Eisprung und die Wundheilung beeinflusst werden, was negative Auswirkungen auf die Fertilität bei Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter haben kann (Chung & Han 2022).

5.5 Stärken und Limitationen

Bei der hier vorliegenden Dissertation handelt es sich um eine experimentelle Forschungsarbeit, die in Zusammenarbeit mit einem klinisch-wissenschaftlichen Zentrum für Endometriose und Adenomyose erstellt wurde. Dies ermöglichte die Nutzung eines umfassenden Datensatzes, der aufgrund der Anzahl an Proben vergleichende Analysen von Endometrien gesunder und an Endometriose erkrankter Frauen und Proben verschiedener Endometrioseentitäten ermöglicht. Nur so konnte untersucht werden, ob die Ursache für die Endometriose im Endometrium liegt und ob den Entitäten eine gemeinsame oder eine unterschiedliche Pathophysiologie zu Grunde liegt. Hierfür wurden je nach Antikörper 38-48 Endometriumschnitte, 33-38

Adenomyoseschnitte und für die einzelnen Entitäten je 11-28 Gewebeschnitte immunhistologisch gefärbt und analysiert (Tabellen 1-6). Das durchschnittliche Alter der Frauen, deren Endometrien untersucht wurden war sehr ähnlich und reichte von minimal 37 Jahren bei Patientinnen mit Endometriose bis zu maximal 43 Jahren bei Patientinnen mit Adenomyose (Tabellen 1,3,5). Im Gegensatz dazu waren die Patientinnen, deren extrauterine Läsionen analysiert wurden im Schnitt jünger. Das durchschnittliche Alter betrug knapp 35 Jahre (Tabellen 2,4,6). Grund hierfür ist am ehesten, dass die Entfernung der Endometrioseherde oftmals in jüngeren Jahren mit dem Ziel der Schmerzreduktion und dem Erhalt der Fruchtbarkeit durchgeführt wird. Eine Hysterektomie wird bei Frauen mit Endometriose in der Regel erst dann in Erwägung gezogen, wenn andere medizinische Gründe vorliegen, die Familienplanung abgeschlossen ist oder alternative Behandlungsoptionen erschöpft sind.

Die Endometriumschnitte der Kontrollgruppe stammen von Hysterektomien, die zum Beispiel zur Entfernung von Myomen oder bösartigen Tumoren durchgeführt wurden. Es wurde bei der Auswahl dieser Schnitte explizit darauf geachtet, Gewebeschnitte zu wählen, bei denen keine Anteile der zugrunde liegenden Erkrankung erkennbar waren. Dennoch ist nicht komplett auszuschließen, dass diese Erkrankungen die vorliegende Auswertung der Endometriendrüsen beeinflussen.

Die enge Zusammenarbeit mit der klinischen Praxis, zum Beispiel das Mitwirken in der Endometriose-Sprechstunde, erweiterte das Wissen über das Krankheitsbild der Endometriose und der Adenomyose. Zusammen mit einer umfassenden Literaturrecherche eröffnete sich so die Möglichkeit für eine ganzheitliche und umfassende Analyse. Durch die Literaturrecherche wurde sichergestellt, dass die Ergebnisse dieser Studie in einem breiten Kontext diskutiert und aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse berücksichtigt werden.

Als Limitationen dieser Arbeit muss die Unvollständigkeit des Datensatzes angesprochen werden, insbesondere hinsichtlich der Erfassung der Schmerzdaten der befragten Patientinnen durch das medizinische Personal.

Außerdem ist bezüglich der Auswahl der Proteine zu berücksichtigen, dass Claudine sehr sensitive, jedoch keine spezifischen Endometriumsmarker sind, da sie nicht ausschließlich im Endometrium vorkommen und ihre veränderte Expression nicht einzigartig für Endometriumphathologien sind.

Für die Auswertung der immunhistologisch aufgearbeiteten Gewebeschnitte wurden möglichst objektive und standardisierte Analysemethoden gewählt. Der H-Score ist bei

korrekter Durchführung eine Methode mit hoher Reproduzierbarkeit. Er liefert numerische Ergebnisse, die eine statistische Auswertung ermöglichen. Der H-Score beruht auf der Auszählung der Drüsen eines Präparats und der Beurteilung der Färbeintensität und damit auf der umfassenden Betrachtung eines Präparats. Jedoch lässt er die zelluläre Lokalisation unbeachtet. Deshalb wurde für die Beurteilung der Auffälligkeiten in der zellulären Proteinlokalisierung für Claudin 10 ein Lokalisationsscore entwickelt, angelehnt an Horné et al. (2019).

Für die Beurteilung der Vaskularisierung entwickelten wir den Vaskularisierungsscore. Eine Stärke dieses Scores ist zum einen die allseitige Betrachtung durch Erfassung der Quantität und der Qualität der Gefäße. Für die Analyse wurde das computergestützte Bildanalyzesystem Image 7 genutzt, um hierbei möglichst objektive und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Funktion *Colour Threshold* ermöglichte die Darstellung und Berechnung aller Areale eines begrenzten spezifischen Farbbereichs. Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass es bei vereinzelt Präparaten aufgrund von unzureichender Gewebequalität oder unspezifischen Anfärbungen zur fälschlichen Miterfassung oder zum fälschlichen Verkennen einzelner Areale kam, wodurch die Bildanalyse beeinflusst sein könnte.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Erkenntnisse dieser Doktorarbeit liefern einen Einblick in die komplexe, umfassende und wahrscheinlich multifaktoriell bedingte Pathogenese der Endometriose. Die Untersuchung des epithelialen Charakters von eutopen und ektopen Endometriumzellen anhand von zwei prominenten Bausteinen der Tight Junctions ermöglichte die Bestätigung einer partiellen EMT als pathophysiologischen Mechanismus in der Entstehung der Endometriose und der Adenomyose. Die hohe Ähnlichkeit des endometrialen Ursprunggewebes und der Läsionen ist am ehesten ein Beleg für die Transplantationstheorie nach Sampson und mit der retrograden Menstruation, der anschließenden peritonealen Anheftung und der Implantation plausibel vereinbar. Zudem suggerieren die Beobachtungen, dass keine wesentlichen Zellveränderungen für die Desquamation der endometrialen Zellen notwendig sind und die Zellablösung durch die physiologische Menstruation gegeben ist. Die beschriebenen Zellveränderungen in den Läsionen scheinen erst nach Implantation in das Gewebe zu entstehen und damit am ehesten die Folge der veränderten Umgebung zu sein. Es bleibt in weiteren Experimenten

zu klären, welche Faktoren der Wirtsumgebung hierfür verantwortlich sein könnten. Eine Analyse von Zellen im Zwischenstadium, während der Desquamation und dem retrograden tubaren Transport könnte weitere Hinweise geben. Was ebenfalls für die Entstehungstheorie von Sampson spricht, sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Vaskularisierung. Nach Implantation der Läsionen in ektopem Gewebe ließ sich in der vorliegenden Forschungsarbeit in der näheren Umgebung keine ausgeprägte Angiogenese nachweisen. Dies könnte darauf hinweisen, dass es durch die retrograde Menstruation zur Mitverschleppung von Endothel kommt und dadurch die Versorgung der Läsion gewährleistet wird. Experimente mit Serienschnitten zur Darstellung der angiogenen Architektur können in diesem Fall Klarheit schaffen.

Das Aufdecken der Dislokation von Claudin 10 in extrauterinen Läsionen eröffnet die Möglichkeit funktionelle Auswirkungen dieses Proteins zu erforschen und somit potenzielle therapeutische Ansätze zu identifizieren. Ein weiterer dieser Ansätze ist die ausgeprägte Vaskularisierung in den Läsionen. Es ist von Bedeutung, den Charakter der Gefäße in den Endometrioseläsionen weiter zu untersuchen und angiogene Signalwege zu identifizieren, um eine spezifische Therapie mit wenig potenziellen Nebenwirkungen zu entwickeln.

6 Zusammenfassung

Die Endometriose und die Adenomyose sind zwei häufige gynäkologische Krankheitsbilder, die für die erkrankten Frauen einen hohen Leidensdruck bedeuten. Trotz der erheblichen Einschränkung der Lebensqualität ist die Pathophysiologie dieser zumeist chronischen Erkrankungen weiterhin nicht vollständig erklärt. Diese Arbeit untersucht drei strukturelle Proteine der Claudin-Familie und ihre Expression in der Endometriose und der Adenomyose immunhistologisch. Es erfolgen vergleichende Analysen in eutopen Endometrien gesunder und erkrankter Frauen, extrauterinen Läsionen des Ovars und des Peritoneums, der tief infiltrierenden Endometriose und in Läsionen der Adenomyose anhand des Prozentsatzes an positiven Drüsenzellen und des H-Scores. Zum einen werden mit Claudin 1 und 10 Proteine analysiert, die eine wichtige Rolle im Erhalt der Zell-Zell Adhäsion und der Integrität des Zellverbands spielen. Es kann der Erhalt des epithelialen Charakters sowohl in den Endometrien erkrankter Frauen als auch nach Implantation in ektopes Gewebe gezeigt werden. Somit kann die These einer kompletten Epithelialen-Mesenchymalen-Transition als ursächlicher Mechanismus für die Abwanderung der eutopen Endometrienzellen nicht bestätigt werden. Während Tumorzellen Mechanismen, wie die EMT, benötigen um aus Zellverbänden auszubrechen, erleichtert die physiologische monatliche Menstruation das Ablösen der endometrialen Zellen. In Zusammenschau der bereits publizierten Studien über den inkompletten Verlust von epithelialen Markern und dem Zugewinn an mesenchymalen Markern kann von einer partiellen EMT ohne Verlust der Zell-Zell-Kontakte in den ektopen Endometriumzellen ausgegangen werden. Außerdem kann die große Ähnlichkeit des endometrialen Gewebe und der Läsionen als Ausdruck für einen gemeinsamen Ursprung aufgefasst werden, was die Entstehungstheorie nach Sampson unterstreicht. Als weiterer Aspekt dieser Arbeit ermöglicht Claudin 5 eine Analyse der Vaskularisation in der Endometriose und zeigt auf, dass eine ausgeprägte Angiogenese, wie sie für die Tumorgenese charakteristisch ist, in den extrauterinen Geweben für das Überleben der Läsionen nicht notwendig erscheint. Die im Rahmen der retrograden Menstruation verschleppten endometrialen Gefäße scheinen ausreichend zu sein. Des Weiteren werden die Proteine auf ihre Beteiligung an der Symptomentstehung untersucht. Die Lokalisationsverschiebung von Claudin 10 lässt durch eine gestörte Ionenhomöostase eine Beteiligung an der Entstehung der Infertilität erahnen. Durch Claudin 1 werden Co-Lokalisationen von endometrialen Läsionen und peripheren Nerven insbesondere in der tief infiltrierenden und peritonealen Endometriose identifiziert, welche unter anderem den Endometrioseschmerz beeinflussen könnten.

Summary

Endometriosis and adenomyosis are two common gynecological conditions that cause a great deal of suffering for affected women. Despite the significant impairment in quality of life, the pathophysiology of these often chronic diseases remains incompletely understood. This study investigates three structural proteins of the claudin family and their expression in endometriosis and adenomyosis using immunohistochemistry. Comparative analyses are performed in eutopic endometria of healthy and diseased women, extrauterine lesions of the ovary and peritoneum, deep infiltrating endometriosis, and adenomyosis lesions based on the percentage of positive glandular cells and the H-score. Firstly, with claudin 1 and 10, proteins are analyzed that play an important role in maintaining cell-cell adhesion and the integrity of the cell structure. The preservation of the epithelial character of the cells can be shown both in the endometria of diseased women and after implantation in ectopic tissues. Thus, the hypothesis of a complete epithelial-mesenchymal transition as a causative mechanism for the migration of eutopic endometrial cells cannot be confirmed. While tumor cells require mechanisms such as EMT to break out of united cell structures, physiological monthly menstruation facilitates the detachment of endometrial cells. In conjunction with previously published studies on the incomplete loss of epithelial markers and the gain of mesenchymal markers, a partial EMT without loss of cell-cell contacts in the ectopic endometrial cells can be assumed. In addition, the great similarity of the endometrial tissue and the lesions can be interpreted as an expression of a common origin, which underlines the theory of origin according to Sampson. As a further aspect of this work, claudin 5 enables the analysis of the vascularization in endometriosis and shows that pronounced angiogenesis in the extrauterine tissues seems to be not necessary for the survival of the lesions. The endometrial vessels displaced in the context of retrograde menstruation appear to be sufficient. Furthermore, the proteins are investigated for their involvement in the development of symptoms. The subcellular localization shift of claudin 10 suggests involvement in the development of infertility due to a disturbed ion homeostasis. Through claudin 1, co-localizations of endometrial lesion and peripheral nerve are identified, particularly in deep infiltrating and peritoneal endometriosis, which, among other things, might influence endometriosis pain.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AFS	American Fertility Society
AM	Adenomyose
ANOVA	One-Way Analysis of Variance
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BSA	Bovines Serum Albumin
CD31/34	Cluster of Differentiation 31/34
Co-Lok	Co-Lokalisation
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
EFI	Endometriosis Fertility Index
EM	Endometrium
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EN	Endometriose
et al.	et alii (lateinisch), übersetzt „und andere“
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HPA	Human Proteinatlas
HRP	Horseradish Peroxidase
H-Score	Histological Score
igG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
kDA	Kilodalton
LED	Light-emitting Diode
M	Molare Masse
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MVD	Microvessel Density
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OMA	ovarielle Endometriose (ovarian endometrioma)
Ov UG	gesundes ovarielles Umgebungsgewebe
Pat.	Patientinnen
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ-Domäne	PSD95/SAP90, Discs large, Zonula occludens-1 (Akronym aus den genannten Proteinen, in denen eine PDZ-Domäne erstmalig beschrieben wurde)
SPE	peritoneale Endometriose (superficial peritoneal endometriosis)
Perit UG	gesundes peritoneales Umgebungsgewebe
p-Wert	prohabilitas (lateinisch), übersetzt „Wahrscheinlichkeit“
rASRM	Revised Classification of Endometriosis der American Society for Reproductive Medicine
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SEM	Standard error of the mean
Tab.	Tabelle
TIAR	Tissue injury and repair
TIE	tief infiltrierende Endometriose
TIE UG	gesundes Umgebungsgewebe einer tief infiltrierenden Endometrioseläsion
TMN	tumor, node, metastasis
TMVCF	transmembrane protein deleted in velo-cardio-facial-syndrome

VE-Cadherin	vascular endothelial-cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula occludens-1

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:.....	36
Abbildung 2:.....	39
Abbildung 3:.....	42
Abbildung 4:.....	43
Abbildung 5:.....	43
Abbildung 6:.....	44
Abbildung 7:.....	45
Abbildung 8:.....	47
Abbildung 9:.....	50
Abbildung 10:.....	51
Abbildung 11:.....	52
Abbildung 12:.....	55
Abbildung 13:.....	58
Abbildung 14:.....	59
Abbildung 15:.....	59
Abbildung 16:.....	61
Abbildung 17:.....	64
Abbildung 18:.....	67
Abbildung 19:.....	68
Abbildung 20:.....	69
Abbildung 21:.....	71
Abbildung 22:.....	73
Abbildung 23:.....	74
Abbildung 24:.....	75
Abbildung 25:.....	76
Abbildung 26:.....	76
Abbildung 27:.....	78
Abbildung 28:.....	79
Abbildung 29:.....	80
Abbildung 30:.....	80
Abbildung 31:.....	82
Abbildung 32:.....	83
Abbildung 33:.....	89

Abbildung 34:.....	90
Abbildung 35:.....	92
Tabelle 1: Uterine Gewebeproben für Claudin 10	20
Tabelle 2: Extrauterine Gewebeproben für Claudin 10	21
Tabelle 3: Uterine Gewebeproben für Claudin 1	22
Tabelle 4: Extrauterine Gewebeproben für Claudin 1	23
Tabelle 5: Uterine Gewebeproben für Claudin 5	24
Tabelle 6: Extrauterine Gewebeproben für Claudin 5	25
Tabelle 7: Primär- und Sekundärantikörper	26
Tabelle 8: Vergleich der Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 10	46
Tabelle 9: Vergleich der Endometrien und Adenomyosen von Frauen mit und ohne Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 10	49
Tabelle 10: Vergleich der eutopen und ektopen endometrialen Drüsen anhand des H- Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 10.....	53
Tabelle 11: Vergleich der eutopen und ektopen Drüsen anhand des Lokalisationsscores für Claudin 10.....	56
Tabelle 12: Vergleich der Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 1	60
Tabelle 13: Vergleich der Endometrien und der Adenomyosen von Frauen mit Adenomyose und ohne oder mit extrauteriner Endometriose anhand des H-Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 1	62
Tabelle 14: Vergleich der eutopen und ektopen endometrialen Drüsen anhand des H- Scores und des Prozentsatzes an positiven Drüsen für Claudin 1	65
Tabelle 15: Darstellung der Proben mit tief infiltrierender Endometriose und Co- Lokalisation in Korrelation zum Periodenschmerz	70
Tabelle 16: Darstellung der Proben mit peritonealer Endometriose und Co-Lokalisation in Korrelation zum Periodenschmerz	71
Tabelle 17: Vergleich der Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose anhand des Vaskularisierungsscores.....	77

Tabelle 18: Vergleich der Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen anhand des Vaskularisierungsscores.....	81
Tabelle 19: Vergleich der Myometrien, Myometriumsausschnitte um die Adenomyose, Endometrien und Adenomyosen anhand des Vaskularisierungsscore.....	84
Tabelle 20: Vergleich extrauteriner Endometrioseläsionen und ihrem gesunden umliegenden Gewebe anhand des Vaskularisierungsscore.....	85
Tabelle 21: Vergleich der Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen anhand der angefärbten endothelialen Fläche für Claudin 5	86
Tabelle 22: Vergleich der Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen anhand der Färbintensität für Claudin 5.....	87
Tabelle 23: Vergleich der Gefäßfläche in Endometrien, Adenomyosen und extrauterinen Endometrioseläsionen	91

9 Literaturverzeichnis

Adamson G.D., Pasta D.J. (2010), Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system, *Fertility and Sterility*, 94(5):1609–15

Al Moustafa A.E., Alaoui-Jamali M.A., Batist G., Hernandez-Perez M, Serruya C., Alpert L., Black M.J., Sladek R., Foulkes W.D. (2002), Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells, *Oncogene*, 21(17), 2634-40

M.A., Huand Y., Liyanarachchi S., Pellegata N.S., Gimm O., Jhiang S., Davuluri R.V., de la Chapelle A., Eng C. (2004), Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes, *Journal of Clinical Oncology*, 22(17), 3531-9

Amasheh S., Schmidt T., Mahn M., Florian P., Mankertz J., Tavalali S., Gitter A. H., Schulzke J.-D., Fromm M. (2005), Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells, *Cell and Tissue Research*, 321(1), 89-96

Anaf V., Simon P., El Nakadi I., Fayt I., Buxant F., Simonart T., Peny M. O., Noel J. C. (2000), Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules, *Human Reproduction*, 15(8), 1744-50

Audebert A., Petousis S., Margioulas-Siarkou C., Ravanos K., Prapas N., Prapas Y. (2018), Anatomic distribution of endometriosis: A reappraisal based on series of 1101 patients, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 230, 36-40

AWMF S2k-Leitlinie, Diagnostik und Therapie der Endometriose (2020), Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Österreichische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Schweizerische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, AWMF Registernummer: 015/045, Stand August 2020, Version 1.0

Ballard K., Lowton K., Wright J. (2006), What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis, *Fertility and Sterility*, 86(5), 1296-301

Ballard K.D., Seaman H.E., de Vries C.S., Wright J.T. (2008), Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control-study-Part 1, *BJOG*, 115(11), 1382-91

- Bartley J., Jülicher A., Hotz B., Mechsner S., Hotz H. (2013), Epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be regulated differently in endometriosis and the endometrium, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289(4), 871–881
- Batt R.E., Mitwally M.F.M. (2003), Endometriosis from thelarche to midteens: pathogenesis and prognosis, prevention and pedagogy, *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 16(6), 337–47
- Benagiano G., Brosens I., Habiba M. (2014), Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis, *Human Reproduction Update*, 20(3), 386-402
- Bianchi P.H.M., Pereira R.M.A., Zanatta A., Alegretti J.R., Motta E.L.A., Serafini P.C. (2009), Extensive excision of deep infiltrative endometriosis before in vitro fertilization significantly improves pregnancy rates, *Journal of minimally invasive gynecology*, 16, 174-80
- Bonavina G., Taylor H.S. (2022), Endometriosis-associated infertility: From pathophysiology to tailored treatment, *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1020827
- Bongers E.M.H.F., Shelton L.M., Milatz S., Verkaart S., Bech A.P., Schoots J., Cornelissen E.A.M., Bleich M., Hoenderop J.G.J., Wetzels J.F.M., Lugtenberg D., Nijenhuis T. (2017), A novel hypokalemic-alkalotic salt-losing tubulopathy in patients with CLDN10 mutations, *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(10), 3118-28
- Bourdel N., Chauvet P., Billone V., Douridas G., Fauconnier A., Gerbaud L., Canis M. (2019), Systematic review of quality of life measures in patients with endometriosis, *PloS One*, 14(1), e0208464
- Bourgioti C., Preza O., Panourgias E., Chatoupis K., Antoniou A., Nikolaidou M.E., Mouloupoulos L.A. (2017), MR imaging of endometriosis: Spectrum of disease, *Diagnostic and Interventional Imaging*, 98(11), 751-67
- Breiderhoff T., Himmerkus N., Stuiver M., Mutig K., Will C., Meij I. C., Bachmann S., Bleich M., Willnow T. E., Müller D. (2012), Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), 14241-6

Bulun S. E. (2009), Endometriosis, *The New England Journal of Medicine*, 360(3), 268-79

Bulun S.E., Yilmaz B.D., Sison C., Miyazaki K., Bernardi L., Liu S., Kohlmeier A., Yin P., Milad M, Wie J. (2019), Endometriosis, *Endocrine Reviews*, 40(4), 1048-79

Bulut E., Sahin B. (2009), A New Method of Assessing the Size of Mandibular Cysts on Orthopantomograms: Projection Area Fraction, *The Journal of Craniofacial Surgery*, 20(6), 2020-23

Bungum H.F., Vestergaard C., Knudsen U.B. (2014), Endometriosis and type 1 allergies/immediate type hypersensitivity: a systematic review, *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 179, 209-15

Burghaus S., Hildebrandt T., Fahlbusch C., Heusinger K., Antoniadis S., Lermann J., Hackl J., Häberle L., Renner S.P., Fasching P.A., Beckmann M.W., Blum S. (2019), Standards used by a clinical and scientific endometriosis center for the diagnosis and therapy of patients with endometriosis, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 79(5), 487–97

Chan H.C., He Q., Ajonuma L.C., Wang X.F. (2007), Epithelial ion channels in the regulation of female reproductive tract fluid microenvironment: implications in fertility and infertility, *Acta Physiologica Sinica*, 59(4), 495-504

Charpin C., Devicador B., Bergeret D. (1995), CD 31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas – correlation with current prognostic factors, *American Journal of Clinical Pathology*, 103(4), 443-8

Chen L.-C., Hsu L.-W., Huang K.-L., Bai Y.-M., Su T.-P., Li C.-T., Yang A.C., Chang W.-H., Chen T.-J., Tsai S.-J., Chen M.-H. (2016), Risk of developing major depression and anxiety disorders among women with endometriosis: A longitudinal follow-up study, *Journal of Affective Disorders*, 190, 282-5

Chen Y.J., Li H.Y., Hunag C.H., Twu N.F., Yen M.S., Wang P.H., Chou T.Y., Liu Y.N., Chao K.C., Yang M.H. (2010), Oestrogen-induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis, *The Journal of Pathology*, 222(3), 261-70

Cheung S.T., Leung K.L., Ip Y.C., Chen X., Fong D.Y., Ng I.O., Fan S.T., So S. (2005), Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma, *Clinical Cancer Research*, 11(2Pt1), 551-6

Chung M.S., Han S.J., (2022), Endometriosis-associated angiogenesis and anti-angiogenic therapy for endometriosis, *Frontiers in Global Women's Health*, 5:3:856316

Classification of endometriosis. The American Fertility Society (1979), *Fertility and Sterility*, 32(6), 633–4

Clement P.B. (2007), The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects, *Advances in Anatomic Pathology*, 14 (4), 241-60

Collins T. J. (2007), Image J for microscopy, *Biotechniques*, 43(1), 25-30

Condous G., Gerges B., Thomassin-Naggara I., Becker C., Tomassetti C., Krentel H., van Herendael B.J., Malzoni M., Abrao M.S., Saridogan E., Keckstein J., Hudelist G. (2024), Non-invasive imaging techniques for diagnosis of pelvic deep endometriosis and endometriosis classification systems an International Consensus Statement, *Ultrasound in obstetrics and gynecology*, 64(1), 129-144

Coyne C. B., Gambling T. M., Boucher R. C., Carson J. L., Johnson L. G. (2003), Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(5), 1166–78

De Wever O., Pauwels P., De Craene B., Sabbah M., Emami S., Redeuilh G., Gespach C., Bracke M., Berx G. (2008), Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front, *Histochemistry and Cell Biology*, 130 (3), 481-94

Dior U.P., Nisbet D., Fung J.N., Foster G., Healey M., Montgomery G.W., Rogers P.A.W., Holdsworth-Carson S.J., Girling J.E. (2019), The association of sonographic evidence of adenomyosis with severe endometriosis and gene expression in eutopic endometrium, *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 26(5), 941-8

Dhawan P., Sing A.B., Deane N.G., No Y., Shiou S.R., Schmidt C., Neff J., Washington M.K., Beauchamp R.D. (2005), Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1765-76

D'Hooghe T.M., Bambra C.S., Raeymaekers B.M., De Jonge I., Lauweryns J.M., Koninckx P.R. (1995), Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*), *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(1), 125–34

Escudero-Esparza A., Jiang W.G., Martin T.A. (2012), Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1), 43

Ferrer-Buitrago M., Bonte D., De Sutter P., Leybaert L., Heindryckx B. (2018), Single Ca^{2+} transients vs oscillatory Ca^{2+} signaling for assisted oocyte activation: limitations and benefits, *Reproduction*, 155(2), 105-119

Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. (1998), Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1539–50

Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S. (2002), Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice, *The Journal of Cell Biology*, 156(6), 1099-111

Furuya M., Masuda H., Hara K., Uchida H., Sato K., Sato S., Asada H., Maruyama T., Yoshimura Y., Katabuchi H., Tanaka M, Saya H. (2017), ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis, *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 96(9), 1128–35

Gaetje R., Holtrich U., Engels K., Kissler S., Rody A., Karn T., Kaufmann M. (2008), Differential expression of claudins in human endometrium and endometriosis, *Gynecological Endocrinology*, 24(8), 442-9

García-Solares J., Donnez J., Donnez O., Dolmans M.M. (2018), Pathogenesis of uterine adenomyosis: invagination or metaplasia?, *Fertility and Sterility*, 109(3), 371-9

Gargett C.E., Schwab K.E., Brosens J.J., Puttemans P., Benagiano G., Brosens L. (2014), Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis, *Molecular Human Reproduction*, 20(7), 591-8

Ghiasi M., Kulkarni M. T., Missmer S. A. (2020), Is endometriosis more common and more severe than it was 30 years ago?, *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 27(2), 452-61

Giudice L.C., Kao L.K. (2004), Endometriosis, *Lancet*, 364(9447), 1789-99

Gordts S., Grimbizis G., Campo R. (2018), Symptoms and classification of uterine adenomyosis, including the place of hysteroscopy in diagnosis, *Fertility and Sterility*, 109(3), 380-88

Goteri G., Lucarini G., Montik N., Zizzi A., Stramazotti D., Fabris G., Tranquilli A.L., Ciavattini A. (2009), Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible facotr a alpha (HIF-1alpha), and microvessel densitiy in endometrial tissue in women with adenomyosis, *International Journal of Gynecological Pathology*, 28(2), 157-63

Grandi G., Barra F., Ferrero S., Sileo F.G., Bertucci E. (2019), Hormonal contraception in women with endometriosis: a systematic review, *The European journal of contraception & reproductive health care*, 24(1), 61-70

Graziano A., Monte G.L., Piva I., Caserta D., Karner M., Engl B., Marci R. (2015), Diagnostic findings in adenomyosis: a pictorial review on the major concerns, *European Review for Medical and Pahrmacological Sciences*, 19(7), 1146-54

Groothius P.G., Nap A. W., Winterhager E., Grümmer R. (2005), Vascular development in endometriosis, *Angiogenesis*, 8(2), 147-56

Grund S., Grümmer R. (2018), Direct cell-cell-interactions in the endometrium and in endometrial pathophysiology, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2227

Guo S-W. (2006), Sources of heterogeneities in estimating the prevalence of endometriosis in infertile and previously fertile women, *Fertility and Sterility*, 86(6), 1584-95

Guo S.-W. (2020), The pathogenesis of adenomyosis vis-à-vis endometriosis, *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 485

- Haas D., Chvatal R., Reichert B., Renner S., Shebl O., Binder H., Wurm P., Oppelt P. (2012), Endometriosis: a premenopausal disease? Age pattern in 42,079 patients with endometriosis, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 286(3), 667–70
- Haas D., Shebl O., Shamiyeh A., Oppelt P. (2013), The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses, *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 92(1), 3-7
- Habiba M., Benagiano G., Guo S.W. (2023), An appraisal of the tissue injury and repair theory on the pathogenesis of endometriosis and adenomyosis, *Biomolecules*, 13(6), 975
- Hadfield R., Mardon H., Barlow D., Kennedy D. (1996), Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK, *Human Reproduction*, 11(4), 878-80
- Halme J., Hammond M.G., Hulka J.F., Raj S.G., Talbert L.M. (1984), Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis, *Obstetrics and Gynecology*, 64(2), 151-4
- Harder C., Voltolini Velho R., Brandes I., Sehouli J., Mechsner S. (2023), Assessing the true prevalence of endometriosis: A narrative review of literature data, *International Journal of Gynaecology Obstetrics*, 167(3), 883-900
- Harmsen M.J., Wong C.F.C, Mijatovic V., Griffioen A.W., Groenman F., Hehenkamp W.J.K., Huirne J. A.F. (2019), Role of angiogenesis in adenomyosis- associated abnormal uterine bleeding and subfertility: a systemic review, *Human Reproduction Update*, 25(5), 647-71
- Harmsen M.J., Van den Bosch T., De Leeuw R.A., Dueholm M., Exacoustos C., Valentin L., Hehenkamp W.J.K., Groenman F., De Bruyn C., Rasmussen C., Lazzeri L., Jokubkiene L., Jurkovic D., Naftalin J., Tellum T., Bourne T., Timmermann D., Huirne J.A. F. (2022), Consensus on revised definitions of morphological uterus sonographic assessment (MUSA) features of adenomyosis: results of modified Delphi procedure, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 60, 118-131
- Hata M., Yamanegi K., Yamada N., Ohyama H., Yukitatsu Y., Nakasho K., Okamura H., Terada N. (2014), Estrogen decreases the expression of claudin-5 in vascular endothelial cells in the murine uterus, *Endocrine Journal*, 61(7), 705-15

Healy D.L., Rogers R.A., Hii L., Wingfield M. (1998), Angiogenesis: a new theory for endometriosis, *Human Reproduction Update*, 4(5), 736-40

Herr D., Sallmann A., Bekes K., Konrad R., Holzheu I., Kreienberg R., Wulff C. (2012), VEGF induces ascites in ovarian cancer patients via increasing peritoneal permeability by downregulation of Claudin 5, *Gynecologic Oncology*, 127(1) 210-6

Higashi Y., Suzuki S., Sakaguchi T., Nakamura T., Baba s., Reinecker H.C., Nakamura S., Konno H. (2007), Loss of Claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma, *The Journal of Surgical Research*, 139(1), 68-76

Hoersch A., Horné F., Dietze R., Berkes E., Oehmke F., Tinneberg H.R., Meinhold-Heerlein I., Konrad L. (2020), Localization of claudin-2 and claudin-3 in eutopic and ectopic endometrium is highly similar, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 301(4), 1003-11

Horné F., Dietze R., Berkes E., Oehmke F., Tinneberg H.-R., Meinhold-Heerlein I., Konrad L. (2019), Impaired localization of Claudin-11 in endometriotic epithelial cells compared to endometrial cells, *Reproductive Sciences*, 26(9), 1181-92

Horton J., Sterrenburg M., Lane S., Maheshwari A., Li T.C., Cheong Y. (2019), Reproductive, obstetric, and perinatal outcomes of women with adenomyosis and endometriosis: a systematic review and meta-analysis, *Human Reproduction Update*, 25(5), 592–632

Huang G.W., Ding X., Chen S.L., Zeng L. (2011), Expression of claudin 10 protein in hepatocellular carcinoma: impact on survival, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(8), 1213-8

Huang T.S., Chen Y.J., Chou T.Y., Chen C.Y., Li H.Y., Huang B.S., Tsai H.W., Lan H.Y., Chang C.H., Twu N.F (2014), Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(7), 1358-71

Hudelist G., English J., Thomas A. E., Tinelli A., Singer C.F., Keckstein J. (2011), Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound for non-invasive diagnosis of bowel endometriosis: sytematic review and meta-analysis, *Ultrasound in obstetrics and gynecology*, 37(3), 257-63

Hudelist G., Fritzer N., Thomas A., Niehues C., Oppelt P., Haas D., Tammaa A., Salzer H. (2012), Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences, *Human Reproduction*, 27(12), 3412–6

Human Protein Atlas, Knut and Alice Wallenberg Foundation, Version: 21.1, Atlas Update: 31.05.2022, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134873-CLDN10> (zuletzt abgerufen am 23.08.2022, 16:15 Uhr)

Hung M.C., Link W. (2011), Protein localization in disease and therapy, *Journal of Cell Science*, 124(20), 3381-92

Inai T., Sengoku A., Guan X., Hirose E., Iida H., Shibata Y. (2005), Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy, *Archives of Histology and Cytology*, 68(5), 349-60

Inan S., Kuscü N.K., Vatansever S., Ozbilgin K., Koyuncu F., Sayhan S. (2003), Increased vascular surface density in ovarian endometriosis, *Gynecological Endocrinology*, 17(2), 143-50

Ip Y.C., Cheung S.T., Lee Y.T., Ho J.C., Fan, S.T. (2007), Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(11), 2858-67

Kalluri R., Weinberg R.A. (2009), The basics of epithelial-mesenchymal transition, *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-8

Kanda T., Numata Y., Mizusawa H. (2004), Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75(5), 765–9

Kojima S., Rahner C., Peng S., Rizzolo L. J. (2002), Claudin 5 is transiently expressed during the development of the retinal pigment epithelium, *Journal of Membrane Biology*, 186(2), 81-88

Kominsky S.L., Argani P., Korz D., Evron E., Raman V., Garrett E., Rein A., Sauter G., Kallioniemi O.P., Sukumar S. (2003), Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast, *Oncogene*, 22(13), 2021-33

Koninckx, P.R., Martin D.C. (1992), Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa?, *Fertility and Sterility*, 58(5), 924-8

Koninckx P.R., Barlow D., Kennedy S. (1999), Implantation versus Infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 47 (1), 3-10

Koninckx P.R., Ussia A., Adamyan L., Wattiez A., Gomel V., Martin D., C. (2019), Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory, *Fertility and Sterility*, 111(2), 327-40

Konrad L., Gronbach J., Horné F., Mecha E.O., Berkes E., Frank M., Gattenlöhner S., Omwandho C.O.A., Oehmke F., Tinneberg H.R. (2019a), Similar Characteristics of Endometrial and Endometriotic Epithelial Cells, *Reproductive Sciences*, 26(1), 49-59

Konrad L., Dietze R., Kudipudi P. K., Horné F., Meinhold-Heerlein I. (2019b), Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis?, *Reproduction*, 158 (2), R41-47

Konrad L., Dietze R., Riaz M.A., Scheiner-Bobis G., Behnke J., Horné F., Hoerscher A., Reising C., Meinhold-Heerlein I. (2020), Epithelial-mesenchymal transition in endometriosis- When does it happen?, *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1915

Konrad L., Fruhmann Berger L.M., Maier V., Horné F., Neuheisel L. M., Laucks E. V., Rias M. A., Oehmke F., Meinhold-Heerlein I., Zeppernick F. (2023), Predictive model for the non-invasive diagnosis of endometriosis based on clinical parameters, *Journal of Clinical Medicine*, 12(13), 4231

Krämer F., White K., Kubbies M., Swisshelm K., Weber B.H. (2000), Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Human Genetics*, 107(3), 249-56

Krug S. M., Günzel D., Conrad M. P., Lee I. M., Amasheh S., Fromm M., Yu A. S. L. (2012), Charge-selective claudin channels, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257, 20–28

Laschke M.W., Menger M.D. (2007), In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis, *Human Reproduction Update*, 13(4), 331-342

- Laschke M.W., Giebels C., Menger M.D. (2011), Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle, *Human Reproduction Update*, 17(5), 628-36
- Laschke M.W., Menger M.D. (2012), Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis, *Human Reproduction Update*, 18(6), 682–702
- Lertkiatmongkol P. (2016), Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD 31), *Current opinion in Hematology*, 23(3), 253-59
- Leyendecker G., Kunz G., Noe M., Herbertz M., Mall G. (1998), Endometriosis: a dysfunction and disease of the archmimetra, *Human Reproduction Update*, 4(5), 752-62
- Leyendecker G., Wildt L., Mall G. (2009), The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 280(4), 529-38
- Li T., Li Y-G., Pu D-M. (2006), Matrix metalloproteinase -2 and -9 expression correlated with angiogenesis in human adenomyosis, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 62(4), 229-35
- Li X., Li Y., Qiu H., Wang Y. (2013), Downregulation of claudin-7 potentiates cellular proliferation and invasion in endometrial cancer, *Oncology letters*, 6(1), 101-105
- Liu X., Shen M., Qi Q., Zhang H., Guo S.-W. (2016), Corroborating evidence for platelet-induced epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis, *Human Reproduction*, 31(4), 734-749
- Löffelmann A.C., Hoersch A., Riaz M.A., Zeppernick F., Meinhold-Heerlein I., Konrad L. (2022), Claudin-10 expression is increased in endometriosis and adenomyosis and mislocalized in ectopic endometriosis, *Diagnostics (Basel)*, 12(11), 2022
- Lüllmann-Rauch R. (2009), Taschenlehrbuch Histologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag
- Machado D. E., Abrao M. S., Berardo P. T., Takiya C.M., Nasciutti L. E. (2008), Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum, *Fertility and Sterility*, 90(1), 148-55

- Mahzouni P., Mohammadizadeh F., Mougouei K., Moghaddam N. A., Chehrei A., Mesbah A. (2010), Determining the relationship between "microvessel density" and different grades of astrocytoma based on immunohistochemistry for "factor VIII-related antigen" (von Willebrand factor) expression in tumor microvessels, *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53(4), 605-10
- Maier V., Höll M., Dietze R., Mecha E.O., Omwandho C.O.A., Tinneberg, H.R., Meinhold-Heerlein, I., Konrad L. (2020), Adenomyotic glands are highly related to endometrial glands, *Reproductive Biomedicine Online*, 40(6), 769-78
- Manole E. Ceafalan L. C., Oproiu A. M., Popa-Wagner A., Popescu B.O. (2015), Claudin-1 and occludin expression in demyelinating peripheral neuropathies, *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 56 (3), 1097-102
- Maruyama T. (2022), A Revised Stem Cell Theory for the Pathogenesis of Endometriosis, *Journal of Personalized Medicine*, 12(2), 216
- Matsuzaki S., Canis M., Darcha C., Dechelotte P., Puly J.L., Bruhat M.A. (1998), Angiogenesis in endometriosis, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 46(2), 111-5
- Matsuzaki S., Darcha C. (2012), Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis, *Human Reproduction*, 27(3), 712–21
- McLaren J. (2000), Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis, *Human Reproduction Update*, 6(1), 45-55
- Mechsner S., Schwarz J., Thode J., Loddenkemper C., Salomon D. S., Ebert A. D. (2007), Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions, *Fertility and Sterility*, 88(3), 581-7
- Mendoza-Rodríguez C. A., González-Mariscal L., Cerbón M. (2005), Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle, *Cell and Tissue Research*, 319(2), 315–30

Meusch M. (2016), Untersuchungen zum Einfluss von 17 β -Östrogen auf die extrazelluläre Matrix von hairless-(skh-1)-Mäusen während der intrinsischen und extrinsischen Hautalterung, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. J. W. Fischer, <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=40246> (zuletzt abgerufen am 21.12.23, 09:39 Uhr)

Meyer R. (1919), Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im Allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbibliothek Gynäkologie*; 43(745-750)

Milatz S. (2019), A novel claudinopathy based on Claudin-10 mutations, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5396

Mok-Lin E.Y., Wolfberg A., Hollinquist H., Laufer M.R. (2010), Endometriosis in a Patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome and Complete Uterine Agenesis: Evidence to Support the Theory of Coelomic Metaplasia, *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 23(1), e35-7

Morassuto C., Monasta L., Ricci G., Barbone F., Ronfani L. (2016), Incidence and estimated prevalence of endometriosis and adenomyosis in northeast Italy: a data linkage study, *PLoS One*, 11(4), e0154227

Morita K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S. (1999), Endothelial Claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells, *The Journal of Cell Biology*, 147(1), 185–94

Németh Z., Szász A. M., Tátrai P., Németh J., Györffy H., Somorácz A., Szijártó A., Kupcsulik P., Kiss A., Schaff Z. (2009), Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 Protein Expression in Biliary Tract Cancers, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(2), 113–21

Nielsen N.M., Jorgensen K.T., Pedersen B.V., Rostgaard K., Frisch M. (2011), The co-occurrence of endometriosis with multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome, *Human Reproduction*, 26(6), 1555-9

- Nisenblat V., Bossuyt P. M. M., Farquhar C., Johnson N., Hull M. L. (2016), Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 26(2), CD 009591
- Nisolle M., Casanas-Roux F., Anaf V., Mine J.M., Donnez J. (1993), Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis, *Fertility and Sterility*, 59(3), 681-4
- Nisolle M., Donnez J. (1997), Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal spetum are three different entities, *Fertility and Sterility*, 68(4), 585-96
- Nnoaham K.E., Hummelshoj L., Webster P., d'Hooghe T., de Cicco Nardone F., de Cicco Nardone C., Jenkinson C., Kennedy S.H., Zondervan K.T. (2011), Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: A Multicenter Study Across Ten Countries, *Fetility and Sterility*, 96(2), 366-73
- Oh N., Ryu K., Jung C., Yi S.Y., Kim R. (2013), Expression of endothelial nitric oxide synthase in the uterus of patients with leiomyoma or adenomyosi, *The Journal of Obstetrics and Gynecological Research*, 39(2), 536-42
- Okada T., Konno T., Kohno T., Shimada H., Saito K., Satohisa S., Saito T., Kojima T. (2020), Possibility of targeting claudin-2 in therapy for human endometrioid endometrial carcinoma, *Reproductive Sciences*, 27(11), 2092-103
- Oku N., Sasabe E., Ueta E., Yamamoto T., Osaki T. (2006), Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase mmp-2 and membrane type mmp-1, *Cancer Research*, 66(10), 5251-7
- Ornek T., Fadiel A., Tan O., Naftolin F., Arici A. (2008), Regulation and activation of ezrin protein in endometriosis, *Human Reproduction*, 23(9), 2104-12
- Ota H., Igarashi S., Tanaka T. (1998), Morphometric evaluation of stromal vascularization in the endometrium in adenomyosis, *Human Reproduction*, 13(3), 715-9
- Owusu-Akyaw A., Krishnamoorthy K., Goldsmith L.T., Morelli S. (2018), The role of mesenchymal–epithelial transition in endometrial function, *Human Reproduction Update*, 25(1), 114–33

- Pan X.Y., Li X., Weng Z.P., Wang B. (2009), Altered expression of claudin-3 and claudin-4 in ectopic endometrium of women with endometriosis, *Fertility and Sterility*, 91(5), 1692-9
- Parazzini F., Esposito G., Tozzi L. Noli S., Bianchi S. (2017), Epidemiology of endometriosis and its comorbidities, *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 209, 3-7
- Paschoud S., Bongiovanni M., Pache J.C., Citi S. (2007), Claudin 1 and claudin 5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas, *Modern Pathology*, 20(9), 947-54
- Piña-Oviedo S., Ortiz-Hidalgo C. (2008), The normal and neoplastic perineurium: a review, *Advances in Anatomic Pathology*, 15(3), 147-64
- Puente J.M., Fabris A., Patel J., Patel A., Cerrillo M., Requena A. Garcia-Velasco J.A. (2016), Adenomyosis in infertile woman: prevalence and the role of 3D ultrasound as a marker of severity of the disease, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 60
- Qi S., Zhao X., Li M., Zhang X., Lu Z., Yang C., Zhang C., Zhang H., Zhang N. (2015), Aberrant expression of Notch1/numb/snail signaling, an epithelial mesenchymal transition related pathway, in adenomyosis, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13, 96
- Redwine D.B. (2002), Diaphragmatic endometriosis: diagnosis, surgical management, and long-term results of treatment. *Fertility and Sterility*, 77(2), 288-96
- Reinhold A., Rittner H. (2017), Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review, *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 469(1), 123–34
- Reinhold A., Schwabe J., Lux T. J., Salvador E., Rittner H. L. (2018), Quantitative and microstructural changes of the blood-nerve barrier in peripheral neuropathy, *Frontiers in Neuroscience*, 12, 936
- Resnick M.B., Konkin T., Routhier J., Sabo E., Pricolo V.E. (2005), Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study, *Modern Pathology*, 18(4), 511-8
- Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985 (1985), *Fertility and Sterility*, 43(3), 351–2

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996 (1997), *Fertility and Sterility*, 67(5), 817–21

Ricci A.G., Olivares C.N., Bilotas M.A., Meresman G.F., Barañao R.I. (2011), Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis, *Reproductive Sciences*, 18(7), 614– 22

Rizk B., Fischer A.S., Lotfy H.A., Turki R., Zahed H.A., Malik R., Holliday C.P., Glass A., Fishel H., Soliman M.Y., Herrera D. (2014), Recurrence of endometriosis after hysterectomy, *Facts, Views and Vision in ObGyn*, 6(4), 219-227

Robin B., Planeix F., Sastre-Garau X., Pichon C., Olesen T.K., Gogusev J., Ghinea N. (2016), Follicle-stimulating hormone receptor expression in endometriotic lesions and the associated vasculature: A immunohistochemical study. *Reproductive Sciences*, 23(7), 885-91

Rocha A.L., Reis F.M., Taylor R.N. (2013). Angiogenesis and endometriosis, *Obstetrics and Gynecology International*, 2013:859619

Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L., Seibert K., Currie M.G., Needleman P. (1993), Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(15), 7240-44

Sampson J.A. (1927), Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation, *The American Journal of Pathology*, 3(2), 93–110

Sanada Y., Oue N., Mitani Y., Yoshida K., Nakayama H., Yasui W. (2006), Downregulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype, *The Journal of Pathology*, 208(5), 633-42

Sasson I.E., Taylor H.S. (2008), Stem cells and the pathogenesis of endometriosis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 106-15

Schindl M., Birner P., Obermair A., Kiesel L., Wenzl R. (2001), Increased microvessel density in adenomyosis uteri, *Fertility and Sterility*, 75(1), 131-5

Schindler A.E. (2007), Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose, *Journal für Fertilität und Reproduktion*, 17(4), 22-7 (Ausgabe für Österreich)

Schneider C.A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012), NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods*, 9(7), 671-5

Schumann S., Buck V. U., Classen-Linke I., Wennemuth G., Grümmer R. (2015), Claudin-3, claudin-7, and claudin-10 show different distribution patterns during decidualization and trophoblast invasion in mouse and human, *Histochemistry Cell Biology*, 144(6), 571–85

Selntigia A., Molinaro P., Tartaglia S., Pellicer A., Galliano D., Cozzolino M. (2024), Adenomyosis: an update concerning diagnosis, treatment and fertility, *Journal of Clinical Medicine*, 13(17), 5224

Seo K.W., Kwon Y.K, Kim B.H., Kim C.I., Chang H.S., Choe M.S., Park C.H. (2010), Correlation between claudins expression and prognostic factors in prostate cancer, *Korean Journal of Urology*, 51(4), 239-44

Shakiba K., Bena J.F., McGill K.M., Minger J., Falcone T. (2008), Surgical treatment of endometriosis, *Obstetrics and Gynecology*, 111(6), 1285-92

Shifren J.L., Tseng J.F., Zaloudek C.J., Ryan I.P, Meng Y.G., Ferrara N., Jaffe R.B., Taylor R.N. (1996), Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8), 3112-8

Simpson J.F., Ahn C., Battifora H., Esteban J.M. (1996), Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma, *Cancer*, 77(10), 2077-85

Sinaii N., Plumb K., Cotton L., Lambert A., Kennedy S., Zondervan K., Stratton P. (2008), Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease, *Fertility and Sterility*, 89(3), 538-45

Sobel G., Németh J., Kiss A., Lotz G., Szabó I., Udvarhelyi N., Schaff Z., Páska C. (2006), Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma, *Gynecologic Oncology*, 103(2), 591-98

Stratopoulou C.A., Camboni A., Donnez J., Dolmans M. M. (2021), Identifying common pathogenic features in deep endometriotic nodules and uterine adenomyosis, *Journal of Clinical Medicine*, 10(19), 4585

Suvitie P.A., Hallamaa M.K., Matomäki J.M., Mäkinen J.I., Perheentup A.H. (2016), Prevalence of pain symptoms suggestive of endometriosis among finnish adolescent girls (TEENMAPS Study), *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 29(2), 97-103

Tiwari, M., Prasad, S., Shrivastav, T.G., Chaube, S.K. (2017), Calcium signaling during meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes, *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 976-81

Tokyo C., Aktepe F., Dilek F.H., Sahin O., Ario D. T. (2009), Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in adenomyosis and endometrial polyps and its correlation with angiogenesis, *International Journal of Gynecologic Pathology*, 28(2), 148-56

Tsukahara M., Nagai H., Kamiakito T., Kawata H., Tagayashiki N, Saito K., Tanaka A. (2005), Distinct expression patterns of claudin1 and claudin-4 in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas, *Pathology International*, 55(2), 63-9

Tulandi T., Felemban A., Chen M. F. (2001), Nerve fibers and histopathology of endometriosis-harboring peritoneum, *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 8(1), 95-8

Tuttles F., Keckstein J., Ulrich U., Possover M., Schweppe K.W., Wustlich M., Buchweitz O., Greb R., Kandolf O., Mangold R., Masetti W., Neis K., Rauter G., Reeka N., Richter O., Schindler A.E., Sillem M., Terruhn V., Tinneberg H.R. (2005), ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose, *Zentralblatt für Gynäkologie*, 127(5), 275–81

Uil S.H., Broek E., Coupe V.M.H., Vellinga T. T., Diemen P.M.D., Bril H., Belt E.J.Th., Kranenburg O., Stockmann H.B.A.C., Belien J.A.M., Meijer G.A., Fijneman J.A. (2019), Prognostic value of microvessel density in stage II and III colon cancer patients: a retrospective cohort study, *BMC Gastroenterology*, 19(1), 146

Usuda K., Iwai S., Funasaki A., Sekimura A., Motono N., Ueda Y., Shimazaki M., Uramoto H. (2018), Expression and Prognostic Impact of VEGF, CD31 and α SMA in Resected Primary Lung Cancers, *Anticancer Research*, 38(7), 4057-63

Väre P., Loikkanen I., Hirvikoski P., Vaarala M., Soini Y. (2008), Low claudin expression is associated with high gleason grade in prostate adenocarcinoma, *Oncology Reports*, 19(1), 25-31

- Varghese F., Bukhari A. B., Malhotra R., De A. (2014), IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples, *PLoS ONE*, 9(5), e96801
- Vercellini P., Trespidi L., De Giorgi O., Cortesi I., Parazzini F., Crosignani P.G. (1996), Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization, *Fertility and Sterility*, 65(2), 299–304
- Viganò P., Parazzini F., Somigliana E., Vercellini P. (2004), Endometriosis: epidemiology and aetiological factors, *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(2), 177-200
- Wang J., Deng Y., Yang Y., Yang X., Kong B., Chao L. (2016), Expression of GRIM-19 in adenomyosis and its possible role in pathogenesis, *Fertility and Sterility*, 105(4), 1093-101
- Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. (1991), Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 324(1), 1-8
- Wozniak N., Gieriej B., Poplawska L., Ziarkiewicz M., Wolinska E., Kulczycka E., Ziarkiewicz-Wroblewska B. (2016), Angiogenesis in CD5-positive diffuse large B cell lymphoma: a morphometric analysis, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(6), 1149-55
- Yoshida Y., Ban Y., Kinoshita S. (2009), Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(5), 2103-8
- Young V.J., Brown J.K., Saunders P.T., Horne A.W. (2013), The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis, *Human Reproduction Update*, 19(5), 558–69
- Yu H., Huang Y., Ma Y., Gao M, Wang O., Gao T., Shen Y., Liu X. (2013), Interleukin 8 regulates endometrial permeability by down-regulation of tight junction but not dependent on integrins induced focal adhesions, *International Journal of Biological Sciences*, 9(9), 966-79

Zhou Y., Xiang J., Bhandari A., Guan Y., Xia E., Zhou X., Wang Y., Wang O. (2018), CLDN10 is associated with papillary thyroid cancer progression, *Journal of Cancer*, 9(24), 4712-7

Zondervan K.T., Becker C.M., Missmer S.A. (2020), Endometriosis, *The New English Journal of Medicine*, 382(13), 1244-56

10 Publikationsverzeichnis

Löffelmann A.C., Hoerscher A., Riaz M.A., Zeppernick F., Meinhold-Heerlein I., Konrad L. (2022), Claudin-10 expression is increased in endometriosis and adenomyosis and mislocalized in ectopic endometriosis, *Diagnostics (Basel)*, 12(11), 2022

11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Lutz Konrad, der mich nicht nur durch seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sondern auch durch seine Unterstützung auf persönlicher Ebene maßgeblich bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet hat. Seine unermüdliche Motivation und sein Ansporn waren entscheidend dafür, dass ich diese Herausforderung erfolgreich abschließen konnte. Seine zahlreichen Lebensweisheiten werden mich über die Promotion hinaus auf meinem Lebensweg begleiten.

Cornelia Hof danke ich für ihre umfassende Einarbeitung und ihre tägliche Unterstützung, sowohl in technischen Fragen als auch in der menschlichen Kommunikation.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, insbesondere bei Dr. Meinhold-Heerlein, und dem Institut für Pathologie unter der Leitung von Prof. Dr. Gattenlöhner für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt Sara Seeger, die die Zeit im Labor für mich durch ihre lebensfrohe und herzliche Art wesentlich angenehmer gestaltet hat, unter anderem durch ihren leckeren Geburtstagsschokokuchen, der mir für immer in Erinnerung bleiben wird.

Ein riesiges Danke geht an meinen Freund Finn. Er hat mich in vielen Stunden des Verzweifels und der Frustration ertragen, mich in allen Höhen und Tiefen bedingungslos unterstützt und mich stets motiviert.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, ohne deren Rückhalt diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke meinem Bruder Peter Löffelmann, dass ich mich jederzeit bei ihm melden und mich auf seine Unterstützung verlassen kann. Meinen Eltern Simone und Ulrich Löffelmann möchte ich an dieser Stelle von ganzem Herzen für die konstruktive Unterstützung und Liebe während meines gesamten Studiums danken. Danke, dass ihr immer an mich und meine Stärken glaubt und mich motiviert, wenn ich mal wieder den Mut verliere. Danke, dass ihr immer für mich da seid.