

Expressionsprofile von Vimentin, Claudin-11 und Claudin-7 in der Pathogenese der
Endometriose

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

vorgelegt von Horné, Fabian
aus München

Gießen, 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

am

Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Gutachter: PD Dr. Lutz Konrad

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner

Tag der Disputation: 27.7.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen und Terminologie.....	1
1.2	Historische Hintergründe.....	2
1.3	Morphologie und klinisches Erscheinungsbild.....	3
1.4	Epidemiologie und gesundheitspolitische Relevanz.....	5
1.5	Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie der Endometriose.....	7
1.6	Gegenwärtiger Stand der Forschung zur Ätiologie und Pathogenese der Endometriose	10
1.6.1	Sampson´s Transplantationstheorie.....	10
1.6.2	Metaplasietheorie.....	11
1.6.3	Tissue injury and repair (TIAR) Konzept.....	11
1.6.4	Stammzell und Progenitorzellhypothese.....	12
1.6.5	Endometriotic disease theory.....	12
1.7	Analyse von drei Strukturproteinen in der Endometriose	14
1.7.1	Das Intermediärfilament Vimentin.....	14
1.7.2	Die Zell-Zell Kontaktproteine Claudin-11 und Claudin-7.....	16
1.8	Formulierung der Fragestellung und Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Gewebeproben.....	19
2.1.2	Serumproben von Patientinnen ohne und mit Endometriose.....	22
2.1.3	Puffer und Chemikalien.....	22
2.1.4	Antikörper.....	23
2.1.5	ELISA-Kit.....	23
2.1.6	Geräte.....	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	Paraffinschnitte.....	26
2.2.2	Immunhistochemie.....	27
2.2.3	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	32
2.3	Statistische Analyse	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Qualitative und quantitative Analyse von Vimentin	36
3.1.1	Qualitative Analyse der Proteinexpression von Vimentin.....	36
3.1.2	Quantitative Analyse der Proteinexpression von Vimentin.....	38
3.2	Qualitative und quantitative Analyse von Claudin-11	42

3.2.1	Qualitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-11	42
3.2.2	Quantitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-11	46
3.3	Qualitative und quantitative Analyse von Claudin-7	50
3.3.1	Qualitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-7	50
3.3.2	Quantitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-7	52
3.3.3	Claudin-7 Gehalt im Serum von Frauen ohne und mit Endometriose...	55
3.4	Zusammenfassender Vergleich der Proteinexpression von Vimentin, Claudin-11 und Claudin-7 in der Endometriose	57
3.4.1	Qualitative Beschreibung der Proteinlokalisierung	57
3.4.2	Quantitative Beschreibung der Proteinexpression.....	58
4	Diskussion.....	59
4.1	Patientenkollektiv	59
4.2	Analyse der Proteinexpression von Vimentin	60
4.3	Bedeutung der Ergebnisse für die Rolle der Epithelial-Mesenchymalen Transition in der Pathogenese der Endometriose	63
4.4	Analyse der Proteinexpression von Claudin-11	65
4.5	Analyse der Proteinexpression von Claudin-7	68
4.6	Claudin-7 ELISA.....	71
4.7	Einordnung der Ergebnisse für die Pathogenese der Endometriose und Ausblick.....	74
5	Zusammenfassung.....	77
6	Summary.....	78
7	Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	79
7.1	Abkürzungsverzeichnis	79
7.2	Tabellenverzeichnis	81
7.3	Abbildungsverzeichnis	82
8	Literaturverzeichnis	83
9	Publikationsverzeichnis.....	100
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	101
11	Danksagung.....	102

1 Einleitung

1.1 Grundlagen und Terminologie

Endometriose ist eine chronische, gynäkologische Erkrankung, die durch das Vorhandensein von endometrialen Drüsen aus Epithelzellen sowie endometrialem Stroma außerhalb des Cavum uteri definiert ist (Clement, 2007). Prädilektionsstellen für das Vorkommen solcher Herde stellen dabei die Ovarien sowie das Peritoneum, insbesondere des kleinen Beckens, dar (Bulun, 2009). Zeigen sich diese endometrialen Absiedelungen innerhalb des Myometriums, spricht man von Adenomyose (García-Solares et al., 2018). In der deutschsprachigen Literatur findet sich auch eine Einteilung nach der Lokalisation. Hierbei wird die letztgenannte Adenomyose als Endometriosis genitalis interna und der Befall von inneren weiblichen Geschlechtsorganen wie Ovarien, Tuben, Vagina oder des uterinen Halteapparats als Endometriosis genitalis externa bezeichnet. Sind darüber hinaus Appendix, Darm, Harnleiter oder -blase, oder in seltenen Fällen auch Leber oder Lunge betroffen, spricht man von Endometriosis extragenitalis (Halis et al., 2010).

Eine weitere Einteilung, welche auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, unterscheidet zwischen ovarieller, peritonealer und tief infiltrierender Endometriose, da postuliert worden ist, dass es sich dabei um drei verschiedene Entitäten mit unterschiedlicher Pathogenese handeln könnte (Nisolle & Donnez, 1997). Kommt es durch Einblutungen in ovarielle Herde zur Bildung von Zysten, werden diese als Endometriome oder auch „Schokoladenzysten“ bezeichnet (Benagiano et al., 2014). Als tief infiltrierende Endometriose wird gemäß der deutschen Leitlinie der Befall von Septum rectovaginale, Fornix vaginae, des Retroperitoneums (Beckenwand, Parametrium) sowie des Darms, Ureters und der Harnblase definiert [Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), 2013].

Obwohl die Endometriose als benigne Erkrankung zu verstehen ist, weist sie einige Eigenschaften maligner Prozesse wie lokale Invasion aber auch Ausbreitung in mitunter weit entfernte Körperregionen im Sinne einer Metastasierung auf. Durch unregelmäßige Gewebsproliferation schädigt die Endometriose darüber hinaus das sie umgebende Gewebe (Kvaskoff et al., 2014). Die endometriotischen Herde sind, ähnlich wie eutopes Endometrium, meistens östrogenabhängig (Giudice & Kao, 2004; Bulun, 2009) und weisen darüber hinaus oft eine Progesteronresistenz auf (Flores et al., 2018). Es kommt zu einer inflammatorischen Reaktion des Körpers (Jiang et al., 2016), welche zusammen mit dem lokalen Wachstum als Leitsymptome der Endometriose starke, vor allem perimenstruelle Unterbauchschmerzen, Dyspareunie, sowie Infertilität verursacht.

1.2 Historische Hintergründe

Ähnlich ihrer heterogenen Erscheinungsform im klinischen Sinn, so ist auch die Geschichte der Endometriose nicht abschließend geklärt. Der deutsche Arzt Daniel Christianus Schrön beschrieb in seiner 1690 in Jena vorgelegten *Disputatio Inauguralis Medica de Ulceribus Uteri* erstmalig das Auftreten von Ulzera im Bereich des Peritoneums, der Blase, des Darms, des Ligamentum latum sowie Uterus und Cervix bei Frauen. Darüber hinaus erkannte er den inflammatorischen Charakter sowie die Tendenz zur Adhäsionsbildung und stellte den Bezug zur Menarche und Menstruation her (Knapp, 1999). Allerdings fehlte zu dieser Zeit noch der histologische Nachweis endometrialen Gewebes, und andere Autoren vermuten, dass Schröns Beschreibungen eher Infektionen im Rahmen von Syphilis, Aborten oder Manipulationen als eine Endometriose zu Grunde lag (Benagiano & Brosens, 2011).

Die ersten histopathologischen Beschreibungen von dystopem Endometrium finden sich in dem Artikel „Uterusdrüsen-Neubildungen in Uterus und Ovarial- Sarcomen“ von Carl Freiherr von Rokitansky, der 1860 in Wien publiziert wurde. Hierin bezeichnete der Autor das Vorhandensein uteriner Drüsen in fibrösen Uterustumoren des Myometriums als „Sarcoma carcinoides uterinum“ und grenzte diese auch von uterinen Myomen ab, da sie sich anders als diese nicht ausschälen ließen. Darüber hinaus beschrieb er Fälle von ovarieller Endometriose, welche er „Uterusdrüsen enthaltende Sarkome“ nannte (Hudelist et al., 2009). Da Rokitansky jedoch in seiner Schrift den eigentlich maligne Tumoren beschreibenden Begriff Sarkom verwendet, ist nicht klar, ob er sich der benignen Natur dieser Läsionen bewusst war (Benagiano & Brosens, 2011).

Thomas Cullen beschrieb schließlich in seinem Artikel „Adeno-myoma uteri diffusum benignum“ von 1896 neben einer histologischen Beurteilung auch die klinischen Symptome des chronischen Unterbauchschmerzes und Dysmenorrhoe sowie die Hysterektomie als erfolgreiches Therapieverfahren (Hudelist et al., 2009). In der Folgezeit weitete Cullen seine histologischen Untersuchungen aus und wird von manchen Autoren als der Erste angesehen, dem eine vollständige Beschreibung des Krankheitsbildes der Endometriose gelang, welche zu dieser Zeit noch als „uterine Adenomyome“ bezeichnet wurde (Benagiano & Brosens, 2011).

Der Begriff Endometriose wurde als solcher erstmals von John A. Sampson im Jahre 1925 verwendet (Sampson, 1925) und damals noch parallel zu „implantation adenomyoma“ genutzt (Benagiano et al., 2014). Neben zahlreichen weiteren Arbeiten zur Endometriose, entwickelte Sampson (1927) die Transplantationstheorie, die eine retrograde Verschleppung endometrialer Zellen als Ursache endometriotischer Läsionen

ansieht und bis heute die weitestgehend akzeptierte Erklärung der Pathogenese der Endometriose darstellt (Giudice & Kao, 2004; Clement, 2007).

1.3 Morphologie und klinisches Erscheinungsbild

Die Endometriose stellt sich histomorphologisch durch das Vorhandensein von endometriotischen Drüsen sowie zytogenem Stroma außerhalb des Cavum uteri dar. In einem Teil der Fälle imponiert sie auch als rein stromale und sehr selten auch als rein epitheliale Endometriose. Sowohl die Drüsen, als auch das umgebende Stroma gleichen histologisch dabei fast immer in hohem Maße eutopem Endometrium (Clement, 2007). Ebenso wie regelhaftes endometriales Stroma, weist auch sein ektopes Gegenstück Immunoreaktivität für CD10 auf, welches ein nützliches Instrument zum Nachweis einer Endometriose ist, gerade auch, wenn die histologische Begutachtung aufgrund eingeschränkter Probenqualität erschwert ist (Groisman & Meir, 2003; Konrad et al., 2019a).

Das klinische Erscheinungsbild und die Symptomatik der Endometriose wird zu einem entscheidenden Teil durch die Lokalisation der Herde bestimmt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über deren Häufigkeit und Verteilung.

Tabelle 1: Häufigkeit der Lokalisationen der Endometriose (Audebert et al., 2018)

Ovar	66,9 %
Ligamentum sacrouterinum	45,5 %
Fossa ovarica	32,2 %
Douglas-Raum	29,5 %
Harnblase	21,4 %
Colon Sigmoidum	8,4 %
Tuba uterina	4,5 %
Ligamentum rotundum	2,5 %
Laterale Beckenwand	1,5 %

Seltener, jedoch immer wieder in der Literatur beschrieben, sind Endometriose-Herde der Bauchwand, vor allem im Bereich von Narben nach Laparotomie. Ebenfalls finden sich Berichte von Foci der Leber und Gallenblase, des Zwerchfells sowie des Thorax oder einzelner Muskeln (Machairiotis et al., 2013).

Ein typisches Symptom bei Befall des Douglas-Raumes und des angrenzenden Septum rectovaginale ist die Dyspareunie, welche in der Folge oft mit einem Libidoverlust einhergeht. Auch der Harntrakt ist häufig betroffen, was von Miktionsbeschwerden und Hämaturie bei Blaseninfiltration bis hin zum Harnstau durch lokale Kompression des

Einleitung

Ureters und unter Umständen einer Hydronephrose mit Verlust der Nierenfunktion reichen kann. Bei Endometriose des Darmes kann es zu Dyschezie, intestinalen Blutungen und durch Stenosierung des Lumens zu mechanischen Darmverschlüssen kommen (Halis et al., 2010).

Die Diagnose und Therapie dieses Krankheitsbildes verlangt daher nach einem interdisziplinären Ansatz, welcher neben der Gynäkologie auch die urologischen und chirurgischen Fachdisziplinen einschließt. Sehr häufig bestehen zudem psychiatrische Komorbiditäten, insbesondere Angststörungen und Depressionen, welche die somatischen Beschwerden aggravieren und die Lebensqualität zusätzlich einschränken. Eine entsprechende Exploration und Mitbetreuung sollte daher stets Teil des klinischen Managements von Patientinnen mit Endometriose sein (Laganà et al., 2017).

Patientinnen mit Endometriose leiden außerdem häufiger unter Migräne (Miller et al., 2018) sowie dem Reizdarmsyndrom und tragen ein erhöhtes Risiko für entzündliche Darmerkrankungen (Parazzini et al., 2017), rheumatoide Arthritis oder auch systemischen Lupus erythematodes (Harris et al., 2016).

Es existieren verschiedene Klassifikationssysteme, mit deren Hilfe das Ausmaß und klinische Bild der Erkrankung beschrieben werden kann. Das weltweit am weitesten verbreitete stellt dabei die „revised classification of endometriosis“ der American Society for Reproductive Medicine, kurz rASRM, dar. Für dieses werden das Peritoneum, beide Ovarien sowie die Eileiter berücksichtigt und entsprechend ihres Befallsmusters mit Punktwerten versehen. Durch Addition lässt sich so eine Einteilung des Schweregrads der Endometriose in vier Abstufungen von „Minimal“ über „Mild“ und „Moderate“ bis hin zu „Severe“ vornehmen („Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis“: 1996., 1997).

Allerdings werden in diesem Schema keine extragenitalen und retroperitonealen Läsionen erfasst. Darüber hinaus korreliert die Klassifikation nur schwach mit den zwei klinisch wichtigsten Symptomen Schmerz und Infertilität (Haas et al., 2013). Im deutschsprachigen Raum wurde daher mit dem ENZIAN Score ein zusätzliches Klassifikationssystem entwickelt, welches insbesondere die tief infiltrierende Endometriose besser erfassen soll. Ähnlich wie bei onkologischen Stadieneinteilungen werden dabei vier Schweregrade gemäß des Ausmaßes des Befalls der jeweiligen Organe erfasst (Tuttles et al., 2005).

Auch wenn die ENZIAN Klassifikation eine gute Beschreibung des Befundes, sowohl prä- als auch intraoperativ, ermöglicht, ist sie sehr komplex in der Handhabung und hat sich bisher kaum über den deutschsprachigen Raum hinweg durchgesetzt. Auch deshalb ist die Datenqualität zur Korrelation mit klinischen Symptomen noch unzureichend (Haas et al., 2013).

In einem Konsens-Papier der World Endometriosis Society wird empfohlen, im Falle einer tief infiltrierenden Endometriose neben dem rASRM auch den ENZIAN Score zu verwenden, um das Ausmaß der Erkrankung möglichst vollständig zu erfassen. Allerdings herrscht auch Einigkeit darüber, dass bisher keines der beiden hier vorgestellten Klassifikationssysteme die Erkrankung zufriedenstellend erfassen kann. Es besteht daher der dringende Bedarf nach einem Klassifikationssystem, welches verlässliche Aussagen über die Schwere der Erkrankung, die Auswirkungen auf die Fertilität, den resultierenden Schmerz sowie die Prognose und Lebensqualität ermöglicht (Johnson et al., 2017).

1.4 Epidemiologie und gesundheitspolitische Relevanz

Endometriose ist eine häufige Erkrankung, deren Prävalenz meist mit 5 bis 10 % der weiblichen Bevölkerung im reproduktiven Alter angegeben wird (Bulun, 2009). Allerdings lag die Prävalenz in zwei großen Bevölkerungsstudien lediglich bei 1-2% (Ballard et al., 2008; Eisenberg et al., 2018). Genaue Angaben zu Prävalenz und Inzidenz sind entsprechend schwer zu treffen, da sich die Erkrankung sehr unterschiedlich in Bezug auf Symptomatik und pathologischem Erscheinungsbild darstellt und Daten damit stark vom Studiendesign beeinflusst werden. In Untersuchungen, die die Häufigkeit von Endometriose als zufälligen Befund bei weitgehend asymptomatischen Patientinnen im Rahmen einer tubaren Sterilisation erfassten, zeigte sich eine solche in etwa 4 % der Fälle (Cramer & Missmer, 2002). Bei Frauen mit primärer Infertilität liegt die Prävalenz mit 9 bis 50 % jedoch deutlich höher (Duignan et al., 1972; Diedrich et al., 2000; Ebert, 2003). Auch in der Gruppe von Frauen mit Beckenschmerzen zeigten Studien eine Endometriose in 9 bis 21 % der Fälle (Cramer & Missmer, 2002), wobei junge Frauen mit chronischen und therapie-resistenten Unterbauchschmerzen mit 50 bis 70 % die höchste Prävalenz aufweisen (Cramer & Missmer, 2002; Ebert, 2003; Halis et al., 2010). Die große Relevanz der Endometriose ergibt sich nicht nur aus der vergleichsweise hohen Prävalenz, sondern insbesondere auch durch ihren chronischen Charakter. Angenommen, eine Frau leidet zwischen ihrem 15. und 45. Lebensjahr an Dysmenorrhoe und ist daher an 5 Tagen des Monats schmerzgeplagt, ergibt dies eine Leidenszeit von $5 \text{ (Tagen)} \times 12 \text{ (Monate)} \times 30 \text{ (Jahre)} = 1800 \text{ Tagen}$, entsprechend 5 ganzen Lebensjahren.

Obwohl die Erkrankung viele Frauen betrifft, vergeht oftmals viel Zeit, bis die Diagnose Endometriose gestellt wird. In einer Studie, die Frauen in Deutschland und Österreich befragte, wurde gezeigt, dass durchschnittlich 10,4 Jahre zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Sicherung der Diagnose vergehen. Der Grund hierfür wird zum einen in einer Verharmlosung der Symptome, insbesondere durch das Umfeld der

Einleitung

Patientinnen, zum anderen durch häufige Fehldiagnosen in 74 % der Fälle vermutet (Hudelist et al., 2012).

Endometriose schränkt nicht nur die Lebensqualität der Betroffenen ein, sondern stellt auch eine große finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem und die Gesellschaft dar. Dabei wird differenziert zwischen direkten Kosten durch Therapien und Krankenhausaufenthalte und indirekten Kosten, die durch Arbeitsausfälle oder Erwerbslosigkeit entstehen. Auch hier variieren die Daten je nach Studiendesign und insbesondere nach untersuchtem Gesundheitssystem erheblich, doch zeigen sie deutlich die große gesellschaftspolitische Relevanz dieser häufigen Erkrankung (Soliman et al., 2016). Die Angaben für die direkten Kosten liegen zwischen 760 € pro Patientin pro Jahr in Kanada (Levy et al., 2011) bis hin zu 8976 € pro Patientin pro Jahr in den USA (Mirkin et al., 2007). Daten aus Deutschland beziffern allein Krankenhauskosten von 3847 € pro Patientin pro Jahr (Oppelt et al., 2012). Die indirekten Kosten durch Endometriose sind schwieriger zu erheben, da es keine einheitlichen Definitionen über die zu erhebenden Aspekte gibt und sich Produktivität und Gehaltsniveaus in verschiedenen Ländern erheblich unterscheiden. Es wurde gezeigt, dass diese durchschnittlich etwa doppelt so hoch liegen wie die direkten Kosten (Simoens et al., 2012) und von 2907 € pro Patient pro Jahr in Österreich bis zu 13804 € pro Patient pro Jahr in den USA reichen (Soliman et al., 2016).

Sowohl die erheblichen direkten und noch höheren indirekten Kosten sind typisch für chronische Erkrankungen und stellen die Endometriose damit auf eine Ebene mit Diabetes mellitus, M. Crohn und rheumatoider Arthritis (Simoens et al., 2012).

In der Zusammenschau verursacht Endometriose geschätzte jährliche gesellschaftliche Kosten von 1,7 Milliarden € in Belgien, 12,5 Milliarden € in Deutschland und 49,6 Milliarden € in den USA (Simoens et al., 2012).

1.5 Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie der Endometriose

Zur Diagnostik und Therapie des komplexen Krankheitsbildes der Endometriose gibt es eine S2k-Leitlinie der gynäkologischen Fachgesellschaften von Deutschland, Österreich, der Schweiz sowie Tschechien unter Mitarbeit der Stiftung Endometrioseforschung (SEF) und der Europäischen Endometriose Liga (EEL). Die erste Fassung wurde im Jahr 2006 erstellt und in der Überarbeitung von 2013 auf S2k Niveau der AWMF gehoben. Seither wurde die ursprünglich bis September 2016 geplante Gültigkeit auf August 2018 verlängert und befindet sich derzeit in der Überarbeitung (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), 2013).

Daneben gibt es eine Leitlinie der *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) zum Management von Patientinnen mit Endometriose. Diese ebenfalls aus dem Jahr 2013 stammende Veröffentlichung geht dabei auch besonders auf die die Fertilität betreffenden Aspekte in der Versorgung von Endometriosepatientinnen ein (Dunselman et al., 2014).

Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass bei einer Vielzahl der Empfehlungen keine ausreichende Evidenz zur Verfügung steht und diese daher auf Expertenmeinungen der Leitlinien-Gremien beruhen. Dies unterstreicht den Bedarf nach weiterer Forschung auf dem Gebiet. Im Folgenden sollen die wichtigsten Empfehlungen dargestellt werden.

Wie bereits erörtert, gibt es häufig große Verzögerungen zwischen dem Auftreten erster Symptome und dem Stellen der Diagnose. Damit kommt, gerade angesichts der hohen Prävalenz der Erkrankung, einer ausführlichen Anamnese unter Kenntnis der Leitsymptome eine besondere Bedeutung zu. Endometriose soll in Betracht gezogen werden bei gynäkologischen Symptomen wie Dysmenorrhoe, nicht-zyklischem Unterbauchschmerz, Dyspareunie und Unfruchtbarkeit sowie auch nicht-gynäkologischen Symptomen wie Dyschezie, Dysurie, Hämaturie, Hämatochezie und Schulterschmerzen. Wichtige Hinweise in der klinischen Untersuchung stellen Knoten oder Indurationen im Bereich der hinteren Scheidenwand und -fornix, sowie Raumforderungen der Adnexe dar. Deziert soll eine Endometriose bei entsprechender Klinik auch bei unauffälliger Untersuchung trotzdem weiter in Erwägung gezogen werden. In der apparativen Diagnostik eignet sich der transvaginale Ultraschall vor allem zur Beurteilung von ovariellen Endometriomen und rektaler Endometriose. Die Magnetresonanztomographie eignet sich nicht zur Diagnose von peritonealer Endometriose, kann aber im Fall von tief infiltrierender Endometriose - gerade zur Operationsplanung - wichtige Informationen liefern. Biomarker zur nicht-invasiven Diagnostik der Endometriose konnten bisher nicht etabliert werden. Von großer

Einleitung

Bedeutung ist darüber hinaus auch eine Untersuchung der umgebenden Organsysteme mit besonderem Fokus auf dem harnableitenden System, um eine eventuelle, stauungsbedingte Hydronephrose zu detektieren und zu entlasten.

Die Diagnose erfolgt durch den laparoskopischen Nachweis der endometriotischen Herde und idealerweise deren bioptischer Sicherung und histologischer Untersuchung. Die Entnahme von Gewebeproben dient darüber hinaus auch zum Ausschluss seltener maligner Prozesse.

Die Therapie der Endometriose ist anspruchsvoll und erfordert eine oftmals interdisziplinäre Strategie, die konservative und operative Verfahren beinhaltet. Der therapeutische Goldstandard zur Symptomkontrolle für alle Entitäten der Endometriose ist die operative Entfernung der Herde und wird idealerweise im Rahmen der diagnostischen Laparoskopie durchgeführt. Peritoneale Endometrioseherde lassen sich mittels Ablation oder Exzision entfernen, wobei letzteres eine histologische Sicherung ermöglicht und auch für ausgedehntere Befunde geeignet ist. Ovarielle Endometriose-Zysten sollen in Gänze entfernt werden, da eine alleinige Fensterung zu häufigen Rezidiven führt. Im Falle von tief infiltrierender Endometriose ist ebenfalls eine Resektion in sano anzustreben. Durch den oftmals ausgedehnten Befund sowie den Befall umgebender Organe soll dies in Zentren mit hoher Expertise im interdisziplinären Konsens erfolgen. Dabei muss, neben der angestrebten Vollständigkeit der Entfernung, die möglicherweise erhebliche resultierende Morbidität berücksichtigt werden und das Vorgehen mit der Patientin abgesprochen werden.

Konservative Therapieverfahren stellen ergänzende Möglichkeiten dar. Als rein symptomatischer Ansatz bei Schmerzen werden häufig Analgetika wie nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) verwendet, wobei es bislang keine Evidenz zu deren Nutzen bei Endometriose-spezifischen Symptomen gibt. Einen weiteren Therapieansatz stellt der medikamentöse Eingriff in den Hormonhaushalt der Patientinnen mit dem Ziel einer therapeutischen Amenorrhö dar. Dies findet sowohl bei peritonealer, als auch tief infiltrierender Endometriose Anwendung und führt hier zu einer Regression der Herde, bei ovariellen Endometriomen hingegen konnte keine Verbesserung gezeigt werden. Es kommen dazu die kontinuierliche Gabe von oralen Kontrazeptiva, Gestagenpräparate oder GnRH-Analoga zum Einsatz. Bei gleicher Wirksamkeit bietet dabei das Gestagen Dienogest gegenüber GnRH-Analoga ein verbessertes Nebenwirkungsprofil und ist in seiner Anwendbarkeit nicht auf 6 Monate beschränkt. Eine medikamentöse Sekundärprophylaxe sollte außerdem im Anschluss an eine operative Endometriosesanierung erfolgen, um das Risiko eines Rezidivs zu vermindern.

In der Behandlung Endometriose-assoziiierter Infertilität verbessert die operative Entfernung von Endometrioseherden die Schwangerschaftsraten, wobei jedoch hierzu

Einleitung

bei fortgeschrittenen Stadien keine kontrollierten Studien vorliegen. Bei Schwangerschaftswunsch ist von einer adjuvanten Hormontherapie abzusehen. Schwangerschaftsraten lassen sich zudem durch assistierte Reproduktionstechniken (ART) wie Intrauterine Insemination, In-vitro Fertilisation oder Intracytoplasmatische Spermieninjektion verbessern. Dabei konnte eine weitere Verbesserung gezeigt werden, wenn im Anschluss an die Operation vor Beginn jeglicher ART eine 3-6 monatige Therapie mit GnRH-Agonisten durchgeführt wurde.

Für den Fall einer inzidentellen Endometriose bei asymptomatischen Patientinnen im Rahmen einer anderweitigen Operation wird eine Entfernung des Befundes nicht grundsätzlich empfohlen.

Durch die zum Teil erhebliche Einschränkung der Lebensqualität, chronische Schmerzzustände, häufige Assoziation mit somatoformen Schmerzstörungen und ungewollte Kinderlosigkeit müssen darüber hinaus psychosomatische Aspekte berücksichtigt und eine entsprechende Unterstützung angeboten werden. Gerade im Anschluss an größere Operationen besteht zudem oft Rehabilitations- und Wiedereingliederungsbedarf, um die Patientinnen wieder in ihren Alltag zu integrieren.

1.6 Gegenwärtiger Stand der Forschung zur Ätiologie und Pathogenese der Endometriose

Zur Pathogenese der Endometriose gibt es verschiedene Theorien, die im Folgenden kurz vorgestellt werden. Es herrscht in der Fachwelt kein allgemeiner Konsens zu den Mechanismen, die an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind, die breiteste Akzeptanz findet sich jedoch für die Transplantationstheorie von Sampson (Clement, 2007).

1.6.1 Sampson's Transplantationstheorie

Die im Jahr 1927 vorgestellte Transplantationstheorie von Sampson stellt die Verschleppung von endometrialen Zellen in die Bauchhöhle in den Mittelpunkt der Pathogenese der Endometriose. Durch retrograde Menstruation gelangt endometriales Gewebe über die Tuben nach intraperitoneal, wo es sich anheftet und weiter proliferiert (Sampson, 1927). Das Phänomen der retrograden Menstruation ist gut dokumentiert und tritt bei 76 bis 90 % aller Frauen auf (Halme et al., 1984; Liu & Hitchcock, 1986). Da es aber längst nicht in all diesen Fällen zur Entstehung einer Endometriose kommt, muss es weitere Faktoren geben, die eine erfolgreiche Einnistung des endometrialen Gewebes begünstigen oder verhindern (Bulun, 2009). Auch das Vorhandensein von epithelialen und stromalen endometrialen Zellen in der peritonealen Flüssigkeit ist beschrieben. Dabei zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen Frauen mit und ohne Endometriose (Kruitwagen et al., 1991a; Dorien et al., 2017), was ebenfalls eine zusätzliche pathogenetische Komponente suggeriert. Beispielsweise wies die Menstruationsflüssigkeit von Frauen mit Endometriose eine verminderte Zahl von natürlichen Killerzellen auf (Warren et al., 2018).

Die grundsätzliche Bedeutung der retrograden Menstruation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Frauen mit Endometriose oftmals retrograde Kontraktionsmuster des Myometriums aufweisen (Salamanca & Beltrán, 1995) und sich in der Folge quantitativ mehr Menstruationsblut in der Bauchhöhle nachweisen ließ (Halme et al., 1984). Darüber hinaus konnte im Tiermodell mit Pavianen eine Endometriose durch Ligatur der Cervix induziert werden und es gibt Fallberichte von erkrankten Frauen mit obstruiertem uterinen Ausflusstrakt (Giudice & Kao, 2004). Weiterhin kann auch die anatomische Verteilung der endometriotischen Herde, sowie deren vermehrt linksseitiges Vorkommen als ein mechanistisches Argument für die Theorie der refluxiven Menstruation angesehen werden (Jenkins et al., 1986; Scioscia et al., 2011).

Einen häufigen Kritikpunkt der Transplantationstheorie stellt das Vorkommen extraperitonealer Endometriose (Alifano et al., 2006) dar, welche nicht durch lokale

Zellverschleppung erklärt werden kann. Eine aktuelle Analyse von früheren Arbeiten Sampsons zeigte jedoch, dass dieser bereits damals die Möglichkeit einer vaskulären Ausbreitung aufgezeigt hatte (Yovich et al., 2020).

1.6.2 Metaplasietheorie

Die (Zölom-) Metaplasietheorie sieht das pluripotente Zölomepithel als Ausgangspunkt für endometriotische Läsionen. Dabei wird vermutet, dass es – beeinflusst durch endogene und exogene Faktoren – zu einer metaplastischen Umwandlung von Mesothel in endometriotische Läsionen kommt (Nap et al., 2004). Zur Unterstützung dieser These wurden in der Vergangenheit Fallberichte angeführt, in denen es auch bei fehlender Menstruation, zum Beispiel im Rahmen eines Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndroms, zu einer Endometriose gekommen war (Nisolle & Donnez, 1997; Mok-Lin et al., 2010). Allerdings zeigte sich, dass die jeweilige Evidenz für einen vollständig fehlenden Uterus oftmals schwach war, und damit jene Fallberichte für eine Ablehnung der Transplantationstheorie einerseits und den damit postulierten Beweis der Metaplasietheorie andererseits unzureichend sind (Konrad et al., 2019b).

Einen weiteren Hinweis für die Notwendigkeit eines eutopen Endometrium bei der Entstehung einer Endometriose, lieferte eine Studie bei der das Wiederauftreten endometriotischer Herde nach initialer operativer Sanierung untersucht wurde. Während bei 64 % der Patientinnen in einer Kontrollgruppe nach 24 Monaten ein Rezidiv auftrat, konnte diese Rate durch eine endometriale Ablation im Rahmen der ersten Operation auf 0 % gesenkt werden (Bulletti et al., 2001).

Auf Basis der Metaplasietheorie durch pluripotentes Zölomepithel müsste man darüber hinaus auch ein regelmäßiges Auftreten bei Männern sowie außerhalb der Bauchhöhle erwarten (Young et al., 2013).

1.6.3 Tissue injury and repair (TIAR) Konzept

Das Modell des *Tissue injury and repair*, also das Ablaufen von Gewebsverletzung und konsekutiver Wiederherstellung, von Leyendecker und Wildt (2011) geht von einer gemeinsamen Pathogenese der drei Entitäten der Endometriose sowie der Adenomyose aus. Als Ausgangspunkt der Erkrankung wird ebenfalls der Uterus und dabei speziell die Archimetra, also der phylo- und ontogenetisch älteste Teil, bestehend aus Endometrium und darunterliegendem Stratum subvasculare des Myometrium, angesehen. Im Mittelpunkt steht jeweils eine Traumatisierung im Bereich der endometrialen-myometrialen Schnittstelle. Diese kann als sogenannte „first step injury“ auf

Einleitung

mikroskopischer Ebene stattfinden und durch mechanische Belastung von Fibroblasten und Myozyten insbesondere im Bereich der fundo-cornualen Raphe zur Freisetzung von Gewebsmediatoren und Estradiol führen. Letzteres verursacht eine lokale Entzündungsreaktion und Hyperperistaltik des Uterus, welche wiederum als „second-step injury“ durch Scherkräfte zu erneuter Traumatisierung des Gewebes führt. Ähnlich wie die Transplantationstheorie, sieht auch das TIAR Konzept einen transtubaren Transport der auf diese Weise abgeschilferten Zellen als verantwortlich für die Dissemination in die Bauchhöhle. Dieser wird möglicherweise noch durch eine Zunahme von retrograden peristaltischen Wellen während der Menstruation begünstigt (Bulletti et al., 2000).

Alternativ können auch iatrogene Gewebsverletzungen die Dislokation von basalem Endometrium zur Folge haben. Dabei führt der Zyklus aus TIAR, konsekutiver chronischer Entzündung und infiltrativem Wachstum zur Entstehung endometriotischer Herde (Leyendecker & Wildt, 2011).

1.6.4 Stammzell und Progenitorzellhypothese

Die Stammzell und Progenitorzellhypothese geht ebenfalls von einer retrograden, transtubaren Zellverschleppung in die Bauchhöhle aus. Während andere Konzepte diesen Vorgang während der Menstruation und damit erst nach Erreichen der Geschlechtsreife verorten, wird hier von einem Geschehen bereits in der Neonatalperiode ausgegangen. Begünstigt durch eine verhältnismäßig lange Cervix sowie deren funktionellen Verschluss durch Mucus, kommt es zu retrograder Blutung und Transport abgeschilfter Zellen (Brosens et al., 2013). Es wird davon ausgegangen, dass sich darunter auch endometriale Stamm und Progenitorzellen befinden, welche sich in der Bauchhöhle anheften und dort in einer Art Ruhezustand über lange Zeit verharren. Kommt es im Rahmen der Thelarche zum Ansteigen von Estrogen, könnten diese aktiviert und zur Bildung endometriotischer Läsionen veranlasst werden (Gargett et al., 2014).

1.6.5 Endometriotic disease theory

Die Transplantations- und die Metaplasietheorie versuchen zu beschreiben, wie es zum Entstehen von endometriotischen Herden außerhalb des Cavum uteri kommen kann. Dies erklärt jedoch nicht die erheblichen Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung. Einige Autoren schlagen daher vor, das Vorkommen von oberflächlichen Endometrioseherden als einen im weiteren Sinne physiologischen Zustand aufzufassen und vielmehr zu untersuchen, wie daraus ein „endometriotic

Einleitung

disease“ mit tief infiltrierenden und zystischen Läsionen wird (Koninckx et al., 1999). In Analogie zu einer malignen Transformation bei benignen Tumoren rücken hier statt der initialen Entstehung des Affekts dessen Progress hin zu einem stärker invasiven und destruktiven Charakter und die dafür ursächlichen Veränderungen auf zellulärer Ebene in den Fokus. Neben dem Einfluss des Peritoneums und seiner Sekrete könnten hier vor allem genetische Veränderungen von entscheidender Bedeutung sein (Koninckx et al., 1999). Einen weiteren möglichen Faktor stellen epigenetische Veränderungen dar, deren Einfluss auf die Entstehung eines „endometriotic disease“ aktuell untersucht werden (Koninckx et al., 2019).

Bis heute ist die Pathogenese der Endometriose nicht abschließend geklärt. Da keine der vorgestellten Theorien alle Facetten dieser Erkrankung suffizient zu erklären vermag, scheint auch ein Zusammenwirken von verschiedenen Pathomechanismen möglich. Eine Klärung des Krankheitsursprungs bleibt damit ein essentielles Ziel der Forschung, um – durch ein besseres Verständnis ihrer Entstehung – der Endometriose präventiv und therapeutisch entgegenzutreten zu können.

1.7 Analyse von drei Strukturproteinen in der Endometriose

Das Erscheinungsbild als auch die Eigenschaften einer Zelle werden durch ihre Ausstattung mit Proteinen bestimmt. Sie sind die Bausteine für die physische Struktur und die Werkzeuge, welche sämtliche biologischen Prozesse – wie Bewegung, den Transport anderer Moleküle und die Verstoffwechslung von Nährstoffen – erst ermöglichen. Daher spielen Proteine auch in der Erforschung von Krankheiten eine zentrale Rolle, um zu verstehen, wie pathologische Prozesse vonstatten gehen und inwiefern sich krankes von gesundem Gewebe unterscheidet. Auch diese Arbeit versucht, durch die Analyse von Proteinen die Zellen des Endometriums und der endometriotischen Läsionen weiter zu charakterisieren und damit Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufzuzeigen, welche für die Pathogenese der Endometriose relevant sind. Der Fokus liegt dabei auf Proteinen des Zytoskeletts und der Verbindung mit anderen Zellen, da die hierdurch maßgeblich beeinflusste Integrität von Zellverbänden als entscheidend für die Ablösung und konsekutive Disseminierung endometriotischer Zellen zu sehen ist. Zusätzlich wurden für diese strukturellen Proteine bereits in Microarray Analysen auf Genexpressionsebene Unterschiede zwischen Endometrium und endometriotischen Läsionen beobachtet (Sohler et al., 2013) und eine Beteiligung in der Pathogenese der Endometriose postuliert (Grund & Grümmer, 2018).

1.7.1 Das Intermediärfilament Vimentin

Vimentin gehört zur Gruppe der Intermediärfilamente. Diese haben einen Durchmesser von etwa 10 nm und bilden gemeinsam mit den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli das Zytoskelett einer Zelle. Durch Verankerung an der Zellmembran über andere Zelladhäsionsproteine wie Desmosomen und Hemidesmosomen ermöglichen sie die mechanische Stabilität und Elastizität. Es gibt eine Vielzahl von Intermediärfilamenten, welche oftmals gewebsspezifisch exprimiert werden (Heinrich et al., 2014). Dies wird in der Pathologie genutzt, um beispielsweise Einschätzungen über das Ursprungsgewebe von Tumoren zu treffen (Kirchner et al., 2014). Die Superfamilie der Intermediärfilamente lässt sich in 5 Klassen unterteilen, wobei Vimentin, gemeinsam mit Desmin, Glial fibrillary acidic protein (GFAP) und Peripherin zum Typ III gezählt wird (Heinrich et al., 2014). Vimentin wird vornehmlich von mesenchymalen Zellen sowie verschiedenen Tumoren exprimiert (Fuchs & Weber, 1994).

Ein biologischer Vorgang, der bei zahlreichen physiologischen Prozessen wie Wundheilung sowie Gewebsentwicklung und Regeneration, aber auch pathologischen Vorgängen wie Entzündung, Tumorgenese und Fibrose eine Rolle spielt, ist die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) (Thompson & Newgreen, 2005; Thiery et al.,

Einleitung

2009; Chui, 2013). Es handelt sich dabei um einen Wechsel des Zellphänotyps, der durch den Verlust von epithelialen und den Zugewinn mesenchymaler Eigenschaften definiert ist (Thompson & Newgreen, 2005). Auf molekularbiologischer Ebene zeigt sich damit eine Abnahme der epithelialen Marker wie Keratin, Mucin und E-Cadherin (Guarino et al., 2009; Chui, 2013; Tarin, 2013) bei gleichzeitig vermehrtem Vorkommen von mesenchymalen Markern wie Vimentin, S100A4, Slug, Snail, transforming growth factor- β s (TGF- β s) und zinc-finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) (Mazzucchelli, 2002; Guarino et al., 2009; Chui, 2013; Zhang et al., 2015). In der Folge kommt es zu einer Störung von Zell-Zell-Kontakten und der Zellpolarität, was zu einer vermehrten Zell-Motilität und verstärkten Invasions- und Metastasierungsfähigkeit führt (Thompson & Newgreen, 2005; Chui, 2013). Es gibt aber auch Untersuchungen, die das Konzept der Epithelial-Mesenchymalen Transition bei der Tumorgenese (Chui, 2013; Tarin, 2013), Metastasierung (Fischer et al., 2015) oder auch der Nierenfibrose (Kriz et al., 2011) kritisch betrachten. Da auch bei der Endometriose Invasivität und die Fähigkeit zur Metastasierung beobachtet wird, liegt es nahe, dass das Konzept der Epithelial-Mesenchymalen Transition auch bei dieser Erkrankung in Erwägung gezogen wird. Es wurden insbesondere auf Ebene der messenger RNA (mRNA), eine Herabregulierung von epithelialen Markern wie Keratinen und E-cadherin (Matsuzaki & Darcha, 2012; Bartley et al., 2014) und eine vermehrte Expression von Markern der EMT wie N-cadherin, Twist, Snail, Vimentin, S100A4, TGF- β s und besonders ZEB-1 gezeigt (Mazzucchelli, 2002; Matsuzaki & Darcha, 2012; Young et al., 2013; Bartley et al., 2014; Furuya et al., 2017).

Da sich jedoch manche dieser Ergebnisse bei Vorversuchen am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Gießen auf Ebene der Proteinexpression nicht reproduzieren ließen, soll in dieser Arbeit die Proteinlokalisierung von Vimentin und damit eine mögliche Beteiligung der Epithelial-Mesenchymalen Transition in der Pathogenese der Endometriose untersucht und evaluiert werden.

1.7.2 Die Zell-Zell Kontaktproteine Claudin-11 und Claudin-7

Die Aufgabe von Epithelien und ihrer Zellen besteht in der Abgrenzung des Körpers zu seiner Umgebung. Als dichte Barrieren stehen sie damit in direktem Kontakt zur Außenwelt und schützen vor schädlichen Einflüssen der Umwelt, wie dem Eindringen von Mikroorganismen. Hierzu sind die Epithelzellen polar aufgebaut. Ihr apikaler Pol weist nach außen und erfüllt die Aufgabe der Abgrenzung, während die basalen und lateralen Zellseiten die Verbindung zu den anderen Zellen und dem Rest des Körpers bilden. Hierzu ist die Plasmamembran mit jeweils unterschiedlichen Proteinen und Lipiden ausgestattet, deren Trennung und damit Aufrechterhaltung der Zellpolarität durch die sogenannten tight junctions gewährleistet wird (Heinrich et al., 2014).

Die wesentlichen Bestandteile dieser Einheiten bilden die Claudine, welchen die Strangbildung und Barrierefunktion zugeschrieben wird (Rosenthal et al., 2017). Die Claudin-Familie umfasst etwa 23 Proteine, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich kombiniert auftreten und damit die Dichtigkeit und Selektivität der tight junctions beeinflussen (Hewitt et al., 2006). Die Claudine -1,-3,-5,-11,-14 und 19 haben eindeutig abdichtende Qualitäten, während Claudin -2, -10a/b, -15 und -17 kanalbildende Eigenschaften aufweisen und Claudin -4, -7, -8 und 16 beide Eigenschaften aufweisen (Schulzke et al., 2012).

Die Regelmäßigkeit der Expression dieser Proteine scheint für die physiologische Funktion einer Zelle von großer Wichtigkeit zu sein. So konnten bei verschiedenen pathologischen Veränderungen wie neoplastischem Wachstum und Progression veränderte Auftretensmuster von Claudinen beobachtet und Einflüsse auf das Überleben der Patienten – aufgrund von veränderten Metastasierungs- und Invasivitätspotentialen – gezeigt werden (Singh et al., 2017). Die Claudine, deren Dysregulation am häufigsten in Zusammenhang mit malignen Tumoren gebracht wird, sind Claudin-1, -3, -4, -5, -7, -10 und -16 (English & Santin, 2013).

Dabei sind für die einzelnen Proteine oft heterogene oder teilweise sogar gegensätzliche Auswirkungen beschrieben. Während Claudin-7 beim Kolonkarzinom die Invasivität und den Progress bremst (Bhat et al., 2015), verstärkt es im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus die Zellproliferation und Metastasierungsfähigkeit (Lioni et al., 2007) und kann damit sowohl Tumor-Promotor als auch Repressor sein. Auch für das Ovarialkarzinom sind Einflüsse durch Claudin-7 beschrieben. Eine Überexpression bedeutete hier zwar einerseits eine Verringerung der Zellmigration, resultierte jedoch durch eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen in einer vermehrten Invasivität der Zellen (Dahiya et al., 2011).

Einleitung

Eine Besonderheit von Claudin-7 besteht in seiner starken Expression im Bereich der basolateralen Abschnitte der Zellmembran und damit außerhalb der für Claudine typischen tight junctions (Ding et al., 2012). Im Mausmodell konnten für Claudin-7 entsprechend auch nicht mit tight junctions assoziierte Funktionen wie die Unterhaltung von Zell-Matrix Interaktionen im Epithel und die Aufrechterhaltung der intestinalen Homeostase nachgewiesen werden (Ding et al., 2012).

Im gesunden humanen Endometrium wird Claudin-7 regelhaft exprimiert (Gaetje et al., 2008), ist aber auch bei malignen Erkrankungen beteiligt. So konnte für das Endometriumkarzinom eine Herabregulierung nachgewiesen werden, welche zu vermehrter Proliferation und Metastasierung führte (Li et al., 2013).

Claudin-11 spielt eine zentrale Rolle beim Aufbau der Blut-Hoden Schranke und ist an der Regulation des Zellzyklus sowie der Zellmigration beteiligt (Morrow et al., 2010). Es ist damit von entscheidender Bedeutung bei der physikalischen Abgrenzung von Zellen und Geweben und hat Einflüsse auf proliferative Prozesse. So wurde bei verschiedenen malignen Erkrankungen wie dem hepatozellulären Karzinom (Yang et al., 2015), dem malignen Melanom (Walesch et al., 2015), dem Magenkarzinom (Lin et al., 2013) oder auch dem Plattenepithelkarzinom der Haut (Nissinen et al., 2017) eine Deregulierung beobachtet.

Anders als die Claudine-6, -8, -9, -11, -14, sowie -16 bis -18, wurden die Claudine-1, -3, -4, -5, -7 und -10 bereits im humanen Endometrium beschrieben (Gaetje et al., 2008; Pan et al., 2009; Schumann et al., 2015). Bei der Endometriose zeigten sich Claudin-3 und -7 in den Läsionen herabreguliert. Für Claudin-5 wurden zwar verminderte Mengen an messenger RNA (mRNA) nachgewiesen, allerdings waren die Proteine vermehrt vorhanden (Gaetje et al., 2008).

1.8 Formulierung der Fragestellung und Zielsetzung

In der Summe bedingen die hohe Prävalenz der Endometriose, ihre nach wie vor nicht vollständig geklärte Ätiologie und Pathogenese, die Komplexität ihrer Symptomatik sowie das Fehlen kausaler Therapieoptionen einen dringenden Bedarf für eine weitergehende Erforschung dieses Krankheitsbildes.

Diese Arbeit versucht hierzu einen Beitrag zu leisten, indem durch eine Analyse von Expressionsprofilen verschiedener Proteine die Biologie dieser Erkrankung weiter charakterisiert wird. Ein besseres Verständnis von ätiologischen Prozessen kann dann die Grundlage für die weitere Verbesserung oder auch Neuentwicklung von diagnostischen, therapeutischen oder sogar präventiven Verfahren bilden.

Bei der Endometriose liegt der Vergleich mit malignen Erkrankungen aufgrund ihrer metastatischen und invasiven Eigenschaften nahe. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit Proteine und Zelleigenschaften untersucht, die bei verschiedenen Krebserkrankungen eine Rolle spielen. Es werden zum einen das Ursprungsgewebe, also das eutope Endometrium des Uterus, zum anderen die verschiedenen Entitäten der Endometriose vergleichend analysiert. Durch die Beschreibung von Unterschieden und Gemeinsamkeiten, sollen Erkenntnisse über pathogenetische Mechanismen gewonnen werden. Die Expression der Proteine wird dabei sowohl quantitativ, als auch qualitativ erfasst.

Hierdurch soll geklärt werden, ob es sich bei endometriotischen Läsionen um zwar disloziertes, aber biologisch dem eutopen Endometrium entsprechendes Gewebe handelt, oder ob es in den dystopen Herden auch zu einer grundlegenden Veränderung auf zellulärer Ebene kommt.

Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem von einer Vielzahl von Autoren beschrieben Verlust des epithelialen Phänotyp endometriotischer Zellen. Durch die Analyse des Intermediärfilaments Vimentin, sowie einer Beurteilung der Zell-Zell Kontakte anhand von Claudin-11 und -7, soll diese Hypothese überprüft werden und eine – möglicherweise partielle – EMT eruiert werden.

Neben einer weiteren Beleuchtung der Pathogenese der Endometriose wird außerdem der Versuch unternommen, durch die Bestimmung von Claudin-7 Spiegeln im Blutserum, einen nicht-invasiven diagnostischen Test auf das Vorhandensein einer Endometriose zu entwickeln. Da derzeit die Diagnose nur operativ gestellt werden kann, wäre ein zuverlässiger Bluttest eine außerordentlich wertvolle Möglichkeit, therapeutische Entscheidungen treffen zu können, ohne die Patientin dem Risiko einer Operation auszusetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer Datenbank gesammelte Gewebe- und Blutproben von Patientinnen mit Endometriose sowie einer Kontrollgruppe untersucht. Hierzu wurde im Jahr 2009 die Zustimmung der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen eingeholt (95/09). Die Patientinnen und Probandinnen willigten unter ärztlicher Aufsicht mittels eines Aufklärungsbogens schriftlich in die Probenentnahme ein und waren über die Teilnahme an einem Forschungsvorhaben informiert und damit einverstanden.

2.1.1 Gewebeproben

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Justus-Liebig-Universität mittels operativer Laparoskopie gewonnen. Die pathologische Bewertung der entnommenen Gewebe erfolgte durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen (Direktor: Prof. Dr. S. Gattenlöhner) und umfasste neben einer makroskopischen und mikroskopischen Beschreibung der Präparate eine abschließende histologische Beurteilung sowie etwaige Hinweise auf Malignität. In einzelnen Fällen wurde dabei zur Bestätigung der Diagnose Endometriose zusätzlich ein immunhistochemischer Nachweis für CD10 durchgeführt. Anhand des pathologischen Gutachtens erfolgte dann die Selektion der Patientinnen für die vorliegende Studie.

Die in dieser Arbeit untersuchten Präparate setzen sich aus den folgenden Gruppen zusammen: Endometrien von an Endometriose erkrankten Frauen, ovarieller Endometriose, peritonealer Endometriose und tief infiltrierender Endometriose. Diese Gruppierung entspricht der gängigen Unterteilung der Erkrankung in die verschiedenen Entitäten (Nisolle & Donnez, 1997). Als Kontrollgruppe wurden endometriale Proben von Frauen ohne bekannte Endometriose verwendet (Tab. 2 + 3).

Weiterhin wurden für die endometrialen Proben der jeweilige Zyklustag der Frauen zum Entnahmezeitpunkt mittels eines Fragebogens erfasst und so eine Bestimmung der Zyklusphase ermöglicht. Die daraus folgende Einteilung in Proliferations- bzw. Sekretionsphase wurde zusätzlich histologisch verifiziert. Die Einstufung einer Probe als tief infiltrierende Endometriose erfolgte intraoperativ anhand der ENZIAN-Klassifikation (Tuttlies et al., 2005; Haas et al., 2013).

Die Tabellen 2 und 3 geben einen Überblick über das verwendete Patientenkollektiv. Dabei unterscheidet sich die Kohorte, die zur Analyse von Vimentin verwendet wurde,

Material und Methoden

von derjenigen, die für Claudin 11 und 7 benutzt wurde. Für letztere wurden ausschließlich Bouin-fixierte Proben verwendet, da es bei Formalin-fixierten Proben zu einer unzureichenden Detektion des Proteinmusters kam.

Tabelle 2: Kohorte zur Untersuchung von Vimentin

	Endometrium ohne Endometriose	Endometrium mit Endometriose	Ovarielle Endometriose	Peritoneale Endometriose	Tief infiltrierende Endometriose
Patientinnen (Proben)	n=20 (20)	n=30 (30)	n=29 (30)	n=25 (27)	n=21 (21)
Altersmedian (±SEM)	41 (±1,5)	41,5 (±1,2)	33 (±1,2)	31 (±0,9)	31 (±1,1)
Zyklusphase	Proliferativ=8 Sekretorisch=12	Proliferativ=15 Sekretorisch=15			
Lokalisation der Proben					
Blase				5	2
Plica vesicouterina				3	
Lig. sacrouterinum				1	5
Fossa ovarica				3	
Douglasraum				5	1
Lig. Rotundum				1	
Peritoneum				3	
Lig. infundibulum pelvicum				1	1
Beckenwand				1	
Rectum					4
Rectosigmoid					2
Septum rectovaginale				1	3
Paraureteral				1	1
Colon sigmoideum					1
Darm					1
Mesovarium				1	
Lig. latum uteri				1	

n= 29 (30) bedeutet 30 Proben von insgesamt 29 Patientinnen; Lig. = Ligamentum; SEM = Standardfehler

Material und Methoden

Tabelle 3: Kohorte zur Untersuchung von Claudin-11 & 7

	Endometrium ohne Endometriose	Endometrium mit Endometriose	Ovarielle Endometriose	Peritoneale Endometriose	Tief infiltrierende Endometriose
Patientinnen (Proben)	n=18 (18)	n=31 (31)	n=19 (20)	n=16 (17)	n=23 (25)
Altersmedian (\pm SEM)	40,5 (\pm 1,6)	42 (\pm 1,3)	34 (\pm 0,8)	32 (\pm 1,0)	32 (\pm 1,0)
Zyklusphase	Proliferativ=9 Sekretorisch=9	Proliferativ=16 Sekretorisch=15			
Lokalisation der Proben					
Blase					2
Plica vesicouterina				2	
Lig. sacrouterinum					3
Fossa ovarica				2	
Douglasraum				3	1
Lig. Rotundum				1	
Peritoneum				3	1
Lig. infundibulum pelvicum				1	
Rectum					8
Rectosigmoid					2
Septum rectovaginale				1	3
Paraureteral				1	
Colon sigmoideum				1	1
Darm					2
Mesovarium				1	
Lig. latum uteri				1	
Pararectal					1
Vagina					1

n= 19 (20) bedeutet 20 Proben von insgesamt 19 Patientinnen; Lig. = Ligamentum; SEM = Standardfehler

2.1.2 Serumproben von Patientinnen ohne und mit Endometriose

In dieser Studie wurden Serumproben von Patientinnen mit bestätigter Endometriose sowie einer Kontrollgruppe ohne Endometriose untersucht. Hierunter wurden dabei Frauen gezählt, bei denen noch nie eine Endometriose diagnostiziert worden war und die weiterhin keine symptomatische Dysmenorrhoe angaben. Hierzu wurde im Rahmen des Aufnahmefragebogens die Stärke der Menstruationsbeschwerden anhand einer Skala von 0 (keine Schmerzen) bis 10 (stärkster vorstellbarer Schmerz) erfasst.

Das Blut wurde in Serum-Röhrchen abgenommen, aufgestellt und über Nacht bei 4°C gelagert. Das geronnene Vollblut wurde dann bei 1000 x g für 15 Minuten zentrifugiert, das überstehende Serum abpipettiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Serumproben

	Patientinnen	Kontrollgruppe
n	36	28
Altersmedian (\pm SEM)	34 (\pm 1,1)	27,5 (\pm 1,7)
Dysmenorrhoe (\pm SEM)	4,0 (\pm 0,7)	1,3 (\pm 0,4)

2.1.3 Puffer und Chemikalien

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Chemikalien mit ihrer jeweiligen Herstellung aufgeführt.

Tabelle 5: Puffer und Chemikalien

Puffer	Präparation	Hersteller
Antikörper Diluent	vorgefertigt	Dako
Bouin´sche Lösung	vorgefertigt	Morphisto, Frankfurt
BSA-Puffer	1g Albumin Fraktion V in 70ml PBS-Puffer mit 21µl Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe Gibco, Waltham, USA Merck, Darmstadt
Citratpuffer	29,41g Trinatriumcitrat-Dihydrat in Aqua dest. Einstellung auf pH=6,0 mit Citronensäure (0,1mol)	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
DAB-Lösung	1 Tropfen DAB-Chromogen in 1ml Substrat Puffer	Dako, Santa Clara, USA
Ethanol	Ethanol (MEK-vergällt) Verdünnt mit Aqua dest.	Fa. Otto Fischar
Eukitt	vorgefertigt	Fluka Analytical

Blockierungslösung	5 ml H ₂ O ₂ (30 %) 45 ml Methanol (-20°C)	Carl Roth, Karlsruhe Sigma, St. Louis, USA
Hämatoxylin (Mayer, ungesäuert)	vorgefertigt	Waldeck, Münster Morphisto, Frankfurt
Neo Clear	vorgefertigt	Merck, Darmstadt
PBS	2 Tabletten in 1l Aqua dest.	Gibco, Waltham, USA
Xylol (100 Vol %)	vorgefertigt	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.4 Antikörper

Im Folgenden sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt. Für erstere sind zusätzlich die entsprechenden Färbezeiten mit der DAB-Substrat Lösung sowie die entsprechende Verdünnung mit Antikörper Diluent angegeben.

Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Klonalität	Färbezeit	Verdünnung	Hersteller
Mausantikörper gegen Vimentin	Monoklonal	70 Sekunden	1/200	Dako, Santa Clara, USA
Kaninchenantikörper gegen Claudin-11	Polyklonal	75 Sekunden	1/100	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mausantikörper gegen Claudin-7	Monoklonal	80 Sekunden	1/100	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sekundärantikörper				
Ziegen Anti-Maus	IgG	EnVision-System-HRP	vorgefertigt	Dako, Santa Clara, USA
Ziegen Anti-Kaninchen	IgG	EnVision-System-HRP	vorgefertigt	Dako, Santa Clara, USA

2.1.5 ELISA-Kit

Für die Messung des Claudin-7 Gehalts im Serum wurde das Human Claudin-7 (CLDN7) ELISA Kit der Firma CUSABIO (College Park, USA) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

2.1.6 Geräte

Die folgende Tabelle listet die für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte, Computerprogramme sowie sonstige Materialien auf.

Tabelle 7: Laborgeräte, Computerprogramme und sonstigen Materialien

Gerät	Hersteller
Aqua dest Anlage: Elix 3	Merck Millipore, Darmstadt
Befundungsmikroskop: Dialux 20	Leica, Wetzlar
DAKO-PEN (Best Nr. S 2002)	DAKO
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen
Paraffin-Einbettungsautomat TP 1050	Leica, Wetzlar
Eis Maschine Flake line	Wessamat, Kaiserslautern
Pipetten Finntips Flex 1200	ThermoScientific, Waltham, USA
Feuchte Kammern	
Fotomikroskop DM 2000 LED	Leica, Wetzlar
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe
Gourmet Garer MultiGourmet	Braun, Kronberg im Taunus
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, La Jolla, USA
Inkubator Hera Therm	ThermoScientific, Waltham, USA
Inkubator Kendro UT12	Heraeus, Hanau
Kamera MC 170 HD	Leica, Wetzlar
Leica Application Suite LAS Version 4.9.0	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Leitz Laborlux S	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
Mikroskop Laborlux S	Leitz, Wetzlar
Mini-Zentrifuge: Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Mischer: RH digital KT/C	IKA, Staufen im Breisgau
Multipipette Finnpipette	ThermoScientific, Waltham, USA
Objektträger "SuperFrost Plus"	Langenbrinck, Emmendingen
Paraffineinbettungsautomat TP1050	Leica, Wetzlar
pH-Meter CG 841	Schott, Mainz
Tecan infinite M200 ELISA plate reader	TECAN, Crailsheim
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal
Pipetten: Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Rotationsmikrotom	Leica, Wetzlar
Serum-Röhrchen (7,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttler: VIBRAX-VXR	IKA, Staufen im Breisgau
Timer	TFA Dostmann, Wertheim
Transferpipette-8, 30-300µl	Brand, Wertheim
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Waage: 1219 MP	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta/RPC	Hettich, Tuttlingen

2.2 Methoden

2.2.1 Paraffinschnitte

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurden die Gewebeproben noch im Operationssaal in Bouin'sche Lösung überführt und anschließend auf einem Rollbrett bewegt, um eine gleichmäßige Fixierung zu erreichen. Nach 48 Stunden wurde die Bouin'sche Lösung abgekippt und das Gewebe mit Ethanol (70 Vol %) gespült. Dies wurde an den drei darauffolgenden Tagen wiederholt. Danach lagerte das Gewebe bis zur weiteren Aufbereitung bei Raumtemperatur in Ethanol (70 Vol %). Die Einbettung erfolgte dann in einem Einbettautomaten nach dem in Tabelle 8 beschriebenen Programm:

Tabelle 8: Protokoll des Paraffin-Einbettungsautomaten

Arbeitsschritt	Anzahl	Zeit	Temperatur	Medium
Entwässerung	1x	2 h	RT	Ethanol (80 Vol %)
	1x	2 h	RT	Ethanol (96 Vol %)
	3x	3 h	RT	Ethanol (100 Vol %)
Klärung	1x	1 h	RT	Xylol (100 Vol %)
	2x	45 min	RT	Xylol (100 Vol %)
Einbettung	3x	40 min	59°C	Paraffin

RT= Raumtemperatur

Die in Paraffin eingebetteten Gewebebiopsien wurden vor dem Schneiden über Nacht bei 4°C gekühlt und anschließend mit einem Rotationsmikrotom zu 5µm dünnen Serienschnitten verarbeitet. Diese wurden zum Glätten in ein 45°C warmes Streckbad aus destilliertem Wasser überführt und von dort aus auf die „Super Frost Plus“ Objektträger aufgebracht.

Der Teil der Proben, der uns freundlicherweise vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt worden war, war anstelle des Bouins in Formalin fixiert und wurde ansonsten analog verarbeitet.

Die Auswahl von Proben, die für eine Beurteilung von eutopen endometrialen beziehungsweise ektopen endometriotischen Epithelzellen geeignet waren, erfolgte anhand von Serienschnitten, die mit HE und bei Verfügbarkeit mit MUC1, einem Antikörper zum Nachweis eines von endometrialen Epithelzellen exprimierten Proteins (Gronbach, 2015), gefärbt waren.

2.2.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Detektion von Proteinen. Das Prinzip beruht dabei auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers an ein Antigen, dem Epitop des Proteins. Diese Antigen-Antikörper Bindung muss hochaffin und hochspezifisch sein, um einen exakten Nachweis des Proteins zu ermöglichen. Die Visualisierung des Antikörpers und damit des gebundenen Proteins kann auf verschiedene Arten erfolgen. Bei der direkten Methode ist der Antikörper mit einem Markerenzym oder Fluorochrom gekoppelt und wird so sichtbar gemacht. Bei indirekten oder zweischrittigen Methoden wird, nach Bindung an das Protein, der Primärantikörper von einem Sekundärantikörper, der gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist, erkannt. Dieser ist dann seinerseits mit einem Enzym oder Fluorochrom konjugiert. In dieser Arbeit wurde das EnVision+™ System der Firma Dako verwendet. Bei diesem zweischrittigen Verfahren ist der Sekundärantikörper an ein Polymer aus Dextran gekoppelt, welches wiederum mit einer Vielzahl des Enzyms HRP (*Horseradish-Peroxidase*) besetzt ist. Dieses reagiert mit der später zugesetzten Wasserstoffperoxid-Chromogen-3,3'-Diaminobenzidin (DAB)- Lösung und bildet durch Oxidierung ein braunes Endprodukt.

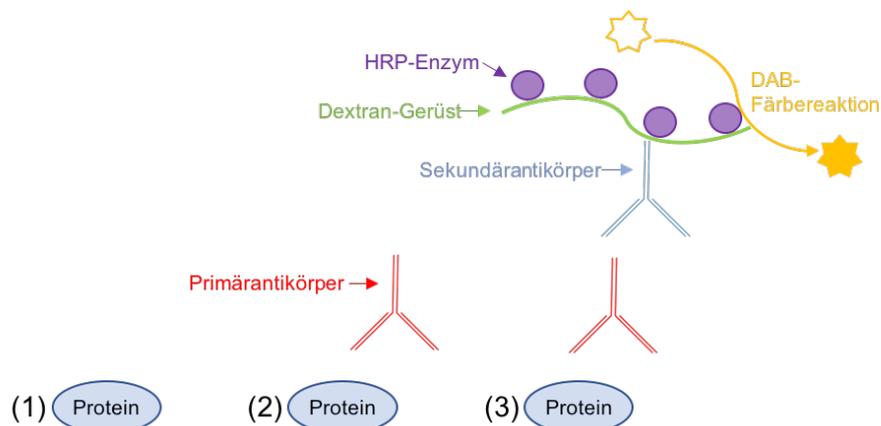


Abbildung 1: Prinzip der Immunhistochemie mit einem Polymer (Dextran) als Verstärker; HRP = Horseradish-Peroxidase; DAB = Diaminobenzidin

Anders als herkömmliche ABC- (*Avidin-Biotin-Complex*) oder L(S)AB (*Labeled-(Strept)-Avidin-Biotin*)-Verfahren kommt das Nachweissystem von Dako ohne Avidin und Biotin aus und vermeidet so unspezifische Färbereaktionen, die durch endogenes Biotin oder unspezifisch gebundenes Avidin ausgelöst werden können.

Zu Beginn müssen die Proben vorbehandelt werden. Das Gewebe wird zunächst vom Paraffin befreit und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die bei der Fixierung mit Bouin'scher Lösung oder Formalin entstandenen Quervernetzungen (*cross-links*) werden in einem nächsten Schritt durch ein Hitze-induziertes Antigen-Retrieval in Citratpuffer gelöst. Dies verbessert die Zugänglichkeit des Gewebes für die Antikörper.

Material und Methoden

Da die spätere Färbereaktion durch eine Peroxidase katalysiert wird, ist es außerdem notwendig, endogene Peroxidasen im Vorfeld zu blockieren. So wird gewährleistet, dass die spätere Braunfärbung allein durch die mittels Antigen-Antikörper Reaktion am nachzuweisenden Protein gebundene HRP verursacht worden ist.

Um mögliche Hintergrundfärbungen weiter zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit eine Blockierung mit BSA (*Bovines Serum Albumin*) durchgeführt. Dieses deckt unspezifische Bindungsstellen ab, indem es elektrostatische Ladungen der Proteine im Gewebe absättigt und dort eine unspezifische Anheftung der Antikörper unterbindet.

Das Gewebe wird abschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die resultierende Blaufärbung sorgt für einen deutlichen Kontrast zu den braun markierten Proteinen und ermöglicht so eine eindeutige Auswertung.

Protokoll der Immunhistochemie

Zu Beginn stand die Freilegung des Gewebes aus dem Paraffin. Hierzu wurden die Schnitte zunächst in NeoClear entparaffiniert und anschließend, wie in Tabelle 9 dargestellt, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Tabelle 9: Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten

Arbeitsschritt	Anzahl	Zeit	Temperatur	Medium
Entparaffinierung	1x	20 min.	40° C	NeoClear (100 %-ig)
	2x	20 min.	RT	NeoClear (100 %-ig)
Rehydrierung	2x	5 min.	RT	Ethanol (100 Vol %)
	2x	5 min.	RT	Ethanol (96 Vol %)
	2x	5 min.	RT	Ethanol (70 Vol %)
	1x	5 min.	RT	Aqua dest.

RT= Raumtemperatur

Zum Antigen Retrieval wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten bei 100°C in einem Citratpuffer bei pH= 6,0 erhitzt. Dieser Schritt wurde in einem Dampfgerat durchgeführt, in welchem zuvor der Citratpuffer bereits separat für 20 Minuten auf 100°C erhitzt worden war. Zur Abkühlung wurde der Puffer mitsamt den Objektträgern dem Dampfgerat entnommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal für je 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurde eine 3 %-ige H₂O₂-Methanol Lösung verwendet, in welcher die Schnitte für 30 Minuten geschüttelt wurden.

Material und Methoden

Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS-Puffer für dreimal je 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen auf den Gewebeschnitten blockiert, indem die Proben für 20 Minuten in einem BSA-Puffer geschüttelt wurden. Das hierin enthaltene Triton X100 zerstörte durch seine Detergenzwirkung zusätzlich die Integrität der Zellwände und machte so auch das Zellinnere für die Antikörper zugänglich.

Im Anschluss daran wurde überschüssiger BSA-Puffer durch Ablaufen auf Zellstoff entfernt. Die Objektträger wurden mit Zellstoff rund um das Gewebe abgewischt, welches dann mit dem DAKO-Pen umzeichnet wurde, um ein späteres Verlaufen von aufgetragenen Flüssigkeiten zu verhindern. Die Proben wurden nun mit der verdünnten Primärantikörperlösung (Tab. 6) überschichtet und inkubierten über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Zum Ausschluss von Artefakten wurden zusätzlich Negativkontrollen hergestellt, für die an dieser Stelle lediglich Antikörper Diluent ohne Antikörper verwendet wurde (Abb. 2).

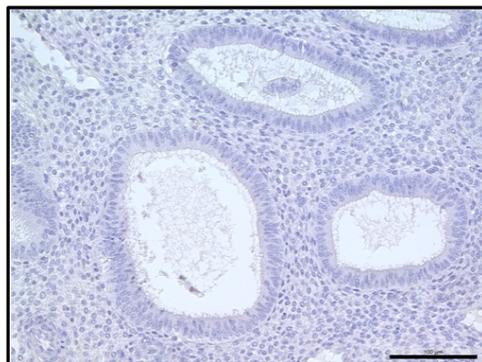


Abbildung 2: Negativkontrolle (Standardprotokoll ohne Zugabe eines Primärantikörpers); Endometrium einer Patientin mit Endometriose; Vergrößerung 200-fach, Größenmaßstab 100µm.

Am nächsten Tag wurde die Primärantikörperlösung auf Zellstoff abgekippt und die Schnitte dreimalig für 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und so von ungebundenem Primärantikörper befreit. Die Objektträger wurden wieder mit Zellstoff abgewischt, das Gewebe anschließend mit der Sekundärantikörperlösung (Tab. 6) überschichtet und in der feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Erneut ließ man die Schnitte auf Zellstoff ablaufen und spülte diese dreimal für 5 Minuten unter Schütteln mit PBS-Puffer. Für die Färbereaktion wurden die Objektträger dann wieder abgetupft und die Proben mit der Wasserstoffperoxid-Chromogen-3,3' Diaminobenzidin (DAB)-Lösung bedeckt. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde für jeden Antikörper einmalig die optimale Färbedauer bestimmt (Tab. 6) und im Folgenden für jede Patientenprobe exakt eingehalten, um eine objektive Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Zum Stoppen der Reaktion ließ man die DAB-Lösung auf Zellstoff

Material und Methoden

ablaufen und überführte die Objektträger in eine Küvette mit Aqua dest., womit die Schnitte im Folgenden auch dreimal je 5 Minuten gewaschen wurden.

Zur Gegenfärbung wurden die Proben im Anschluss in der feuchten Kammer für 5 Minuten mit ungesäuertem Hämatoxylin nach Mayer bedeckt. Dieses wurde dann mit Aqua dest. abgespült und die Objektträger wurden in eine Glasküvette mit Leitungswasser gestellt. Die Bläuungsreaktion erfolgte unter fließendem Leitungswasser über 10 Minuten.

Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanol-Lösung dehydriert und mit Xylol versetzt (Tab. 10). Zum Auflocken wurden die Objektträger mit Präzisionswischtüchern abgewischt, das Gewebe mit einem Tropfen des Eukitt-Mediums überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Tabelle 10: Protokoll zur Dehydrierung und Eindeckung der Gewebeschnitte

Arbeitsschritt	Anzahl	Zeit	Temperatur	Medium
Dehydrierung	2x	2 min.	RT	Ethanol (70 Vol %)
	2x	20 min.	RT	Ethanol (96 Vol %)
	2x	5 min.	RT	Ethanol (100 Vol %)
Lösung	2x	5 min.	RT	Xylol (100 Vol %)
	2x	5 min.	RT	Xylol (100 Vol %)
Eindeckung			RT	Eukitt

RT= Raumtemperatur

Auswertung

Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurden die immunhistochemischen Färbungen anhand des *Histological SCORE* (HSCORE) ausgewertet. Dabei wird neben dem Anteil gefärbter Zellen in Prozent auch die Intensität der Färbung wie folgt berücksichtigt: Keine Färbung → 0; schwache Färbung → 1; deutliche Färbung → 2; starke Färbung → 3. (Ornek et al., 2008)

Der HSCORE errechnet sich schließlich gemäß folgender Formel:

$$HSCORE = (0 \times \%Zellen_{nicht}) + (1 \times \%Zellen_{schwach}) + (2 \times \%Zellen_{deutlich}) + (3 \times \%Zellen_{stark})$$

Für die Claudin-11 Proben erfolgte darüber hinaus noch eine Quantifizierung der Lokalisation der Färbung. Hierzu wurde ein Score entwickelt, in dem den verschiedenen Verteilungsmustern Punktwerte zugeteilt wurden, welche anschließend statistisch ausgewertet wurden. Wie an späterer Stelle erörtert wird, stellt das apikolaterale Verteilungsmuster die regelhafte Proteinlokalisierung von Claudin-11 in eutopem

Material und Methoden

Endometrium dar und erhielt entsprechend den höchsten Punktwert. Die anderen in Tabelle 11 aufgelisteten Muster stellen von diesem Regelfall differierende Formen dar und wurden mit zunehmender Abweichung entsprechend niedriger bewertet.

Tabelle 11: Scoringsystem für die Proteinlokalisierung von Claudin-11

Proteinlokalisierung	Punktwert	Proteinlokalisierung	Punktwert
Apikolateral	6	Basal/Lateral	3
Lateral, teilweise apikal	5	Basal	2
Lateral	4	Sonstiges	1
Apikal	4	Keine Färbung	0

2.2.3 Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay, oder kurz ELISA, ist ein etabliertes Verfahren zum quantitativen Nachweis von Proteinen in Flüssigkeiten. Ähnlich wie bei der zuvor beschriebenen Immunhistochemie beruht die Methode auf der hochaffinen und spezifischen Bindung von Antikörpern an Epitope der Proteine. Bei dem hier verwendeten „Sandwich-ELISA“ (Abb. 3) ist bereits das Reaktionsgefäß mit spezifischen, sogenannten Capture-Antikörpern (Abb. 3.1) beschichtet. Neben einem genormten Standard wird das zu untersuchende Medium in getrennte Vertiefungen zugegeben, und darin vorhandene Proteine binden an die Capture-Antikörper (Abb. 3.2). Daraufhin wird ein zweiter spezifischer Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist, hinzugefügt und bindet nun ebenfalls an die zuvor mittels Antikörpern fixierten Proteine (Abb. 3.3). Als nächstes wird das Enzym HRP (*Horseradish-Peroxidase*) zugegeben. Dieses ist an das Glykoprotein Avidin gekoppelt, welches Biotin bindet und so das Enzym mit dem Antikörper-Protein-Komplex verknüpft (Abb. 3.4). Durch Zugabe einer Substratlösung kommt es im Folgenden zu einer Farbreaktion, die proportional zur Menge des gebundenen Proteins ist (Abb. 3.5). Die Reaktion wird schließlich gestoppt und durch eine photometrische Messung im ELISA-Reader quantifiziert.

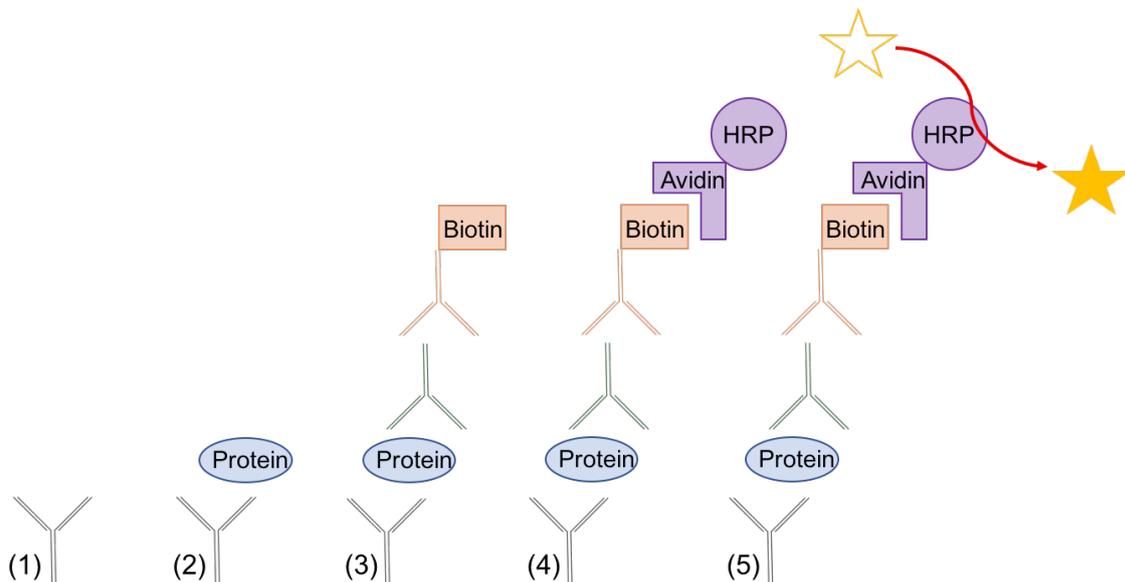


Abbildung 3: Prinzip des Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA); HRP = Horseradish-Peroxidase

Protokoll des ELISAs

In dieser Arbeit wurde ein ELISA-Kit zur quantitativen Bestimmung von humanem Claudin-7 im Serum nach den Angaben des Herstellers CUSABIO (College Park, USA) verwendet. Zu Beginn wurden die Reagenzien vorbereitet. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden der Biotin-Antikörper sowie die HRP-Avidin Lösung mit den jeweiligen Verdünnungslösungen 100-fach verdünnt. Für den Waschpuffer wurde das bereitgestellte Konzentrat durch Lösung in Aqua dest. 25-fach verdünnt. Der gefriergetrocknete Standard wurde zunächst zentrifugiert und mit der bereitgestellten Lösung rekonstituiert. Anschließend wurde eine 2-fache Verdünnungsreihe unter Verwendung des enthaltenen *Sample Diluent* hergestellt. Die Proben wurden ebenfalls mit *Sample Diluent* je 5-fach verdünnt.

Für den Assay wurden jeweils 100µl der Standardreihe sowie der Proben bei Raumtemperatur in die bereitgestellte, mit Antikörpern beschichtete 96-Well-Platte pipettiert. Diese wurde mit einem Klebestreifen verschlossen und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgekippt und je 100µl Biotin-konjugierter Antikörper in die Wells gegeben. Erneut wurde die Platte abgeklebt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde dann gewaschen. Dazu wurde die enthaltene Flüssigkeit abgekippt und jedes Well mithilfe einer Multikanal-Pipette mit 200µl Waschpuffer beschickt. Nach 2 Minuten wurde der Waschpuffer abgekippt und die Platte gegen saubere Papiertücher geklopft. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden je 100µl HRP-Avidin zugegeben, die Platte wieder mittels Klebestreifen verschlossen, und erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der beschriebene Waschvorgang fünfmal wiederholt. Es folgte die Zugabe von 90µl Substratlösung pro Well und eine weitere Inkubation bei 37°C unter Lichtabschluss für 34 Minuten. Die Färbereaktion wurde schließlich durch Zugabe von je 50µl *Stop Solution* beendet und die Platte im ELISA-Reader bei 450nm sowie einer Referenzwellenlänge von 570nm gemessen. Für zwei Proben, deren Färbereaktion zu stark und infolgedessen bei 450nm nicht messbar war, wurde die Optische Dichte bei 405nm und einer Referenzwellenlänge von 570nm bestimmt und mit 3 multipliziert (Madersbacher & Berger, 1991).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde dann der bekannte Standard mit den entsprechenden Messwerten korreliert und anhand der Steigung der daraus resultierenden, linearen Funktion der Berechnungsfaktor für die Proben ermittelt.

2.3 Statistische Analyse

Alle in dieser Arbeit verwendeten Werte sind dargestellt als Mittelwerte oder Mediane \pm Standardfehler. Für die statistische Analyse der HSCORE Werte erfolgte zunächst eine Varianzanalyse (ANOVA= *Analysis of variance*) und anschließend eine Auswertung mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney Tests für Vergleiche von 2 Gruppen sowie des nichtparametrischen Kruskal-Wallis Test für Vergleiche zwischen mehr als 2 Gruppen.

Die Ergebnisse des Claudin-7 ELISAs wurden ebenfalls mittels Varianzanalyse und des nichtparametrischen Mann-Whitney Tests analysiert. Anschließend wurden ein Grenzwert (*Cut-off*) bestimmt und ein 4-Feldertest durchgeführt, um Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert sowie die positive und negative Likelihood-Ratio für eine diagnostische Bestimmung von Claudin-7 im Serum zu bestimmen.

Für alle statistischen Auswertungen wurde GraphPad Prism 6.01 verwendet, und es wurden P-Werte ≤ 0.05 als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung und Charakterisierung des zellulären Phänotyps von endometrialen und endometriotischen Epithelzellen, um mögliche Veränderungen bei der Pathogenese der Endometriose auszumachen. Von entscheidender Bedeutung für das Erscheinungsbild und die Funktion einer Zelle ist ihre jeweilige Expression von Proteinen. Mit dem Verfahren der Immunhistochemie lassen sich diese spezifisch sichtbar machen und erlauben so eine qualitative Bestimmung ihres Vorhandenseins sowie ihrer zellulären Lokalisation. Die Verwendung von Scoring-Systemen, wie dem hier angewandten HSCORE, ermöglicht zusätzlich eine Quantifizierung der Proteinexpression. So können die Beschaffenheit von Zellen charakterisiert und Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen werden.

In der Studie wurden auf diese Weise Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose sowie die verschiedenen endometriotischen Entitäten der ovariellen, peritonealen und tief infiltrierenden Endometriose vergleichend analysiert und Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten erfasst. Dabei lag das Augenmerk neben einer qualitativen Beschreibung der subzellulären Lokalisation auf der quantitativen Bestimmung der Proteinexpression.

Um zu untersuchen, ob die Zellen neben epithelialen auch mesenchymale Eigenschaften besitzen oder sich diese im Verlauf der Erkrankung verändern, wurde der mesenchymale Marker Vimentin ausgewählt und evaluiert.

Darüber hinaus wurden mit Claudin-11 und Claudin-7 zwei Proteine analysiert, die an der Formation von Zell-Zell-Kontakten beteiligt und damit von entscheidender Bedeutung für den Zusammenhalt von Zellverbänden sind. Für das Protein Claudin-7 wurde schließlich noch eine Bestimmung dessen Gehalts im Serum von Patientinnen und Probandinnen durchgeführt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargelegt.

3.1 Qualitative und quantitative Analyse von Vimentin

3.1.1 Qualitative Analyse der Proteinexpression von Vimentin

Die Zellen wurden durch einen immunhistochemischen Nachweis für das Protein Vimentin visualisiert und analysiert. Dabei zeigte sich eine starke Heterogenität in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation sowie Intensität der Färbung. In einem Teil der Proben war die Färbung fleckförmig auf den basalen Zellpol beschränkt und wurde folglich als basaler Plaque bezeichnet (Abb. 4A). In anderen Fällen waren neben basalen auch laterale oder aber ausschließlich laterale Anteile der Epithelzellen gefärbt (Abb. 4B+C). Generell war die Färbung an den Zellgrenzen am deutlichsten ausgeprägt, ließ sich aber ebenfalls im Zytoplasma nachweisen. Daneben konnte in einigen Proben keine eindeutige Färbung der Epithelzellen nachgewiesen werden. Nebenbefundlich zeigten angeschnittene Blutgefäße ebenfalls Positivität für Vimentin.

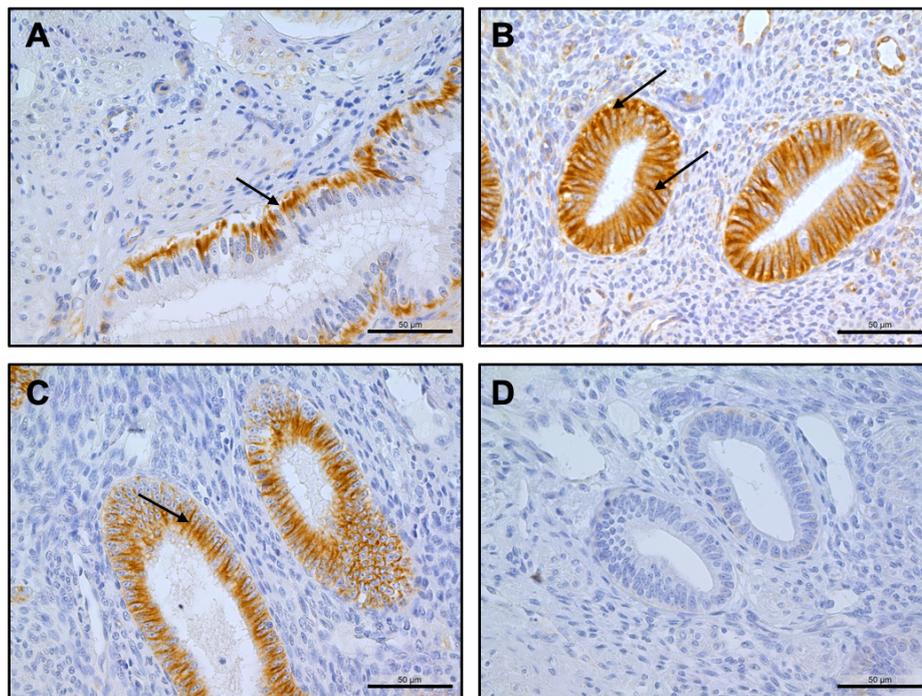


Abbildung 4: Beispielhafte Fotografien der unterschiedlichen Proteinlokalisationen von Vimentin. **A:** Endometrium einer Patientin mit Endometriose: die Färbung ist auf den basalen Pol der Zelle als basaler Plaque beschränkt; **B:** Endometrium einer Patientin mit Endometriose: neben basalen sind auch laterale Zellanteile gefärbt. Nebenbefundlich zeigen sich einige Gefäße positiv gefärbt; **C:** Endometrium einer Patientin ohne Endometriose: die Färbung ist auf die lateralen Zellränder beschränkt; **D:** Endometrium einer Patientin ohne Endometriose: eine eindeutige Färbung ist nicht auszumachen; Die Pfeile weisen auf die jeweilige Proteinlokalisation hin. Vergrößerung jeweils 400-fach, Größenmaßstab 50µm.

Ergebnisse

Um die verschiedenen Untersuchungsgruppen vergleichend zu analysieren, wurde die Proteinlokalisierung für jede Probe erfasst und einer der beschriebenen Kategorien zugeordnet. Hierbei zeigte sich eine heterogene Verteilung der Proteinlokalisationen in den verschiedenen Gruppen.

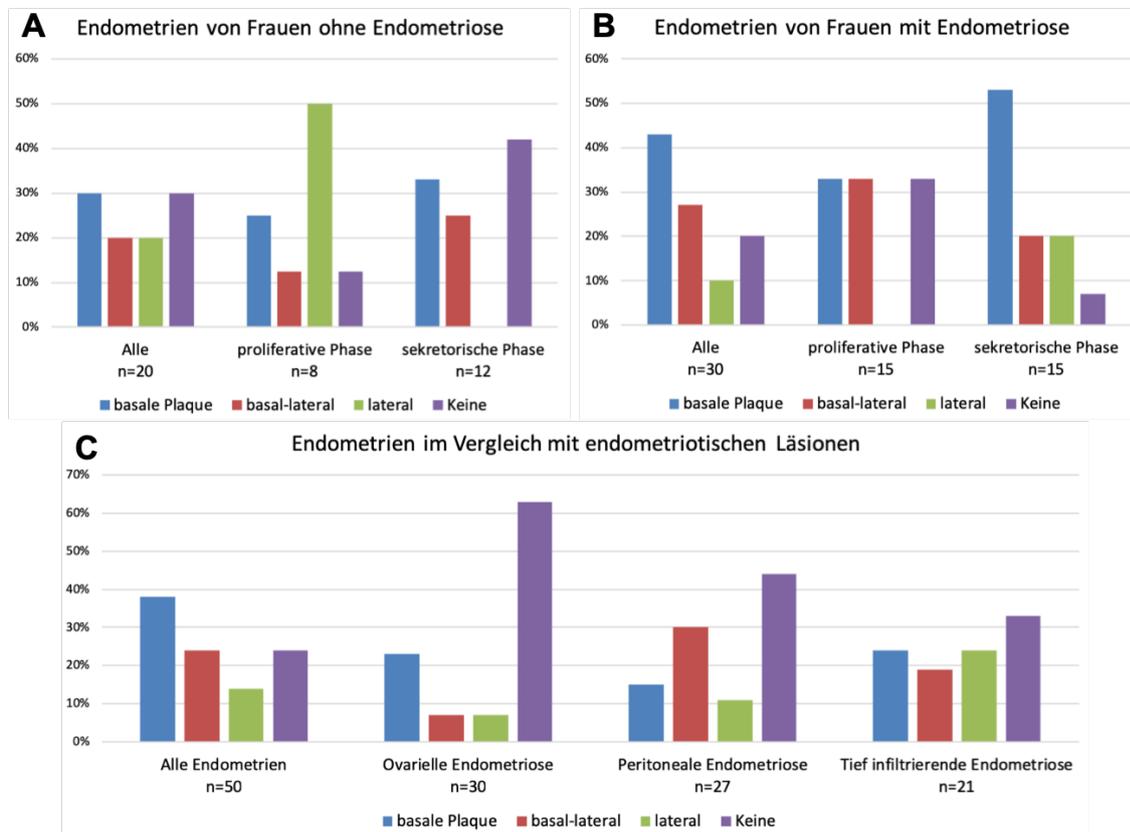


Abbildung 5: Übersicht über die Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen von Vimentin. Dabei markiert die X-Achse die entsprechende Untersuchungsgruppe, die Y-Achse gibt den jeweiligen Anteil der darin beobachteten Verteilungsmuster in Prozent an. Kombinierte und nach Zyklusphase getrennte endometriale Proben von Frauen ohne (A) und mit (B) Endometriose; C: gepoolte endometriale Proben im Vergleich mit endometriotischen Läsionen.

Für die endometrialen Proben fielen dabei unterschiedliche Verteilungsmuster in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus auf (Abb. 5A+C). So fand sich bei Frauen ohne Endometriose in der Proliferationsphase vor allem das laterale Verteilungsmuster, welches in der sekretorischen Phase verschwand, und dafür vermehrt basale Plaques und basolaterale Muster sowie Vimentin-negative Proben auftraten. Frauen mit Endometriose zeigten in proliferativem Endometrium zu gleichen Teilen ungefärbte und basolaterale Muster sowie basale Plaques. Letztere traten in der sekretorischen Phase vermehrt auf, während statt basal-lateraler und ungefärbter Proben nun auch laterale Muster zu finden waren. In den endometriotischen Läsionen waren alle Muster zu ähnlichen Anteilen vertreten, wobei sich bereits hier zeigte, dass in peritonealer und besonders in ovarieller Endometriose ein Großteil der Proben keine Vimentin-Positivität

Ergebnisse

aufwies. Die tief infiltrierende Endometriose ähnelte schließlich in ihrer Verteilung des Lokalisationsmusters dem eutopen, endometrialen Gewebe (Abb. 5C).

3.1.2 Quantitative Analyse der Proteinexpression von Vimentin

Für die quantitative Auswertung der Proteinexpression von Vimentin wurden zunächst endometriale Proben von Frauen ohne und mit Endometriose mithilfe des HSCOREs vergleichend analysiert.

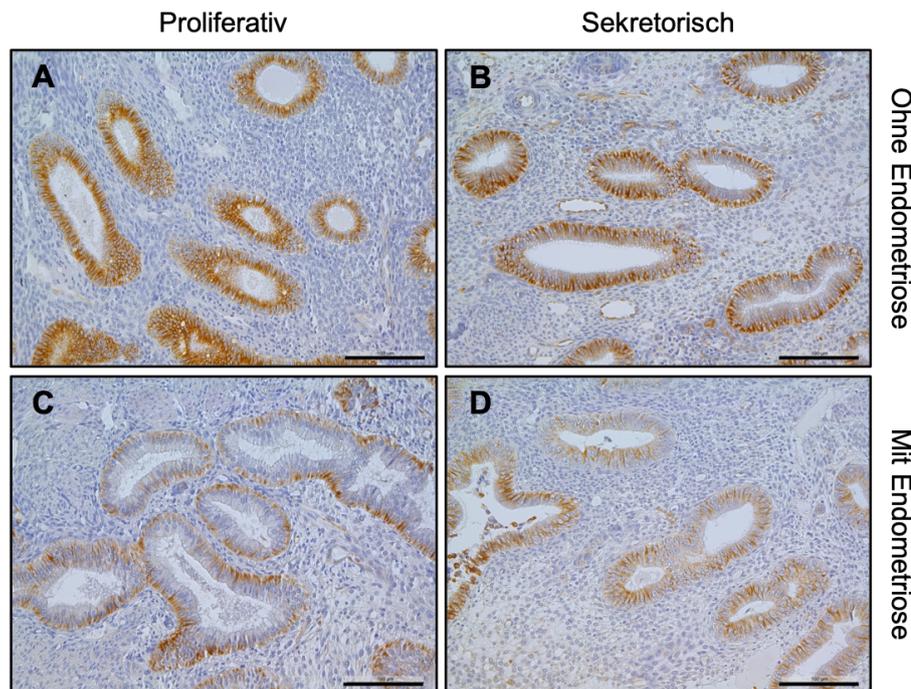


Abbildung 6: Repräsentative Fotografien von Vimentin in eutopem Endometrium: proliferatives (A) und sekretorisches (B) Endometrium ohne Endometriose, sowie proliferatives (C) und sekretorisches (D) Endometrium mit Endometriose. Vergrößerung jeweils 200-fach, Größenmaßstab 100µm.

In den repräsentativen Ausschnitten auf Abbildung 6 sind die typischen endometrialen Drüsenverbände, umgeben von endometrialem Stroma zu sehen. Hier zeigen sich die Epithelzellen spezifisch angefärbt, während das umgebende Stroma, mit Ausnahme der angeschnittenen Gefäßanteile, nahezu keine Positivität aufweist.

Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der vergleichenden HSCORE-Analyse endometrialer Proben von Frauen ohne und mit Endometriose in den jeweiligen Zyklusphasen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen proliferativem und sekretorischem Endometrium. Weiterhin wiesen die endometrialen Epithelzellen von Frauen ohne und mit Endometriose nahezu identische Werte auf. Auch eine zusätzlich durchgeführte Analyse des periglandulären, endometrialen Stromas zeigte keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Zyklusphase und Vorhandensein einer Endometriose und war gegenüber dem Epithel in viel geringerem Maße vorhanden.

Ergebnisse

Tabelle 12: Vimentin HSCOREs in Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose

	Endometrium ohne Endometriose		Endometrium mit Endometriose	
	prolif.	sekr.	prolif.	sekr.
Epithel				
HSCORE	108	36	59	93
Standardfehler	34,3	21,9	15,3	19,8
N (Alter)	8 (42,5)	12 (41)	15 (40)	15 (42)
P-Wert		n.s.	n.s.	n.s.
	Gesamt		Gesamt	
HSCORE	65		76	
Standardfehler	4,6		12,7	
N (Alter)	20 (40,5)		30 (41,5)	
P-Wert			n.s.	
Stroma				
HSCORE	13	10	3	11
Standardfehler	7,6	4,1	1,2	4,6
N (Alter)	8 (42,5)	12 (41)	15 (40)	15 (42)
P-Wert		n.s.	n.s.	n.s.
	Gesamt		Gesamt	
HSCORE	11		6,9	
Standardfehler	3,8		2,4	
N (Alter)	20 (40,5)		30 (41,5)	
P-Wert			n.s.	

Abkürzungen: prolif.= proliferativ; sekr.=sekretorisch; n.s.= nicht signifikant; HSCORE als Mittelwert; Alter als Median

Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurde auf die gleiche Weise die Proteinexpression von Vimentin in den endometriotischen Läsionen bestimmt.

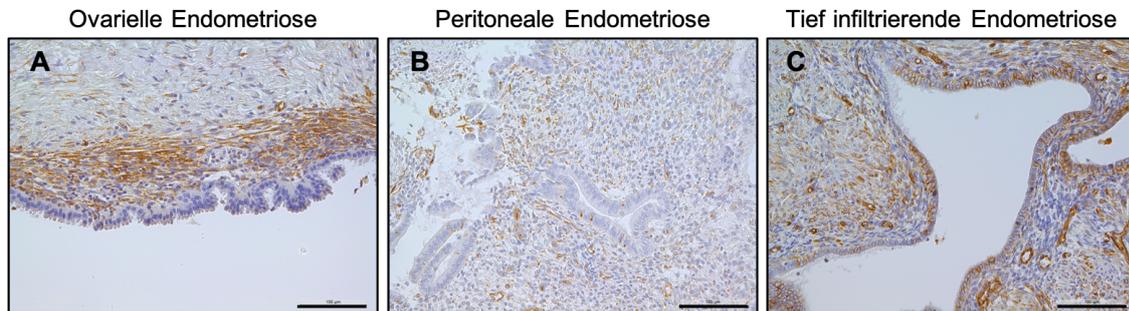


Abbildung 7: Repräsentative Fotografien von Vimentin in den endometriotischen Läsionen. **A:** ovarielle Endometriose; **B:** Endometriose am Blasenperitoneum; **C:** tief infiltrierende Endometriose des Ligamentum sacrouterinum. Vergrößerung jeweils 200-fach, Größenmaßstab 100µm.

Abbildung 7 zeigt repräsentative Ausschnitte der drei endometriotischen Entitäten. Bei dem Exemplar der ovariellen Endometriose handelt es sich um die typische Form einer Endometriose-Zyste, welche klinisch oftmals als mit altem Blut gefüllte, sogenannte Schokoladenzyste imponiert. Deutlich zu sehen ist hier das einschichtige Epithel mit zylindrischen und kubischen Zellen, welches vollständig Vimentin-negativ ist, während das umgebende Stroma deutliche Vimentin-Positivität zeigt (Abb. 7A). Das Bild der peritonealen Endometriose zeigt ebenfalls einschichtiges, allerdings streng zylindrisches Epithel mit vereinzelt Vimentin-positiven Plaques. Das Epithel liegt dabei in eher lockerem, teilweise gefärbtem Stroma und öffnet sich zu einer Seite der Bauchhöhle (Abb. 7B). Auf der Fotografie einer tief infiltrierenden Endometriose des Ligamentum sacrouterinum ist eine zystisch erweiterte Drüsenstruktur mit einschichtigem Zylinderepithel zu sehen. Dieses ist größtenteils deutlich gefärbt und in spärlich gefärbtem, von Gefäßen durchzogenem, zytogenem Stroma eingebettet (Abb. 7C).

Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der drei endometriotischen Entitäten mittels HSCORE. Die ektopen Läsionen wurden mit den eutopen Endometrien verglichen, wobei für die statistische Analyse die Gruppen von Frauen ohne sowie mit Endometriose zusammengelegt wurden, da diese, wie zuvor gezeigt, nahezu identisch waren (Abb. 6, Tab. 12).

Ergebnisse

Tabelle 13: Vimentin HSCOREs in Endometrien und endometriotischen Läsionen

		Endometrium	Ov. EM	Perit. EM	TIE
		(a)	(b)	(c)	(d)
Epithel	HSCORE	72	15	46	94
	Standardfehler	11,0	6,1	13,1	19,1
	N (Alter)	50 (41)	29/30 (33)	25/27 (31)	21/21 (31)
	P-Wert		0,001 (a,b)	n.s.	0,001 (b,d)
Stroma	HSCORE	8,5	84,8	38,2	49,1
	Standardfehler	2,1	15,7	10,4	13,9
	N (Alter)	50 (41)	29/30 (33)	25/27 (31)	21/21 (31)
	P-Wert		0,001 (a,b)	n.s.	n.s.

Abkürzungen: Ov.= ovarielle; Perit.= peritoneale; EM= Endometriose; TIE= tief infiltrierende Endometriose; MW= Mittelwert; n.s.= nicht signifikant; 29/30 bedeutet 30 Proben von 29 Patientinnen; (a,b) bedeutet a verglichen mit b; HSCORE als Mittelwert; Alter als Median

Die Vimentin Expression war in den Epithelzellen der ovariellen Läsionen gegenüber dem eutopen Endometrium deutlich und signifikant vermindert, während sich in den peritonealen Endometriosen nur eine leichte Reduktion zeigte. Die tief infiltrierenden Endometriosen wiesen insgesamt eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung von Vimentin auf.

Im umgebenden Stroma hingegen zeigten die ovariellen Endometriosen einen deutlich und signifikant erhöhten Vimentin-HSCORE gegenüber den eutopen Endometrien. Auch bei den peritonealen und tief infiltrierenden Endometriosen fand sich eine vermehrte Vimentin-Expression.

3.2 Qualitative und quantitative Analyse von Claudin-11

3.2.1 Qualitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-11

Bei der Auswertung des immunhistochemischen Färbemusters von Claudin-11 fiel eine prominente Positivität in nahezu allen untersuchten Proben auf. Allerdings ließen sich auch hier wieder unterschiedliche Proteinlokalisationen anhand verschiedener Färbemuster nachweisen.

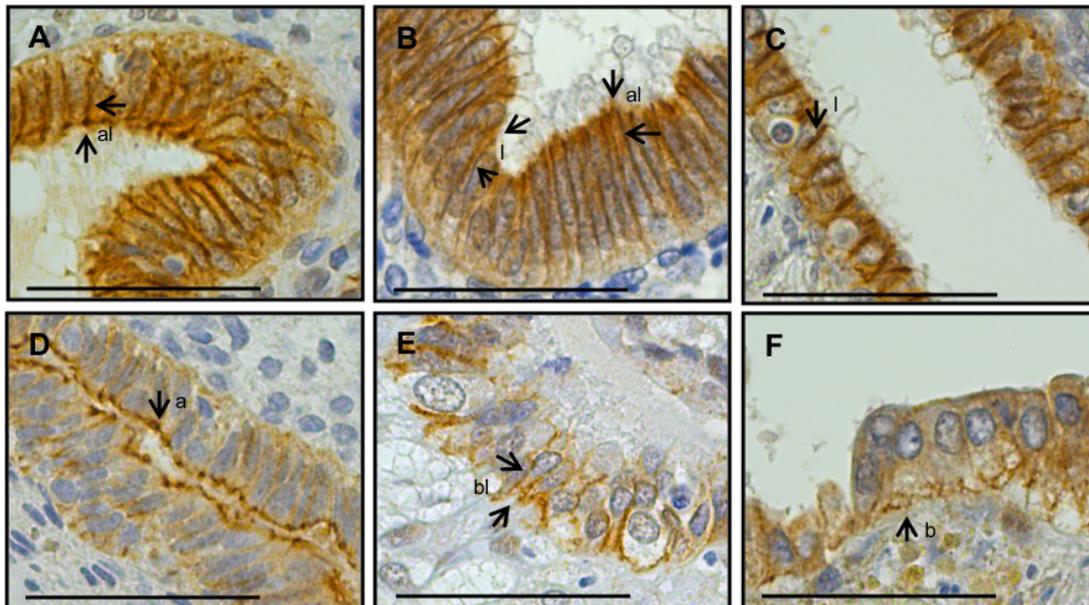


Abbildung 8: Repräsentative Fotografien der Proteinlokalisation von Claudin-11: apikolaterale (A, al), laterale und teilweise apikale (B, l), laterale (C), vornehmlich apikale (D, a), basolaterale (E, bl), vornehmlich basale (F, b) Lokalisationen. Hier gezeigt sind endometriotische Läsionen des Ligamentum sacrouterinum (A,D), des Douglas Raumes (B), des Septum rectovaginale (C) sowie des Ovars (E,F). Die Pfeile weisen auf die jeweilige Proteinlokalisation hin. Vergrößerung jeweils 400-fach, Größenmaßstab 50µm.

Abbildung 8 zeigt die verschiedenen Verteilungsmuster von Claudin-11. Im Allgemeinen fand sich Positivität im Bereich der Zellgrenzen, im Einzelnen war auch das Zytoplasma mitgefärbt. Die folgenden Verteilungsmuster wurden beobachtet: Die häufigste und vor allem im eutopen Endometrium vorherrschende Lokalisation von Claudin-11 war apikolateral, mit betonten lateralen Zellgrenzen sowie besonders kräftig gefärbten Spots im Bereich der apikalen Verbindung zu den umgebenden Zellen (Abb. 8A). Andere Proben zeigten diese apikale Betonung nur in einem Teil der Zellen (Abb. 8B). Ebenfalls gab es Proben, deren Zellen nur an den lateralen Zellgrenzen (Abb. 8C) oder nur apikal betont (Abb. 8D) Positivität aufwiesen. Gerade im Bereich der ovariellen Endometriose fanden sich schließlich Zellen, die neben lateraler auch basale Lokalisationen aufwiesen (Abb. 8E) oder vornehmlich basal gefärbt waren (Abb. 8F).

Ergebnisse

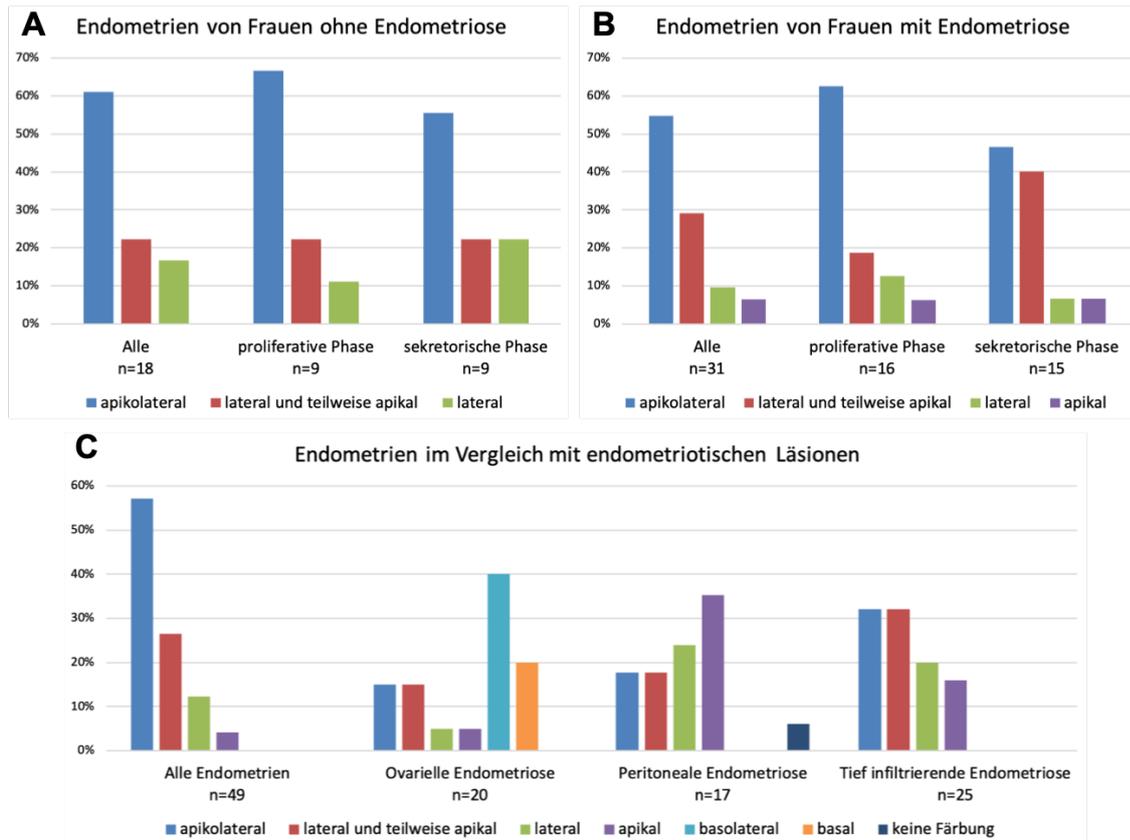


Abbildung 9: Übersicht über die Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen von Claudin-11. Dabei markiert die X-Achse die entsprechende Untersuchungsgruppe, die Y-Achse gibt den jeweiligen Anteil der darin beobachteten Verteilungsmuster in Prozent an. Kombinierte und nach Zyklusphase getrennte endometriale Proben von Frauen ohne (A) und mit (B) Endometriose; C: gepoolte endometriale Proben im Vergleich mit endometriotischen Läsionen.

In der Abbildung 9 sind die nominalen Verteilungen der qualitativen Proteinlokalisationen in den jeweiligen Untersuchungsgruppen dargestellt. Die endometrialen Proben von Frauen ohne Endometriose zeigten überwiegend apikolaterale beziehungsweise laterale und teilweise apikale sowie laterale Proteinlokalisationen. Dabei war die Verteilung in beiden Phasen des Menstruationszyklus ähnlich, lediglich das laterale Muster war in der sekretorischen Phase leicht erhöht (Abb. 9A). In ähnlicher Weise verhielt sich das Proteinmuster in Endometrien von Frauen mit Endometriose. Hier traten zusätzlich rein apikale Muster auf und es kam in den sekretorischen Endometrien zu einer Verschiebung von apikolateralen hin zu lateralen und teilweise apikalen Proteinlokalisationen (Abb. 9B).

Im Vergleich zum eutopen Endometrium mit seiner vornehmlich apikolateralen Lokalisation wiesen die endometriotischen Läsionen veränderte Verteilungsmuster von Claudin-11 auf. Besonders deutlich unterschieden sich ovarielle Endometriosen durch das überwiegende und ausschließlich bei dieser Entität vorkommende Muster der basolateralen oder vornehmlich basalen Proteinlokalisation. Die peritoneale

Ergebnisse

Endometriose unterschied sich ebenfalls durch ein Überwiegen des rein apikalen oder rein lateralen Musters und zeigte nur in etwa einem Drittel der Fälle die sonst beobachtete Koexistenz beider Lokalisationen. Die tief infiltrierende Endometriose hingegen ähnelte in ihrer Verteilung der Claudin-11 Lokalisation wieder vermehrt den eutopen Endometrien (Abb. 9C).

Um die Verschiebung der Claudin-11 Lokalisation zu quantifizieren, wurde jedem Verteilungsmuster ein Punktwert zugeordnet (Tab. 11) und anschließend statistisch analysiert. Aufgrund der hohen Übereinstimmung zwischen den endometrialen Proben von Frauen ohne und mit Endometriose wurden für die statistische Analyse beide Gruppen zusammengefasst.

Tabelle 14: Claudin-11 Lokalisationsscores in Endometrien und endometriotischen Läsionen

	Endometrium ohne Endometriose		Endometrium mit Endometriose	
	proliferativ	sekretorisch	proliferativ	sekretorisch
Lokalisationsscore	5,444	5,444	5,438	5,333
Standardfehler	0,294	0,242	0,182	0,211
N (Alter)	9 (37)	9 (41)	16 (39,5)	15 (43)
P-Wert		n.s.	n.s.	n.s.
	Gesamt		Gesamt	
Lokalisationsscore	5,44		5,39	
Standardfehler	0,185		0,137	
N (Alter)	18 (40,5)		31 (42)	
P-Wert			n.s.	
	Endometrium (a)	Ov. EM (b)	Perit. EM (c)	TIE (d)
Lokalisationsscore	5,408	3,6	4,118	4,44
Standardfehler	0,109	0,294	0,382	0,295
N (Alter)	49 (41)	19/20 (34)	16/17 (32)	23/25 (32)
P-Wert		0,001 (a,b)	0,01 (a,c)	0,05 (a,d)

Lokalisationsscore als Mittelwert, Alter als Median; Abkürzungen: Ov.= ovarielle; Perit.= peritoneale; EM= Endometriose; TIE= tief infiltrierende Endometriose; n.s.= nicht signifikant; 19/20 bedeutet 20 Proben von 19 Patientinnen; (a,b) bedeutet a verglichen mit b.

Ergebnisse

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Auswertung der Verteilungsmuster von Claudin-11 dargestellt. Dabei wiesen eutope Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose - unabhängig von ihrer Zyklusphase - nahezu identische Werte auf.

Die ovarielle Endometriose hingegen zeigte - besonders aufgrund der zuvor beschriebenen Verschiebung der Proteinlokalisierung ins basale Kompartiment der Zelle - einen deutlich und hochsignifikant verringerten Lokalisationsscore. Die peritoneale und tief infiltrierende Endometriose wiesen ebenfalls signifikant reduzierte Werte auf.

3.2.2 Quantitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-11

Bei der quantitativen Analyse der Proteinexpression von Claudin-11 wurden zuerst Gewebeproben aus eutopem Endometrium betrachtet.

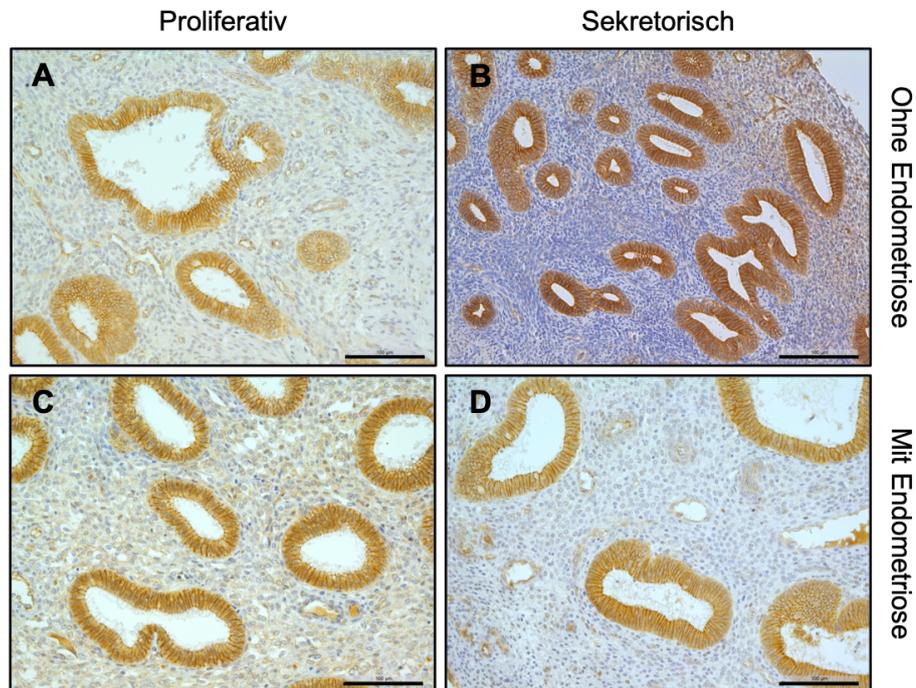


Abbildung 10: Repräsentative Fotografien von Claudin-11 in eutopem Endometrium: proliferatives (A) und sekretorisches (B) Endometrium ohne Endometriose, sowie proliferatives (C) und sekretorisches (D) Endometrium mit Endometriose. Vergrößerung jeweils 200-fach, Größenmaßstab 100µm.

Abbildung 10 zeigt die Verteilung von Claudin-11 im Endometrium von Frauen ohne sowie mit Endometriose. Die Epithelzellen der endometrialen Drüsenverbände sind deutlich gefärbt und zeigen die zuvor beschriebenen Proteinlokalisationen. Im umgebenden, endometrialen Stroma kommt es zum Teil zu schwächeren, gegebenenfalls unspezifischen Färbereaktionen möglicherweise an dezidualisierten Zellen. Die angeschnittenen Gefäße weisen entlang ihres Endothels ebenfalls Positivität auf.

Ergebnisse

In Tabelle 15 ist die vergleichende HSCORE-Analyse der eutopen Endometrien dargestellt.

Tabelle 15: Claudin-11 HSCOREs in Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose

	Endometrium ohne Endometriose		Endometrium mit Endometriose	
	prolif.	sekr.	prolif.	sekr.
HSCORE	185	187	148	189
Standardfehler	25,1	19,4	9,0	12,1
N (Alter)	9 (37)	9 (41)	16 (39,5)	15 (43)
P-Wert		n.s.	n.s.	n.s.
	Gesamt		Gesamt	
HSCORE	186		168	
Standardfehler	15,4		8,2	
N (Alter)	18 (40,5)		31 (42)	
P-Wert			n.s.	

Abkürzungen: prolif.= proliferativ; sekr.=sekretorisch; n.s.= nicht signifikant; HSCORE als Mittelwert, Alter als Median

Innerhalb der Gruppe ohne Endometriose wiesen die endometrialen Proben aus proliferativer und sekretorischer Zyklusphase fast identische Werte auf. Bei Frauen mit Endometriose war die Proteinexpression in proliferativem gegenüber sekretorischem Endometrium geringfügig aber nicht signifikant niedriger.

Bei der Analyse der gesamten endometrialen Proben von Frauen ohne und mit Endometriose zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen, weshalb diese für die weiteren Betrachtungen zusammengefasst wurden (Tab. 15).

Ergebnisse

Als nächstes wurde die Claudin-11 Expression in den endometriotischen Läsionen untersucht.

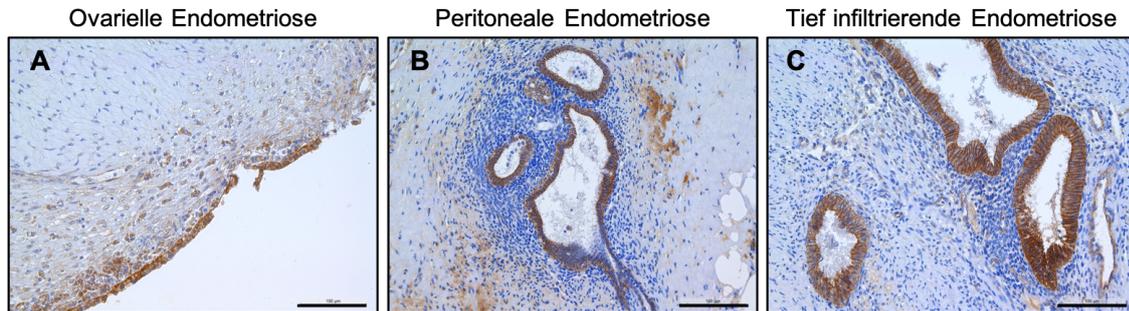


Abbildung 11: Repräsentative Fotografien von Claudin-11 in endometriotischen Läsionen. **A:** ovarielle Endometriose; **B:** Endometriose am Peritoneum der Fossa ovarica; **C:** tief infiltrierende Endometriose des Rectosigmoids. Vergrößerung jeweils 200-fach, Größenmaßstab 100µm.

Abbildung 11 zeigt die Claudin-11 Expression in endometriotischen Läsionen. Die ovarielle Endometriose imponiert als typische Zyste mit einschichtigem, deutlich gefärbtem Epithel aus kubischen Zellen. Das angrenzende Stroma erscheint aufgelockert und weist vereinzelt Einblutungen sowie unspezifische Färbereaktionen auf (Abb. 11A). Der peritoneale Herd aus der Fossa ovarica besteht aus Drüsenanschnitten mit stark gefärbten Zylinderepithelzellen. Diese sind in zytogenes Stroma eingebettet, welches sich Claudin-11 negativ mit wenigen unspezifischen Färbereaktionen in der Peripherie darstellt (Abb. 11B). Das Bild der tief infiltrierenden Endometriose des Rectosigmoids zeigt ähnliche Drüsenverbände mit ebenfalls stark gefärbtem Zylinderepithel. Auch hier ist das umgebende Stroma grundsätzlich Claudin-11 negativ, lediglich im Bereich von Gefäßanschnitten zeigt sich Positivität (Abb. 11C).

Ergebnisse

Tabelle 16: Claudin-11 HSCOREs in Endometrien und endometriotischen Läsionen

		Endometrium	Ov. EM	Perit. EM	TIE
Epithel	HSCORE	174	125	182	159
	Standardfehler	7,7	13,7	19,8	11,9
	N (Alter)	49 (41)	19/20 (34)	16/17 (32)	23/25 (32)
	P-Wert		n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: Ov.= ovarielle; Perit.= peritoneale; EM= Endometriose; TIE= tief infiltrierende Endometriose; n.s.= nicht signifikant; 19/20 bedeutet 20 Proben von 19 Patientinnen; HSCORE als Mittelwert; Alter als Median

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung von Claudin-11 in endometrialen und endometriotischen Epithelzellen dargestellt. In allen Gruppen zeigte sich eine prominente und stabile Expression mit vergleichsweise geringer Schwankungsbreite. Während der HSCORE von Claudin-11 in ovariellen Läsionen moderat, aber nicht signifikant vermindert war, zeigte sich für die peritoneale und die tief infiltrierende Endometriose eine hohe Ähnlichkeit mit dem eutopen Endometrium.

3.3 Qualitative und quantitative Analyse von Claudin-7

3.3.1 Qualitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-7

Die immunhistochemische Analyse von Claudin-7 zeigte eine starke Positivität in allen Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose, wie auch in sämtlichen endometriotischen Läsionen. Die beobachteten Proteinmuster waren dabei weniger divers als die der zuvor beschriebenen Proteine und werden im Folgenden dargestellt.

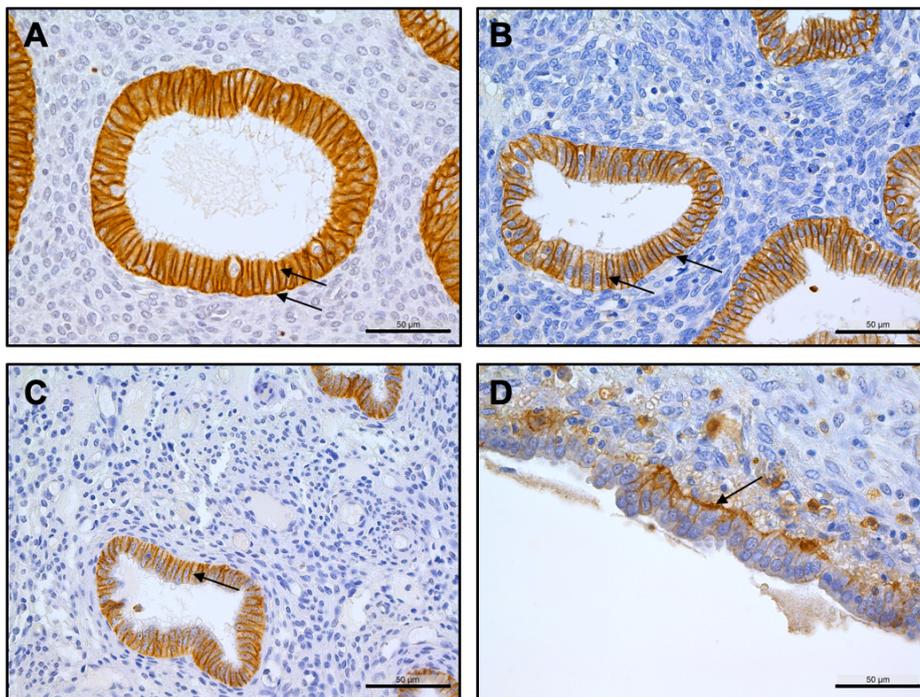


Abbildung 12: Repräsentative Fotografien der Proteinlokalisierung von Claudin-7: basolaterale (A), laterale und teilweise basale (B), laterale (C) und basale (D) Lokalisation. Hier gezeigt sind Endometrien von Frauen mit Endometriose (A,B,C) sowie eine ovarielle Endometriose (D). Die Pfeile weisen auf die jeweilige Proteinlokalisierung hin. Vergrößerung jeweils 400-fach, Größenmaßstab 50µm.

In Abbildung 12 sind die verschiedenen Proteinlokalisationen von Claudin-7 dargestellt. Es zeigte sich eine kräftige Positivität der Epithelzellen mit klarer Demarkation zum umgebenden Stroma. Diese erstreckte sich zumeist entlang der basalen und lateralen Zellgrenzen, sodass folgende Muster identifiziert wurden: stets basolateral (Abb. 12A), lateral und teilweise basolateral (Abb. 12B), stets lateral (Abb. 12C) sowie betont basal (Abb. 12D). Mitunter war auch das Zytoplasma mitgefärbt oder wies in Einzelfällen eine unregelmäßige Positivität auf.

Ergebnisse

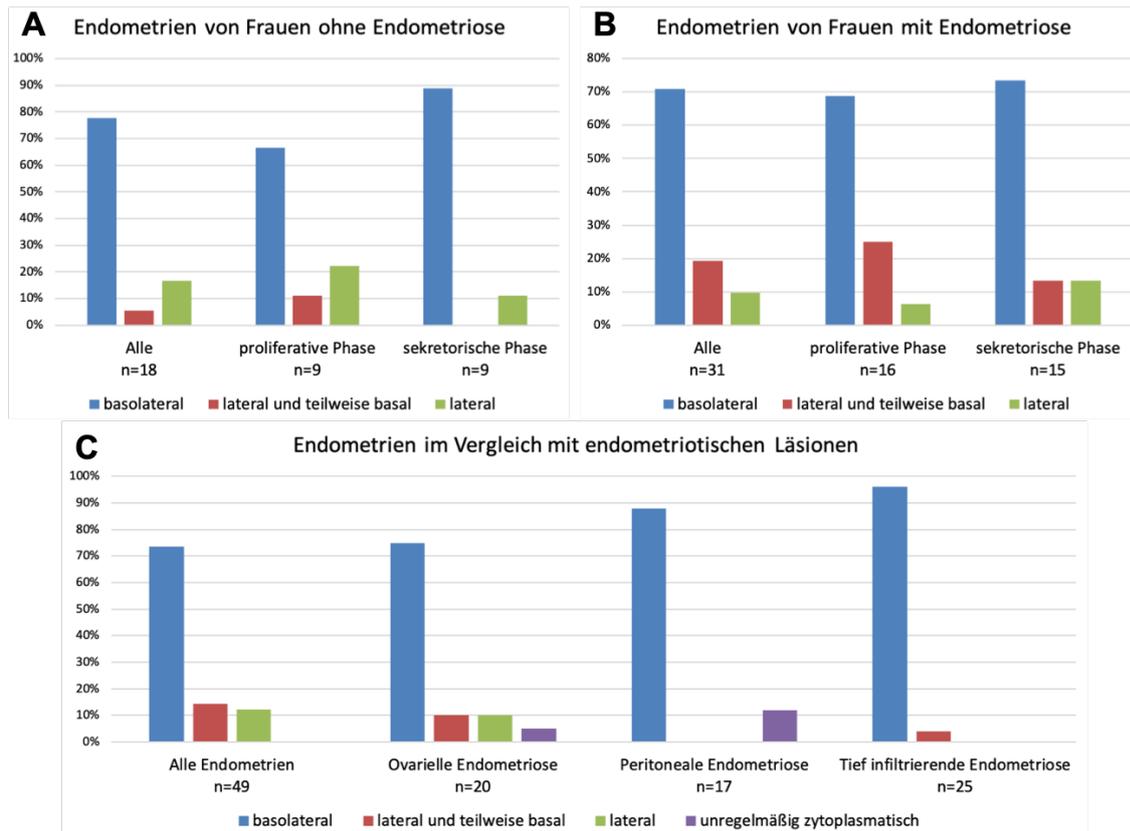


Abbildung 13: Übersicht über die Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen von Claudin-7. Dabei markiert die X-Achse die entsprechende Untersuchungsgruppe, die Y-Achse gibt den jeweiligen Anteil der darin beobachteten Verteilungsmuster in Prozent an. Kombinierte und nach Zyklusphase getrennte endometriale Proben von Frauen ohne (A) und mit (B) Endometriose; C: gepoolte endometriale Proben im Vergleich mit endometriotischen Läsionen.

Abbildung 13 zeigt die Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen innerhalb der Untersuchungsgruppen. Bei Frauen ohne Endometriose wiesen die endometrialen Proben vornehmlich basolaterale Muster auf. Seltener kamen laterale oder laterale und teilweise basale Lokalisationen vor, letztere nur in proliferativem Endometrium (Abb.13A). In endometrialen Proben von Frauen mit Endometriose zeigte sich eine ähnliche Verteilung. Hier traten, neben dem erneut überwiegenden Anteil der basolateralen Lokalisation, das laterale wie auch das laterale und teilweise basale Muster in beiden Zyklusphasen auf (Abb.13B).

Bemerkenswerterweise wiesen die endometriotischen Proben gegenüber den Endometrien ein noch deutlicheres Überwiegen der basolateralen Proteinlokalisation auf – mit nur vereinzeltm Auftreten anderer Muster (Abb.13C).

3.3.2 Quantitative Analyse der Proteinexpression von Claudin-7

Für die vergleichende Analyse der Proteinexpression von Claudin-7 wurden im ersten Schritt Proben aus eutopem Endometrium mithilfe des HSCOREs ausgewertet und verglichen.

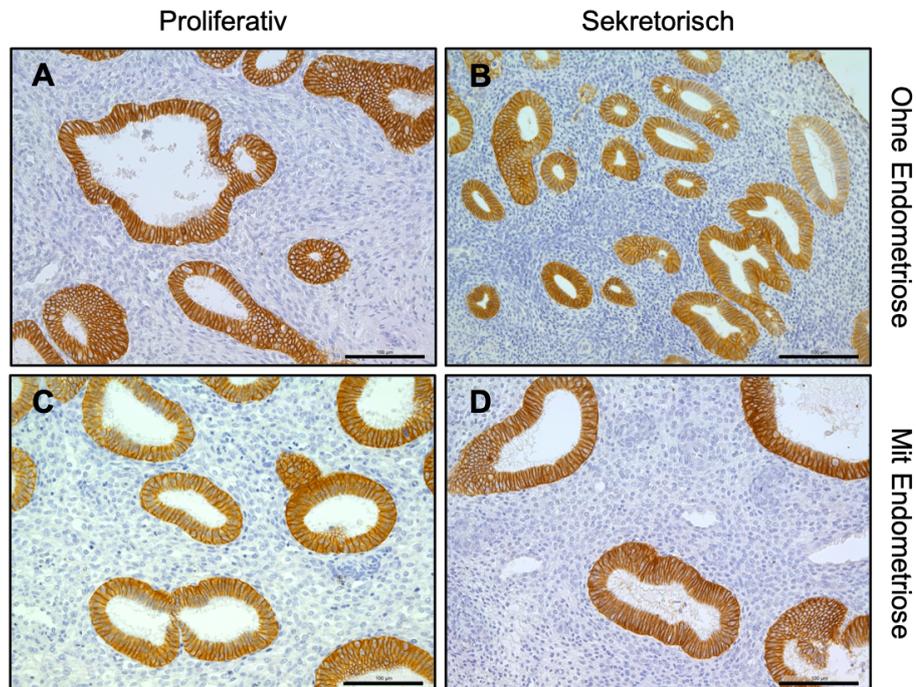


Abbildung 14: Repräsentative Fotografien von Claudin-7 in eutopem Endometrium: proliferatives (A) und sekretorisches (B) Endometrium ohne Endometriose, sowie proliferatives (C) und sekretorisches (D) Endometrium mit Endometriose. Vergrößerung jeweils 200-fach, Größenmaßstab 100µm.

In Abbildung 14 ist die Proteinexpression von Claudin-7 im Endometrium dargestellt. Die hochprismatischen Epithelzellen weisen die zuvor beschriebenen Proteinlokalisationen auf und sind als Drüsenverbände in zytogenes Stroma eingebettet, welches keinerlei Positivität aufweist. Auch die angeschnittenen Gefäße zeigen keine Expression von Claudin-7.

Ergebnisse

Tabelle 17: Claudin-7 HSCOREs in Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose

	Endometrium ohne Endometriose		Endometrium mit Endometriose	
	prolif.	sekr.	prolif.	sekr.
HSCORE	232	249	220	254
Standardfehler	29,0	12,7	16,3	13,5
N (Alter)	9 (37)	9 (41)	16 (39,5)	15 (43)
P-Wert		n.s.	n.s.	n.s.
	Gesamt		Gesamt	
HSCORE	240		237	
Standardfehler	15,5		10,9	
N (Alter)	18 (40,5)		31 (42)	
P-Wert			n.s.	

Abkürzungen: prolif.= proliferativ; sekr.=sekretorisch; n.s.= nicht signifikant; HSCORE als Mittelwert, Alter als Median

Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der vergleichenden HSCORE-Analyse der eutopen Endometrien. Sowohl bei Frauen ohne, als auch bei Frauen mit Endometriose war Claudin-7 in der sekretorischen gegenüber der proliferativen Zyklusphase gering, aber nicht signifikant erhöht. In der Gesamtheit zeigten die Gruppen ohne sowie mit Endometriose nahezu identische Werte und wurden deshalb für die weiteren Betrachtungen zusammengefasst (Tab. 17).

Im nächsten Schritt wurden die endometriotischen Läsionen auf die gleiche Weise analysiert.

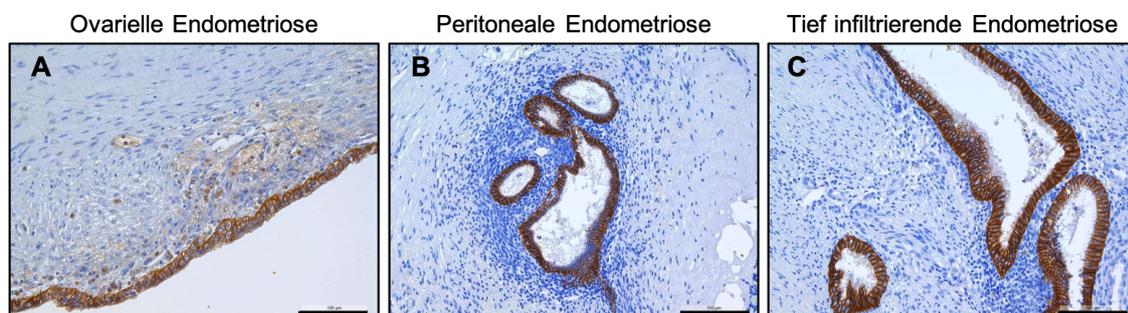


Abbildung 15: Repräsentative Fotografien von Claudin-7 in den endometriotischen Läsionen. **A:** ovarielle Endometriose; **B:** Endometriose am Peritoneum der Fossa ovarica; **C:** tief infiltrierende Endometriose des Rectosigmoids. Vergrößerung jeweils 200-fach, Größenmaßstab 100µm.

Abbildung 15 stellt die Proteinexpression von Claudin-7 in den endometriotischen Läsionen dar. Das einschichtig kubische Epithel der ovariellen Endometriosezyste ist an

Ergebnisse

seinen basalen und lateralen Zellgrenzen deutlich gefärbt (Abb. 15A). Im umgebenden Stroma sind in eingebluteten Arealen unspezifische Färbereaktionen auszumachen, ansonsten zeigt sich keine Positivität. Im Endometrioseherd vom Peritoneum der Fossa ovarica sind die stark gefärbten Epithelzellen hochprismatisch in Drüsenverbänden angeordnet und von gänzlich negativem Stroma umgeben (Abb. 15B). In ähnlicher Weise imponiert die tief infiltrierende Endometriose als glanduläre Struktur aus stark gefärbten, hochprismatischen Epithelzellen. Das angrenzende Stroma ist hier ebenfalls vollständig frei von Claudin-7 (Abb. 15C).

Tabelle 18: Claudin-7 HSCOREs in Endometrien und endometriotischen Läsionen

		Endometrium	Ov. EM	Perit. EM	TIE
Epithel	HSCORE	238	235	278	257
	Standardfehler	8,9	14,8	8,3	8,2
	N (Alter)	49 (41)	19/20 (34)	16/17 (32)	23/25 (32)
	P-Wert		n.s.	n.s.	n.s.

Abkürzungen: Ov.= ovarielle; Perit.= peritoneale; EM= Endometriose; TIE= tief infiltrierende Endometriose; n.s.= nicht signifikant; 19/20 bedeutet 20 Proben von 19 Patientinnen; HSCORE als Mittelwert; Alter als Median

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der HSCORE Analyse der Proteinexpression in Epithelzellen aus Endometrien und endometriotischen Läsionen dargestellt. In allen untersuchten Gruppen war Claudin-7 stark exprimiert und wies nur eine geringe Schwankungsbreite auf. Dabei zeigte sich zwischen den Entitäten eine sehr hohe Ähnlichkeit. So fand sich im Vergleich zum eutopen Endometrium in ovarieller Endometriose ein nahezu identischer HSCORE. Die peritoneale Endometriose wies moderate, die tief infiltrierende Endometriose leicht erhöhte Werte auf, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

3.3.3 Claudin-7 Gehalt im Serum von Frauen ohne und mit Endometriose

Zusätzlich zur Analyse der Proteinexpression in Gewebeproben erfolgte in diesem Fall noch eine Bestimmung des Gehalts an Claudin-7 im Serum von an Endometriose erkrankten Frauen sowie einer Kontrollgruppe ohne Endometriose.

Tabelle 19: Claudin-7 Gehalt im Serum

	Ohne Endometriose	Mit Endometriose
Claudin-7 (ng/ml)	1,816	2,786
Standardfehler	0,428	0,788
N (Alter)	28 (27,5)	36 (34)
P-Wert		0,0005

Proteingehalt als Mittelwert; Alter als Median

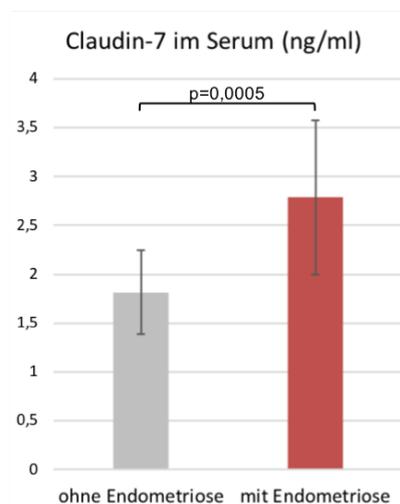


Abbildung 16: Claudin-7 Gehalt im Serum (ng/ml)

Tabelle 19 und Abbildung 16 zeigen die Ergebnisse der Serumanalyse von Claudin-7. Frauen mit Endometriose wiesen dabei hochsignifikant deutlich erhöhte Spiegel des Proteins auf.

Zur Untersuchung des diagnostischen Potentials einer Bestimmung des Claudin-7 Gehalts im Serum, wurde ein Grenzwert (*Cut-off*) bei 1,66 ng/ml festgelegt und eine Vierfeldertafel aufgestellt. Als Endometriose-positiv wurden Werte oberhalb jenes Cut-offs angesehen. Die Ergebnisse und statistischen Gütekriterien einer diagnostischen Bestimmung von Claudin-7 Serumspiegeln sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 20: Diagnostische Wertigkeit der Bestimmung von Claudin-7 im Serum

	Mit Endometriose	Ohne Endometriose	Summe	Vorhersagewert
Test positiv	Richtig positiv n=24	Falsch positiv n=6	n=30	<i>Positive predictive value</i> PPV=80 %
Test negativ	Falsch negativ n= 12	Richtig negativ n= 22	n=34	<i>Negative predictive value</i> NPV=65 %
Summe	n=36	n=28	n=64	
	Sensitivität =67 %	Spezifität =79 %		<i>Likelihood-Ratio (LR)</i> LR ⁺ =3,2 LR ⁻ =0,4

Wie in Tabelle 20 gezeigt, konnten mittels Bestimmung der Claudin-7 Konzentration im Serum von 36 an Endometriose erkrankten Frauen 24 korrekt als solche identifiziert werden. In 12 Fällen wurde die Erkrankung nicht erkannt, sodass sich eine Sensitivität von 67 % errechnete. In der Kontrollgruppe ohne Endometriose fiel der Test in 6 Fällen fälschlicherweise positiv, in 22 Fällen korrekterweise negativ aus, sodass sich für die Testung eine Spezifität von 79 % ergab. Der Vorhersagewert für ein positives Ergebnis lag somit bei 80 % und für ein negatives Ergebnis bei 65 %.

Zur Beschreibung, wie sich ein Testergebnis auf die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Endometriose auswirkt, wurde die Likelihood-Ratio bestimmt. Für die positive Likelihood-Ratio (LR⁺) ergab sich ein Wert von 3,2, für die negative (LR⁻) ein Wert von 0,4. Tabelle 21 gibt einen Überblick über die Einschätzung der Likelihoodratio in Bezug auf die Krankheitswahrscheinlichkeit.

Tabelle 21: Interpretation der Likelihood-Ratio (LR+) nach Jaeschke (1994)

LR ⁺	Krankheitswahrscheinlichkeit (Trennschärfe)
>10	eindeutig
5 – 9,99	moderat
2 – 4,99	gering (aber nicht unbedeutend)
1 – 1,99	gering (eher unbedeutend)

3.4 Zusammenfassender Vergleich der Proteinexpression von Vimentin, Claudin-11 und Claudin-7 in der Endometriose

An dieser Stelle sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine in den verschiedenen Entitäten der Endometriose synoptisch dargestellt werden.

3.4.1 Qualitative Beschreibung der Proteinlokalisierung

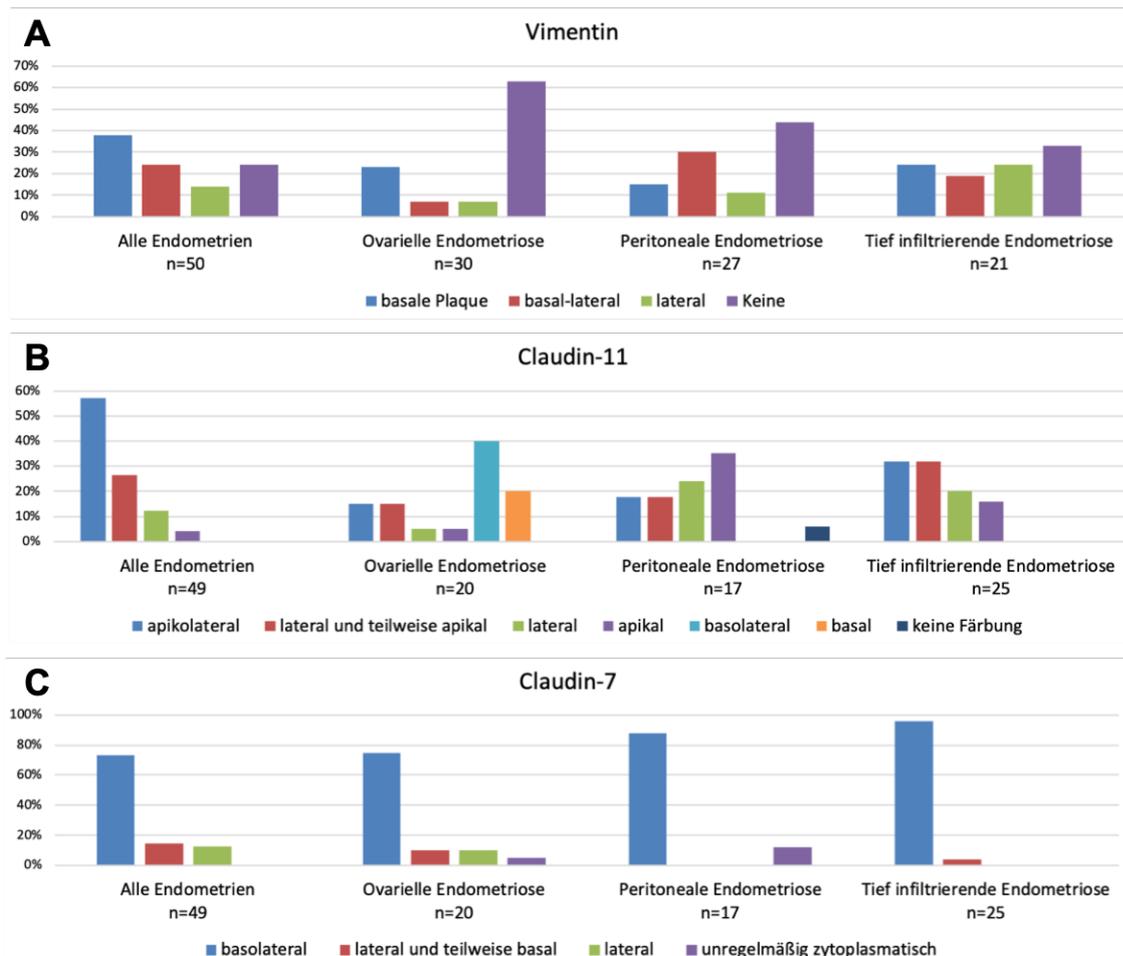


Abbildung 17: Übersicht über die Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisierungen von Vimentin (A), Claudin-11 (B) und Claudin-7 (7C) in eutopem Endometrium und endometriotischen Läsionen. Dabei markiert die X-Achse die entsprechende Untersuchungsgruppe, die Y-Achse gibt den jeweiligen Anteil der darin beobachteten Verteilungsmuster in Prozent an.

Abbildung 17 fasst die unterschiedlichen Verteilungsmuster der untersuchten Proteine im Endometrium und in den drei Entitäten der Endometriose zusammen. Dabei fällt auf, dass bei Vimentin und Claudin-11 die tief infiltrierende Endometriose in der Lokalisation der Proteine am meisten dem eutopen Endometrium ähnelt (Abb. 17 A,B). Die ovarielle Endometriose dagegen zeigt eine deutliche Abweichung der Proteinlokalisierung, während die peritonealen Läsionen dazwischen liegen. Claudin-7 ist generell weniger

Ergebnisse

divers verteilt und weist in der tief infiltrierenden Endometriose die deutlichste Präferenz für das basolaterale Kompartiment auf (Abb.17 C).

3.4.2 Quantitative Beschreibung der Proteinexpression

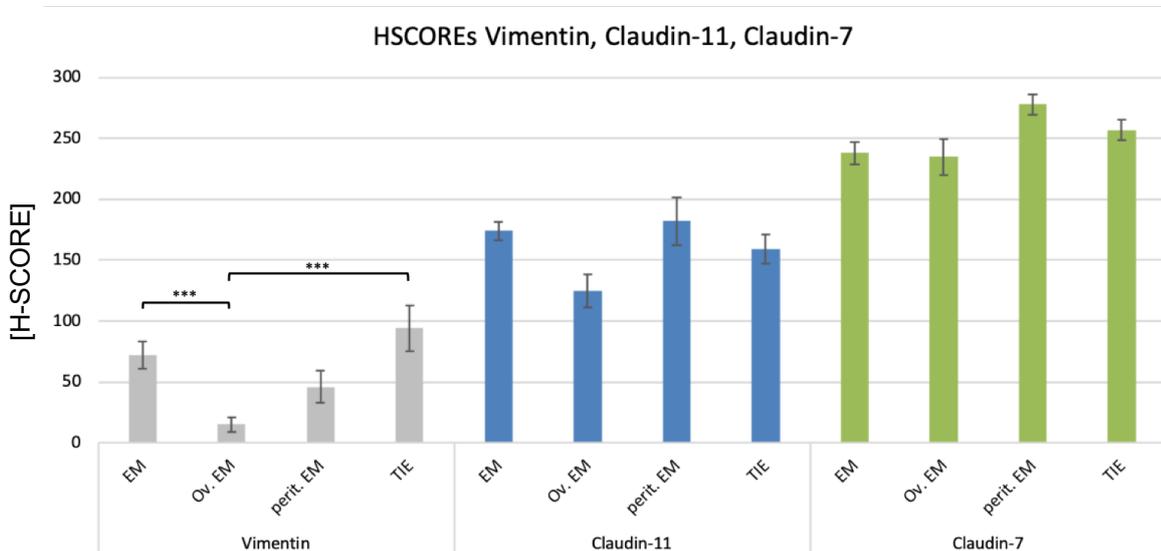


Abbildung 18: HSCORE-Mittelwerte \pm Standardfehler der untersuchten Proteine in endometrialen und endometriotischen Epithelzellen. Abkürzungen: EM= Endometrium; OEM= ovarielle Endometriose; PEM= peritoneale Endometriose; TIE= tief infiltrierende Endometriose. *** = $p \leq 0,001$

Abbildung 18 veranschaulicht die Expression von Vimentin, Claudin-11, sowie Claudin-7 im eutopen Endometrium und in den endometriotischen Läsionen. Im direkten Vergleich der unterschiedlichen Proteine lassen sich hier grundsätzliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten darstellen. Der in dieser Arbeit verwendete HSCORE berücksichtigt neben der Intensität der Färbereaktion den Anteil gefärbter Zellen und zeigte hier für Claudin-11 und insbesondere für Claudin-7 eine deutliche Proteinexpression in fast allen Zellen der untersuchten Proben aus sowohl Endometrium, wie auch den endometriotischen Läsionen. Außerdem waren für die Claudine Unterschiede zwischen den jeweiligen Entitäten nur mäßig ausgeprägt. Das generelle Expressionsniveau von Vimentin hingegen lag deutlich unterhalb dessen der beiden Claudine und wies darüber hinaus deutliche und zum Teil signifikante Divergenzen innerhalb der untersuchten Gruppen auf.

Darüber hinaus fiel die ovarielle Endometriose im Vergleich zu den anderen Entitäten durch die geringste Proteinexpression von sowohl Vimentin als auch Claudin-11 auf.

4 Diskussion

4.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden Blut und Gewebeproben von Frauen mit und ohne Endometriose analysiert. Das Untersuchungskollektiv für die immunhistochemische Proteinanalyse umfasste für die einzelnen Entitäten zwischen 16 und 31 Proben (Tab. 2 und 3) und liegt damit im üblichen Bereich grundlagenwissenschaftlicher Arbeiten zur Endometriose, welche zum Teil geringere (Bartley et al., 2014; Furuya et al., 2017) und zum Teil etwas größere Fallzahlen (Matsuzaki & Darcha, 2012) aufweisen. Das mediane Alter der Patientinnen war für die endometrialen Proben von Frauen mit und ohne Endometriose nahezu identisch, lag jedoch im Vergleich zu den Proben endometriotischer Läsionen um fast 10 Jahre höher, was an der Tatsache liegt, dass Exzisionsoperationen von ektopen Herden oftmals früher durchgeführt werden als Hysterektomien, welche zumeist erst nach abgeschlossener Familienplanung in Erwägung gezogen werden. Darüber hinaus muss einschränkend gesagt werden, dass für die endometrialen Proben notwendigerweise auf Patientinnen zurückgegriffen werden musste, die sich aus verschiedenen Indikationen, wie beispielsweise einer Myomentfernung oder einer Adenomyose einer Operation unterzogen haben. Die Möglichkeit einer Beeinflussung durch andere gynäkologische Erkrankungen kann somit nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber eher gering.

In der vorliegenden Studie wurden endometrialen Proben von Frauen mit und ohne Endometriose direkt miteinander verglichen, was in dieser Form nur in wenigen Arbeiten erfolgte (Konrad et al., 2020). Damit sind Rückschlüsse auf Veränderungen am vermuteten Ausgangspunkt der Erkrankung möglich. Auch die vergleichende Analyse aller drei endometriotischen Entitäten wird selten durchgeführt. Diese erscheint allerdings zur Klärung, ob diesen eine gemeinsame oder unterschiedliche Pathogenese zu Grunde liegt, unerlässlich.

Die Ergebnisse der Serumanalysen wiesen bereits bei einer Kohortengröße von 36 Patientinnen mit bestätigter Endometriose und 28 Frauen ohne Endometriose statistisch signifikante Unterschiede auf (Tab. 19), sodass bei einer Ausweitung des Untersuchungskollektivs vermutlich von einer Bestätigung und Erhärtung der gezeigten Ergebnisse auszugehen wäre. Abgesehen davon soll noch auf die Schwierigkeit hingewiesen werden, Endometriose-freie Frauen zu rekrutieren. Da in Untersuchungen gezeigt wurde, dass auch bei asymptomatischen Frauen trotzdem in bis zu 20 % der Fälle eine Endometriose nachgewiesen werden kann (Moen & Stokstad, 2002), kann nicht ausgeschlossen werden, dass in die Kontrollgruppe ebensolche eingeschlossen wurden.

4.2 Analyse der Proteinexpression von Vimentin

In der vorliegenden Studie sollte unter anderem untersucht werden, ob das pathogenetische Konzept der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) bei der Endometriose eine Rolle spielt. Als entscheidende Charakteristika der EMT gelten dabei der Verlust von epithelialen Markern und die Zunahme der Expression der mesenchymalen Marker (Thompson & Newgreen, 2005; Guarino et al., 2009; Thiery et al., 2009; Kriz et al., 2011; Chui, 2013; Tarin, 2013). Im Hinblick auf epitheliale Marker konnte beispielsweise für verschiedene Cytokeratine gezeigt werden, dass diese sowohl in eutopem Endometrium wie auch in ektopen endometriotischen Läsionen sehr deutlich und mit großer Ähnlichkeit exprimiert werden (Kruitwagen et al., 1991b; Konrad, et al., 2019a). Weiterhin wiesen auch endometriale Zellen im Menstruationssekret mit hoher Konstanz eine Expression von Cytokeratinen auf (van der Linden et al., 1995), sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch hier der epitheliale Charakter der endometrialen Zellen in den endometriotischen Läsionen erhalten bleibt.

In dieser Studie sollte nun ein möglicher mesenchymaler Charakter der endometrialen Epithelzellen evaluiert werden. Hierzu wurde die Proteinexpression von Vimentin untersucht, welches einen typischen Marker für mesenchymale Zellen darstellt und für den Nachweis einer EMT genutzt wird (Kidd et al., 2014).

Eine Stärke dieser Arbeit besteht in der vergleichenden Analyse von endometrialem Proben von Frauen mit und ohne Endometriose, sowie der getrennten Begutachtung epithelialer und stromaler Zellen. Da das Endometrium für uns die Quelle der Zellen und damit den Ursprung der Endometriose darstellt, wären Veränderungen an dieser Stelle als relevant für die Krankheitsentstehung anzusehen. Neben dem bloßen Vorhandensein von Zellen, ist nach unserer Hypothese der Pathogenese deren Anheftung und Transmigration durch das Peritoneum der entscheidende Schritt für die Bildung endometriotischer Läsionen. Diese bekommen schließlich einen Krankheitswert, sobald Schmerzen oder Infertilität als klinisches Korrelat vorliegen (Young et al., 2014). In der vergleichenden Analyse der Vimentinexpression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit des Menstruationszyklus. Das an anderer Stelle beschriebene Überwiegen in der proliferativen Phase (Nisolle et al., 1995; Song et al., 1998) konnte nur für die Endometrien ohne Endometriose nachvollzogen werden und stellte sich in der erkrankten Gruppe gegensätzlich dar. Bei der Untersuchung von eutopem Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose war die Vimentinexpression nahezu identisch und bestätigt damit die Ergebnisse von Xiong et al. (2016).

Diskussion

Während die Ergebnisse dieser Studie deutlich zeigen, dass Vimentin in endometrialen Epithelzellen am stärksten exprimiert wird, wurde hingegen in ovarieller Endometriose eine signifikante Verminderung gefunden. Dies steht in Übereinstimmung zu mehreren anderen Arbeiten (Nisolle et al., 1995; Song et al., 1998; Matsuzaki & Darcha, 2012).

Die Vimentinexpression war in der vorliegenden Arbeit auch in den peritonealen Endometrioseherden gegenüber dem eutopen Endometrium vermindert, nicht jedoch in tief infiltrierender Endometriose. Dies bestätigt einerseits die Ergebnisse einer vormaligen Studie (Nisolle et al., 1995), steht jedoch im Kontrast zu einer anderen Arbeit, in welcher behauptet wurde, dass es bei peritonealer Endometriose zu einer im Vergleich zum Endometrium vermehrten Vimentinexpression kommt (Matsuzaki & Darcha, 2012). Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz könnte sein, dass in der betreffenden Studie ebenfalls nur eine begrenzte Zahl peritonealer Proben untersucht wurde und als Vergleichsmaterial menstruiendes Endometrium verwendet wurde, welches aufgrund des hohen Anteils von Blutzellen möglicherweise zu Unregelmäßigkeiten bei der immunhistochemischen Analyse führen könnte.

Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Verlust der Vimentinexpression könnte schließlich relevante Auswirkungen auf die lokale Reaktion des Körpers auf endometriotische Implantate – zumindest im Bereich der ovariellen Endometriose – haben. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Vimentin zu einer gestörten Wundheilung führt. Dies kommt durch eine Hemmung des Fibroblastenwachstums zustande, was eine verminderte Aktivierung von TGF- β sowie dem Slug-Protein zur Folge hat und damit einer Epithelial-Mesenchymalen Transition entgegen steht (Cheng et al., 2016).

Interessanterweise unterschied sich in der vorliegenden Arbeit die Vimentinexpression bei den verschiedenen Entitäten der Endometriose deutlich und signifikant. Postuliert man eine grundsätzlich gemeinsame Pathogenese, können diese Unterschiede entweder Ausdruck eines lokalen Einflusses des umgebenden Wirtsgewebes oder aber eines unterschiedlichen Erkrankungsstadiums sein. In diesem Fall ließe sich die in dieser Studie angedeutete und auch von anderen Autoren (Matsuzaki & Darcha, 2012) publizierte Erhöhung der Vimentin Expression in der tief infiltrierenden Endometriose als Ausdruck eines Krankheitsprogresses auffassen. Vormals peritoneale Läsionen würden damit, entweder durch einen äußeren Trigger oder eine inerte genetische Veränderung, invasiver und breiteten sich tiefer im Gewebe aus.

Andere Autoren gehen hingegen eher davon aus, dass es sich bei ovarieller, peritonealer und tief infiltrierender Endometriose um drei voneinander unterschiedliche Pathologien handelt, die sich nur in ihrem Aussehen ähneln (Nisolle & Donnez, 1997; Gordts et al., 2017). Dann ließen sich die Unterschiede bei der Vimentinexpression auch

Diskussion

als Ausdruck dieser Heterogenität werten. Bis heute haben die Autoren jedoch noch keine schlüssige Hypothese vorlegen können, wie die hierzu vermutete Metaplasie vonstatten geht. Die Umwandlung eines oder mehrerer Zelltypen zu endometrialen Epithel- und Stromazellen auch an äußerst verschiedenen Orten und Milieus erscheint sehr unwahrscheinlich, wenn auch nicht gänzlich unmöglich (Konrad et al., 2019b).

Bei der Analyse von stromalen Zellen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit schließlich ein anderes Bild als für die Epithelzellen (Tab. 13). Dort wiesen alle endometriotischen Entitäten eine gegenüber dem eutopen Endometrium deutlich erhöhte Expression von Vimentin auf. Besonders auffällig - und auch statistisch signifikant - war dies bei der ovariellen Endometriose zu beobachten. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass Vimentin durch seine Funktion zur mechanischen Stabilisierung von Zellen (Sanghvi-Shah & Weber, 2017) gerade in den blutgefüllten Endometriosezysten vermehrt genutzt wird, um den dort im Vergleich zu glandulären Herden erhöhten physikalischen Einflüssen Rechnung zu tragen.

Bei der qualitativen Analyse der Proteinexpression von Vimentin zeigte sich ein heterogenes Bild im Hinblick auf dessen subzelluläre Lokalisation. Es kristallisierten sich keine eindeutigen Trends oder Unterschiede heraus, die Rückschlüsse auf funktionelle Aspekte zulassen würden. Am ehesten lässt sich aus der breiten Verteilung schließen, dass die Expression von Vimentin interindividuell und auch im zeitlichen Verlauf nicht stabil, sondern flexibel reguliert ist. Diese große biologische Variabilität ist gut bekannt. Sie wird durch Größe und Struktur der einzelnen Moleküle, ihre Fähigkeit zur Zusammenlagerung mit anderen Intermediärfilamenten sowie zahlreiche posttranslationale Modifikationen erreicht (Danielsson et al., 2018) und lässt sich als Ausdruck der zahlreichen biologischen Funktionen von Vimentin auffassen.

4.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Rolle der Epithelial-Mesenchymalen Transition in der Pathogenese der Endometriose

Neben einer Zunahme der mesenchymalen Charakteristika gilt der Verlust von epithelialen Eigenschaften als das entscheidende Kennzeichen einer Epithelial-Mesenchymalen Transition (Thiery, 2002). Als klassische epitheliale Marker gelten dabei die Cytokeratine, welche – ebenso wie Vimentin – als Intermediärfilamente am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind und vom Endometrium exprimiert werden (Chu & Weiss, 2002; Moll et al., 2008). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression verschiedener Cytokeratine im Endometrium, wie auch in endometriotischen Läsionen weitgehend erhalten bleibt (Konrad, et al., 2019a). Eine Studie, welche die Proteinexpression von Epithelzellen aus Menstruationsblut untersuchte, wies dort ebenfalls den Erhalt von epithelialen Markern sowie das Vorhandensein von Vimentin nach (van der Linden et al., 1995).

Eine aktuelle Übersichtsarbeit von Konrad et al. (2020) zur Beteiligung der EMT bei der Endometriose zeigte deutlich, dass auf endometrialer Ebene keine signifikanten Veränderungen der epithelialen Marker E-cadherin und β -catenin vorliegen. In den endometriotischen Läsionen hingegen fiel für beide eine reduzierte Expression auf. Hierzu invers korrelierend, konnte für mesenchymale Marker in ektope Endometrium eine Zunahme in der Mehrzahl der Untersuchungen festgestellt werden, während die Erscheinung im eutopen Endometrium erneut sehr ähnlich war.

In Übereinstimmung dazu wies der in der vorliegenden Arbeit untersuchte, mesenchymale Marker Vimentin keine Unterschiede im Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose auf. Jedoch ließ sich hier kein eindeutig vermehrtes Vorkommen in endometriotischen Epithelzellen nachweisen. Lediglich bei der tief infiltrierenden Endometriose ließ sich eine verstärkte Vimentinexpression beobachten. Im Falle der ovariellen Endometriose spricht der deutlich gezeigte und von anderen Autoren auch bestätigte Abfall der Vimentinexpression – zumindest für diese Entität – sogar gegen eine Beteiligung der EMT.

Folglich gehen wir davon aus, dass das Konzept der Epithelial-Mesenchymalen Transition nicht den entscheidenden Faktor für die Dissemination endometrialer Zellen darstellt und erst nach der Implantation eine mögliche Rolle spielt.

Eine Untersuchung von Mutationsprofilen epithelialer und stromaler Endometriosezellen zeigte darüber hinaus keine gemeinsamen Mutationen (Suda et al., 2019) und spricht damit für eine unterschiedliche Herkunft beider Zelltypen. Dies spricht ebenfalls gegen das Ablaufen einer totalen EMT.

Diskussion

Möglicherweise ist eine klare Dichotomisierung in epitheliale und mesenchymale Zellen im Falle des Endometriums und der Endometriose auch nicht unbedingt sinnvoll. Die von vielen Autoren nachgewiesene Koexpression epithelialer, wie auch mesenchymaler Marker (Nisolle et al. 1995; Song et al., 1998; Matsuzaki & Darcha, 2012; Konrad, et al., 2019a) legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Betrachtung und Einordnung der Zellen nicht um zwei klar unterscheidbare Pole, sondern eher um ein Spektrum mit fließenden Übergängen handelt (Nieto et al., 2016). Darüber hinaus ist die Expression von Genen und Proteinen nicht auf bestimmte Zelltypen beschränkt und muss bei der Interpretation von Expressionsprofilen berücksichtigt werden (Chai et al., 2010).

Dies hat dazu geführt, dass das Paradigma der zwei alternativen Zellzustände zunehmend hinterfragt und hypothetisiert wird, dass Zellen eine partielle EMT durchlaufen und auch in Zwischenformen vorliegen können (Nieto et al., 2016). Dieses Prinzip konnte bereits für die Progression von Krebs (Grigore et al., 2016) und Nierenfibrose (Grande et al., 2015; Lovisa et al., 2015) bestätigt werden und erscheint im Angesicht unserer Ergebnisse auch für die Endometriose als plausibel.

In diesem Kontext ließen sich auch Ergebnisse, die in endometriotischen Läsionen eine Zunahme von EMT Markern beschreiben, dahingehend interpretieren, dass es zwar nicht zu einem Wechsel des Zellphänotypen kommt, jedoch bestimmte Gene, die mit Invasivität und Mobilität assoziiert sind, vermehrt exprimiert werden. Dazu zählen beispielweise ZEB 1 (zinc finger E-box-binding homeobox 1) (Furuya et al., 2017; Konrad et al., 2019a), N-Cadherin, Twist und Snail (Bartley et al., 2014) sowie TGF- β (Young et al., 2014).

Gerade die tief infiltrierende Endometriose weist, passend zum klinischen Bild (Chapron et al., 2003), in besonderem Maße invasive Mechanismen wie eine verminderte Apoptose, erhöhte Proliferationsrate und erhöhte Expression von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) auf (Tosti et al., 2015). Passend zu diesen, typischerweise in malignen Erkrankungen beschriebenen Eigenschaften, sind für die tief infiltrierende Endometriose auch Krebs-assoziierte genetische Mutationen wie zum Beispiel in den Genen für ARID1A, PIK3CA, KRAS, oder PPP2R1A beschrieben (Anglesio et al., 2017). Sieht man Vimentin auch als einen solchen Marker für Invasivität an, weisen die von uns gezeigten Ergebnisse, mit erhöhter Expression in tief infiltrierender gegenüber ovariellen und peritonealen Endometriose, ebenfalls in die gleiche Richtung.

4.4 Analyse der Proteinexpression von Claudin-11

In dieser Arbeit wurden Proteine untersucht, die dem Zytoskelett und den Verbindungselementen mit anderen Zellen angehören und damit essentiell für die grundlegende Struktur und Erscheinungsform von Epithelverbänden sind. Eine entscheidende Rolle für den Zusammenhalt benachbarter Zellen spielen dabei die tight junctions (Heinrich et al., 2014), deren Barrierefunktion insbesondere durch Claudine ermöglicht wird (Rosenthal et al., 2017).

Nachdem zuvor der epitheliale Charakter der einzelnen Zellen untersucht wurde, wird mit der Analyse der Zell-Zell-Kontakte nun auch der Epithelverband im Ganzen analysiert. Damit soll beleuchtet werden, ob es bei der Pathogenese der Endometriose zu einem Aufbrechen der Integrität der Epithelverbände kommt, und dadurch die dabei vermutete Zellverschleppung möglicherweise begünstigt wird.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen erstmalig und eindrücklich, dass Claudin-11 ubiquitär in endometrialen Epithelzellen von Frauen mit und ohne Endometriose vorkommt, obwohl eine Microarray-Studie keine Expression hatte vermuten lassen (Gaetje et al., 2008). Während in der Gruppe ohne Endometriose die Expression in beiden Zyklusphasen nahezu identisch war, wurde bei Frauen mit Endometriose eine gegenüber der proliferativen Phase vermehrte Proteinexpression in der sekretorischen Phase beobachtet. Da dies nicht signifikant war, bleibt fraglich, ob Claudin-11 ebenso zyklusabhängig exprimiert wird, wie es für die Claudine -3, -4 und -7 beschrieben ist (Gaetje et al., 2008).

Nachdem sich zwischen den Gruppen mit und ohne Endometriose keine signifikanten Unterschiede zeigten, scheint Claudin-11 zumindest in der Frühphase der Krankheitsentstehung noch keine entscheidende Rolle zu spielen.

In den endometriotischen Läsionen fand sich ebenfalls eine deutliche Expression des Proteins. Im quantitativen Vergleich mit dem eutopem Endometrium zeigte sich generell eine hohe Ähnlichkeit mit leicht und nicht signifikant verminderten HSCORE Werten bei der ovariellen und tief infiltrierenden Endometriose. In den peritonealen Läsionen hingegen wurde eine minimal erhöhte Proteinexpression beobachtet, was in Übereinstimmung mit einer Microarray Analyse steht, aber nicht proportional zur dort beschriebenen stark erhöhten Genexpression ist (Sohler et al., 2013). Folglich gehen wir davon aus, dass die Menge der Claudin-11 Expression nicht von entscheidender pathogenetischer Relevanz ist.

Da allerdings bei der Auswertung der immunhistochemischen Lokalisationen und Intensitäten heterogene Färbemuster beobachtet wurden, analysierten wir das qualitative Expressionsmuster unter Zuhilfenahme eines eigens hierfür erstellten

Diskussion

Lokalisationsscores genauer. Während die eutopen Endometriumszellen erneut eine hohe Konstanz und Ähnlichkeit aufwiesen, zeigte sich bemerkenswerterweise eine deutlich veränderte subzelluläre Lokalisation von Claudin-11 von apikal im Endometrium nach basal in den endometriotischen Läsionen.

Als Bestandteil von tight junctions erwartet man das Vorkommen von Claudin-11 im Bereich der apikolateralen Zellkontakte (Stammler et al., 2016). Damit stellt das im eutopen Endometrium beobachtete Expressionsmuster den Regelfall dar, während es in den endometriotischen Entitäten zu einer zunehmenden und signifikanten Abweichung nach basal kommt. Insbesondere bei der ovariellen Endometriose konnte eine deutliche Mislokation beobachtet werden.

Eine irreguläre Proteinlokalisierung ist für viele Erkrankungen beschrieben und kann durch verschiedene Mechanismen begründet sein. Hierzu zählen Veränderungen des Proteins selbst im Bereich von Signal-Sequenzen oder post-translationalen Modifikationen, oder aber der Transportsysteme der Zelle (Hung & Link, 2011).

Claudin-11 ist im menschlichen Hoden mit einer Mislokalisierung bei gestörter Spermatogenese (Stammler et al., 2016) sowie intraepithelialer Neoplasie (Fink et al., 2009) assoziiert. Dies lässt vermuten, dass nicht nur die quantitative Expression, sondern auch die subzelluläre Lokalisation entscheidend für das physiologische Funktionieren der Zellen ist und die hier gezeigte Verschiebung möglicherweise zur Pathogenese der Endometriose beiträgt. So könnte die verminderte Präsenz von Claudin-11 im Bereich der apikolateralen Zellkontakte eine Störung der dort vorhandenen tight junctions zur Folge haben. Dies wiederum könnte zu einer Einschränkung der Barrierefunktion und dem Verlust von Zellpolarität führen, was als förderlich für die Krebsentstehung (Sawada, 2013) sowie Zellmigration und Metastasierungspotential (Martin, 2014) beschrieben ist. Allerdings handelt es sich bei den hier vorgelegten Daten um rein deskriptive Beobachtungen. Ob die Claudin-11 Mislokalisierung also tatsächlich zu einer relevanten Barrierestörung führt, oder ob diese durch andere Claudine kompensiert werden kann, bleibt zu klären. Beispielsweise konnte bei Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke von Mäusen gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von Claudin-3 zu einer vermehrten Expression von Claudin-1 kommt, um so möglicherweise einen Erhalt der tight junction Funktion zu erreichen (Castro Dias et al., 2019).

Schließlich gilt eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion durch Repression von Cadherinen, Occludinen, Desmoplakinen und Claudinen auch als Charakteristikum der zuvor besprochenen Epithelial-Mesenchymalen Transition (De Wever et al., 2008) und würde zur zuvor besprochenen Hypothese der partiellen EMT passen. Darüber hinaus wurde in Plattenepithelkarzinomen gezeigt, dass der für die EMT typische Marker Snail zu einer

Diskussion

vermehrten Expression von Claudin-11 führte und in der Folge eine Verschlechterung der onkologischen Prognose durch Förderung von Tumormigration bedeutete (Li et al., 2019). Im Falle der Endometriose belegten *in vitro* Daten hingegen, dass eine Gen-Stillegung von Claudin-11 mit konsekutiv verminderter Proteinexpression in der endometriotischen Zelllinie 49Z zu einer verminderten Invasivität dieser Zellen führt (Horné et al., 2019). Claudin-11 scheint also sowohl Zellmotilität und -invasivität fördernde, wie auch hemmende Eigenschaften zu haben und weist zusätzlich Berührungspunkte mit der EMT auf.

Diese auf den ersten Blick scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse unterstreichen die Schwierigkeiten, Erkenntnisse aus der Claudin-Forschung auf unterschiedliche Erkrankungen zu übertragen, da deren Regulation abhängig vom Claudin-Subtyp sowie der jeweils exprimierenden Zelle ist (Lioni et al., 2007; Dahiya et al., 2011; Sawada, 2013; Bhat et al., 2015).

Gerade bei Analogien zu Krebserkrankungen muss bei der Endometriose eine pathogenetische Besonderheit berücksichtigt werden. Anders als bei malignen Prozessen, wo eine veränderte Zellstruktur einer Metastasierung in aller Regel vorausgeht, gehen wir hier von einem umgekehrten Weg aus. Nach der Transplantationstheorie kommt es durch retrograde Menstruation zu einer Dislokation zunächst regelhafter Endometriumszellen, die vermutlich erst im Rahmen von Adhäsion, Transmigration und Implantation durch eine Wechselwirkung mit dem lokalen „Microenvironment“ eine veränderte Proteinexpression und Zellgestalt ausbilden.

4.5 Analyse der Proteinexpression von Claudin-7

Die Fähigkeit zur Metastasierung ist ein zentrales Merkmal von Krebserkrankungen und ein entscheidender Faktor für die daraus resultierende Morbidität und Mortalität. In vielen Fällen stellt der Abbau von Zell-Zell-Kontakten einen wichtigen Mechanismus für die Loslösung der Krebszellen von ihrem jeweiligen Primarius und den Zugewinn metastatischer Eigenschaften dar (Thompson & Newgreen, 2005; Lambert et al., 2017). Da nach der Transplantationstheorie die Metastasierung und konsekutive Implantation von endometrialem Gewebe den entscheidenden Schritt in der Pathogenese der Endometriose darstellt, sind die Zellkontakte ein wichtiger Fokus in der Erforschung dieser Erkrankung. Claudin-7 ist ebenso wie Claudin-11 am Aufbau von diesen beteiligt und darüber hinaus bei verschiedenen Krebserkrankungen beeinflusst.

Unsere Ergebnisse zeigen eine deutliche und konstante Expression von Claudin-7 im eutopen Endometrium. Dabei wiesen die Gruppen mit und ohne Endometriose nahezu identische HSCORE Werte auf, sodass auf endometrialer Ebene auch hier kein Hinweis auf eine pathogenetische Veränderung vorliegt. In beiden Gruppen war die Proteinexpression in der sekretorischen gegenüber der proliferativen Phase leicht, aber nicht signifikant erhöht, was in Übereinstimmung mit Microarray-Analysen steht (Gaetje et al., 2008).

In der Vergangenheit beschrieben andere Studien eine verringerte Proteinexpression der Claudine-3 und -4, (Pan et al., 2009) sowie auch -5 und -7 (Gaetje et al., 2008) in endometriotischem gegenüber endometrialem Gewebe und postulierten darin einen möglichen Beitrag zur Ablösung und Migration endometrialer Zellen. Im Gegensatz dazu weisen die in dieser Arbeit erhobenen Daten eine deutliche und im Falle der peritonealen und tief infiltrierenden Endometriose sogar eine leicht erhöhte Proteinexpression von Claudin-7 nach. Ein möglicher Grund für die Diskrepanz zur letztgenannten Studie könnte in einem unterschiedlichen Detektionsverfahren der Antikörper und einer dort deutlich geringeren Anzahl der endometriotischen Gewebeproben liegen. Wie in Vorversuchen an unserem Institut gezeigt werden konnte, scheint bei der immunhistochemischen Färbung von Claudinen das Verfahren der Gewebsfixierung ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen, da deutliche Unterschiede zwischen Bouin und Formalin fixierten Proben auffielen. Auch wurde lediglich eutopes mit ektopem Endometrium verglichen und auf eine Differenzierung der drei Entitäten der Endometriose verzichtet. Zuletzt zeigten sich zumindest bei Claudin-5 gegensätzliche Ergebnisse für die Microarray-, PCR- und immunhistochemischen Ergebnisse (Gaetje et al., 2008). Die in der vorliegenden Arbeit in peritonealen Herden beobachtete, vermehrte Proteinexpression von Claudin-7 steht darüber hinaus im Gegensatz zu Microarray

Diskussion

Analysen (Sohler et al., 2013) und zeigt, dass eine Veränderung auf Genexpressionsebene sich nicht unbedingt auf Proteinebene manifestieren muss.

Die in der vorliegenden Studie beobachtete Konsistenz von Claudin-7 und auch -11, konnte in einer aktuellen Arbeit auch für die Claudine -2 und -3 nachgewiesen werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit sowohl der Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose, als auch der endometriotischen Läsionen. Damit wird erneut der epithelialen Phänotyp der Zellen unterstrichen (Hoerscher et al., 2020).

In der qualitativen Analyse fiel für Claudin-7 eine vornehmlich basolaterale Proteinlokalisierung entlang der Zellmembran sowohl im eutopen Endometrium als auch in den endometriotischen Läsionen auf. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit anderen Studien, die ebenfalls diese für Claudine eher untypische subzelluläre Verteilung beschreiben (Mendoza-Rodríguez et al., 2005; Ding et al., 2012). Dies spricht dafür, dass Claudin-7 neben der Beteiligung an Zell-Zellkontakten auch Eigenschaften aufweist, die nicht direkt im Zusammenhang mit tight junctions stehen, und fügt sich damit in die wachsende Evidenz ein, Zell-Zell Verbindungen auch Funktionen in Signalwegen und Einflüsse auf die Genexpression zuzuschreiben (Grund & Grümmer, 2018). So konnte für Lungenkrebszellen gezeigt werden, dass Claudin-7 regulativ auf die Zellproliferation wirkt und durch eine Interaktion mit Integrin- β 1 wichtig für die Zell-Matrix-Interaktion und -Verbindung ist (Lu et al., 2015). Diese Effekte könnten bei der Endometriose, deren Entstehung auf Ablösung und Anheftung von Zellen basiert, ebenso eine Rolle spielen. Eine weitere Untersuchung der Zell-Matrix-Verbindungen und der interagierenden Proteine erscheint vor diesem Hintergrund lohnenswert.

Die Beschaffenheit und der Zusammenhalt der extrazellulären Matrix selbst wird in großem Maße durch einen MMP vermittelten Abbau bestimmt (Nagase & Woessner, 1999). Ein typisches Beispiel dafür stellt die Menstruation dar, wo es durch starke MMP-Aktivität zu einem massiven Gewebeabbau kommt. Dieser wird eng reguliert, um einerseits eine übermäßige Schädigung zu vermeiden und andererseits die Gewebsregeneration zu ermöglichen (Chevronnay et al., 2012). Neben ihren proteolytischen Eigenschaften sind MMPs auch an zellulären Signalwegen beteiligt (Rodríguez et al., 2010) und stehen aus diesem Grund ebenfalls im Fokus der Erforschung verschiedener Krankheitsbilder. Weiterhin interagieren MMPs auch mit Claudinen. In ovariellen Epithelzellen beispielsweise führte die Expression von Claudin-3 und -4 zu einer vermehrten Aktivität von MMP-2 und könnte eine Rolle in ovarieller Tumorgenese und Metastasierung spielen (Agarwal et al., 2005). Für das hier untersuchte Claudin-7 konnte ebenfalls eine Beteiligung beim Ovarialkarzinom nachgewiesen werden. Eine Überexpression hatte hier zwar eine verminderte Migration

Diskussion

zur Folge, führte aber durch eine verstärkte MMP-Aktivierung zu einer vermehrten Invasivität (Dahiya et al., 2011).

In vitro Daten aus unserem Institut zeigten ebenfalls Einflüsse von Claudinen auf die Zellinvasivität. Die Gen-Stillegung von Claudin-7 führte in den grundsätzlich wenig invasiven endometrialen, epithelialen Ishikawa-Zellen zu einer vermehrten Invasivität, während hingegen die Gen-Stillegung von Claudin-11 in den hoch invasiven endometrialen, epithelialen 49Z und 12Z Zellen eine verminderte Invasivität zur Folge hatte. Diese eher heterogenen Effekte legen nahe, dass nicht die quantitative Menge der Claudine entscheidend ist, sondern dass es funktionelle Eigenschaften – wie beispielsweise Verbindungen mit MMPs – sind, die die jeweiligen Effekte vermitteln (Horné et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Interpretation von Veränderungen der Claudin-7 Expression komplex ist. Ohne Zweifel handelt es sich um ein Protein, welches zahlreiche wichtige Funktionen für die Einbettung der Zelle in ihre unmittelbare Umgebung und darüber hinaus erfüllt. So hatte die Ausschaltung von Claudin-7 im Tierversuch schwere Störungen verschiedener Organsysteme zur Folge und war mit dem Leben nicht vereinbar (Xu et al., 2019). Nichtsdestotrotz scheint aber die rein quantitative Menge der Expression der Proteine nicht pauschal als pathogenetisch relevant zu werten sein. Dies zeigen die in dieser Studie angeführten Ähnlichkeiten zwischen eutopem Endometrium und endometriotischen Läsionen und die bei anderen Erkrankungen beobachteten heterogenen Effekte von veränderten Claudin-7 Expressionsleveln, welche mal krankheitsfördernd und mal hemmend wirkten (Lioni et al., 2007; Dahiya et al., 2011; Bhat et al., 2015).

4.6 Claudin-7 ELISA

Eine zentrale Herausforderung in der Versorgung von Endometriose Patientinnen stellt die Diagnose der Erkrankung dar. Wie bereits an früherer Stelle erörtert, ermöglicht bislang nur eine operative Visualisierung, idealerweise mit histologischer Begutachtung, die Sicherung der Diagnose (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), 2013). Allerdings stellt dies ein erheblich invasives Verfahren dar, welches die Patientin operativen und anästhesiologischen Risiken aussetzt und deshalb vermutlich zu zurückhaltend eingesetzt wird. Denkbar ist auch, dass aufgrund einer häufigen Verharmlosung der Symptome durch das Umfeld und die betreuenden Ärzte der Patientinnen (Hudelist et al., 2012) sowie einem fehlenden Bewusstsein für die Endometriose, notwendige Untersuchungen verzögert werden. Auch die Vielzahl möglicher Differentialdiagnosen (Schindler, 2007) ist ein weiterer Grund für die teilweise jahrelange Leidensdauer bis eine Diagnose gestellt wird (Husby et al., 2003).

Folglich besteht der dringende Bedarf nach anderen diagnostischen Verfahren wie Biomarkern oder verbesserter Bildgebung, um eine weniger invasive und zuverlässige Erkennung von Endometriose zu ermöglichen (Kavoussi et al., 2016). Obwohl dahingehend bereits große Anstrengungen unternommen worden sind, konnten in aktuellen Cochrane Analysen keine der bislang propagierten Biomarker im Blut (Nisenblatt et al., 2016) oder im Endometrium (Gupta et al., 2016) statistisch validiert werden.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der hier vorliegenden Studie versucht, einen nicht-invasiven Biomarker zur Diagnose der Endometriose zu etablieren. In den immunhistochemischen Analysen zeigte sich für Claudin-7 die deutlichste und konstanteste Expression sowohl im eutopen Endometrium als auch in den endometriotischen Läsionen und stellte damit den vielversprechendsten Kandidaten für einen Endometriosemarker dar.

Bislang wurde Claudin-7 als Biomarker lediglich für das kolorektale Karzinom untersucht und zeigte hierbei gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe verminderte Serumspiegel (Karabulut et al., 2015).

Unter der Annahme, dass bei Frauen mit Endometriose aufgrund der höheren Zelllast entsprechend mehr Claudin-7 exprimiert wird, wurden die Serumspiegel dieses Proteins bei Frauen mit und ohne Endometriose erstmalig vergleichend analysiert. Hierbei zeigten sich in der Gruppe der an Endometriose erkrankten Frauen hochsignifikant deutlich erhöhte Claudin-7 Werte. Dies übersteigt die in den Gewebeanalysen beobachtete relative Zunahme der Claudin-7 Expression deutlich. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass Frauen mit Endometriose aufgrund der Dissemination quantitativ

Diskussion

mehr endometriale und endometriotische Epithelzellen besitzen und dies mit den Serumspiegeln korreliert. Alternativ könnte eine derartige Diskrepanz auch darin begründet sein, dass es aus endometriotischem Gewebe zu einem vermehrten Übertritt von Claudin-7 ins periphere Blut kommt und sich dies dort entsprechend nachweisen lässt. Eine andere Erklärung für den Nachweis von Claudin-7 im Blut könnten dort zirkulierende, endometriale Zellen darstellen. In einer Studie konnten solche bei 17 von 19 Patientinnen mit Endometriose - gegenüber 6 von 40 Probandinnen in einer Kontrollgruppe - nachgewiesen werden (Chen et al., 2017). Diese hohe Detektionsrate konnte in einer weiteren Arbeit bestätigt werden und zeigte sich dabei unabhängig vom klinischen Stadium, sowie der Lokalisation der endometriotischen Läsionen (Pospisilova et al., 2019). Während die Zellen in erstgenannter Publikation einen epithelialen Charakter aufwiesen, fand eine andere Gruppe ausschließlich stromale zirkulierende Zellen (Vallvé-Juanico et al., 2019).

Neben pathogenetischen Aspekten, sollte auch die Wertigkeit einer Claudin-7 Messung im Serum für diagnostische Zwecke erörtert werden. Hier lieferte unsere Testung für diese Kohorte eine Sensitivität von 67 %, eine Spezifität von 79 % und entsprechend einen positiven Vorhersagewert von 80 % sowie einen negativen Vorhersagewert von 65 %. Eine Ausweitung des Testkollektivs ließe vermutlich noch eine Verbesserung dieser Maßzahlen erwarten und wäre für eine klinische Etablierung des Tests unabdingbar.

Für die Aussagekraft eines diagnostischen Testverfahrens bei Ausweitung auf eine Gesamtpopulation ist die Vortestwahrscheinlichkeit entscheidend, welche bei Krankheiten aus deren Prävalenz in der Bevölkerung besteht. Der Vorhersagewert nimmt dabei mit steigendem Vorkommen zu und läge bei einer Prävalenz von 10 % für einen Test mit den hier angeführten Gütekriterien bei lediglich 26 %.

Eine prävalenzunabhängige, statistische Maßzahl ist dagegen die (positive) Likelihood-Ratio, welche sich nach $\frac{\text{Sensitivität}}{1-\text{Spezifität}}$ errechnet und für diesen Test bei 3,2 liegt. Damit gilt die Krankheitswahrscheinlichkeit für diesen Wert zwar als gering aber nicht unbedeutend, während sie für einen Wert über 10 eindeutig wäre (Tab. 21; Jaeschke, 1994).

Die hier angeführten Werte zeigen, dass eine Bestimmung von Claudin-7 im Blut nur eine sehr eingeschränkte Aussagekraft besitzt und allein sicher keine weiteren Maßnahmen rechtfertigen würde. In Zusammenschau mit anderen anamnestischen oder klinischen Informationen könnte ein positiver Befund aber durchaus den Verdacht auf eine Endometriose erhärten und eine invasivere Diagnostik nahelegen.

Diskussion

Nichtsdestotrotz scheint auch dieser Test allein für eine sichere, nicht-invasive Diagnose der Endometriose nicht auszureichen. Dies erscheint auch unter Berücksichtigung der immunhistochemischen Ergebnissen und den dort beobachteten hohen Ähnlichkeiten zwischen gesundem und erkranktem Gewebe plausibel und unterstreicht erneut die Komplexität dieser Erkrankung. Weitere Forschung, auch unter Zuhilfenahme neuartiger Methoden wie den beispielsweise in der Früherkennung von Brustkrebs-Rezidiven bereits angewandten *liquid biopsies* (Garcia-Murillas et al., 2015) ist damit dringend nötig, um die Versorgung der betroffenen Patientinnen weiter zu verbessern.

4.7 Einordnung der Ergebnisse für die Pathogenese der Endometriose und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der phänotypischen Charakterisierung des endometrialen Ursprungsgewebes sowie der endometriotischen Läsionen. Nach Analyse der Expressionsprofile von Vimentin, Claudin-11 sowie Claudin-7 zeichnet sich als gemeinsames Bild eine hohe Ähnlichkeit der eutopen sowie der ektopen endometrialen Epithelzellen ab. Wenn auch im Einzelnen Unterschiede zwischen den verschiedenen Entitäten auf quantitativer oder qualitativer Ebene beobachtet werden konnten, blieb entlang der in der Transplantationstheorie postulierten Sequenz aus uteriner Ablösung, retrogradem tubaren Transport und schließlich peritonealer Anheftung und Invasion der Phänotyp der Zellen weitgehend konstant.

Bei den hier untersuchten Markern handelt es sich allesamt um Proteine, die die physische Struktur der Zelle selbst, sowie ihre Einbettung in die Umgebung definieren. Auch wenn damit die grundsätzliche Erscheinungsform der Zellen ähnlich bleibt, sind auf funktioneller Ebene durchaus Unterschiede denkbar und werden beispielsweise durch die Mislokalisierung von Claudin-11 suggeriert.

In jedem Fall muss bei der Bewertung jeglicher deskriptiver Ergebnisse kritisch hinterfragt werden, ob es sich bei beobachteten Veränderungen um pathogenetisch relevante Auffälligkeiten, oder lediglich um Begleiterscheinungen des krankhaften Prozesses handelt.

In Ermangelung geeigneter Krankheitsmodelle ist aktuell nur ein Vergleich zwischen dem vermuteten Ursprungsgewebe – dem Endometrium – und der krankhaften endometriotischen Läsion möglich. Der Prozess dazwischen ist bisher nur ansatzweise untersucht und damit ist der Zeitpunkt, an dem die Veränderungen auftreten, nicht zu bestimmen. Eine Analyse der wandernden Zellen - zwischen Ablösung und Anheftung – würde hier weiterhelfen.

Um zu metastasieren, durchlaufen Tumorzellen eine umfangreiche Kaskade aus Loslösung vom Primärtumor, Invasion durch umgebendes Gewebe und Übertritt ins Gefäßsystem oder Einbruch in Körperhöhlen, gefolgt von Anheftung, Extravasation und schließlich Proliferation. Dieser Prozess ist äußerst komplex, damit in hohem Maße ineffizient und bedarf verschiedener Strategien und zellulären Veränderungen, um erfolgreich zu sein (Hunter et al., 2008).

Bei der Endometriose hingegen liegt eine besondere Situation vor. Durch den während der Menstruation physiologisch erfolgenden Gewebsabbau, wird die Zellablösung deutlich vereinfacht. Die hohe Rate an retrograder Menstruation ermöglicht dann eine Verschleppung der Zellen in die Bauchhöhle. Die in der vorliegenden Arbeit für alle

Diskussion

untersuchten Proteine zeigte und auch in zahlreichen anderen Studien beobachtete hohe Ähnlichkeit der Zellen auf der endometrialen Ebene (Konrad et al., 2020), spricht dafür, dass in diesem Moment der Zellablösung noch keine relevanten Unterschiede bestehen und suggeriert, dass die bei Krebszellen beobachteten und zur Metastasierung notwendigen Zellveränderungen bei der Endometriose entbehrlich sind.

Die in den endometriotischen Läsionen beschriebenen Veränderungen scheinen sich damit am ehesten erst nach der Implantation auszubilden und lassen sich damit auch als Folge einer Interaktion mit der Umgebung verstehen.

Wenn nun in der Zusammenschau allenfalls marginale Unterschiede zwischen den Zellen zu beobachten sind und die retrograde Menstruation ein häufiges Phänomen ist, muss für die Entwicklung endometriotischer Läsionen noch ein anderer Faktor zum Tragen kommen. Diesen könnte das Peritoneum und dessen Suszeptibilität für die Anheftung und lokale Invasion endometrialer Zellen darstellen.

Eine Übersichtsarbeit von Young *et. al* (2013) hat hierzu Studien über mögliche peritoneale Faktoren ausgewertet. Dazu zählen beispielsweise die Expression von Adhäsionsmolekülen oder das durch gestörte Zellkontakte bedingte Freiliegen von extrazellulärer Matrix zur Vereinfachung der Zelladhäsion. Die Zellinvasion könnte ebenfalls durch gestörte Zell-Zell Kontakte oder MMP bedingten Gewebsumbau gefördert werden. Auch auf immunologischer Ebene könnten proinflammatorische Zytokine oder gestörte natürliche Killerzellen zur Entstehung von Endometriose beitragen. Zukünftige Arbeiten sollten sich daher - neben den endometrialen Zellen - auch auf das Peritoneum, welches den Boden für die Läsionen darstellt, sowie deren Interaktion fokussieren. So kann erforscht werden, welche Faktoren für eine Endometriose suszeptibel machen und möglicherweise präventive oder therapeutische Ansätze entwickelt werden.

Nach wie vor umstritten ist darüber hinaus die Frage, ob es sich bei der Endometriose um eine einheitliche Erkrankung handelt, oder ob die ovariellen, peritonealen und tief infiltrierenden Herde verschiedene Entitäten mit jeweils eigener Pathogenese darstellen (Nisolle & Donnez, 1997). Auch in den hier vorliegenden Daten zeigten sich teilweise erhebliche Unterschiede zwischen den drei Entitäten. Dabei wies die ovarielle Endometriose die größten Unterschiede zum eutopen Endometrium wie auch den peritonealen und tief infiltrierenden Läsionen auf. Bereits auf histologischer Ebene erschienen die Epithelzellen flacher und lagen erheblich seltener in Drüsenform vor. Dies stimmt mit dem an anderer Stelle beschriebenen und in ovarieller Endometriose vermehrt beobachteten, undifferenziert glandulären Muster überein (Kamergorodsky et al., 2009). Auch zeigte sich hier die stärkste Mislokalisierung von Claudin-11, was auf einen Verlust der Zellpolarität hinweisen könnte, auch wenn Untersuchungen zu

Diskussion

Keratinen und anderen Claudinen hierzu keine Hinweise lieferten. Schließlich wiesen die ovariellen Herde eine deutlich verminderte Expression von Vimentin auf. Inwieweit diese Auffälligkeiten Ausdruck des klinischen Aspekts einer Zyste sind, lässt sich jedoch nicht abschließend sagen.

Zuletzt ist darauf hinzuweisen, dass der Fokus dieser Arbeit hauptsächlich auf der Epithelzelle lag. Eine weitere Untersuchung insbesondere der Wechselwirkung der genannten Proteine mit dem endometrialen und endometriotischen Stroma erscheint für weitere Studien lohnenswert.

Vermutlich sind es weniger die einzelnen Epithelzellen, die auf Wanderschaft gehen und sich in der Bauchhöhle niederlassen, sondern eher die durch die Menstruation begünstigte Ablösung von Zellhaufen, bestehend aus Epithel und Stroma, die als Zellverband transloziert werden und sich ektop anheften und invadieren. So konnte bei Plattenepithelkarzinomen beobachtet werden, dass die Expression des EMT-Markers Snail zu einem Anstieg von Claudin-11 führt, welches durch eine Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten die Bildung solcher Tumorzell-Cluster fördert und mit der Tumorprogression korreliert (Li et al., 2019). Diese Verbindung des Konzepts der Epithelial-Mesenchymaler Transition mit den Proteinen der Zell-Zell-Verbindungen macht auch deutlich, dass zelluläre Vorgänge stets orchestriert ablaufen und sich gegenseitig beeinflussen.

5 Zusammenfassung

Obwohl Endometriose für bis zu 10 % aller Frauen im reproduktiven Alter eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität und Bedrohung ihrer Fertilität darstellt, ist die Pathogenese dieser chronischen Erkrankung nach wie vor ungeklärt. In dieser Studie wurden durch die Analyse der Expression dreier struktureller Proteine die endometrialen und endometriotischen Zellen weiter charakterisiert. Da die Endometriose bezüglich Ausbreitung und Invasivität malignen Erkrankungen ähnelt, wurde eine Beteiligung von hierfür beschriebenen Mechanismen untersucht. Zum einen sollte mit dem mesenchymalen Marker Vimentin gezeigt werden, ob es entlang der Pathogenese der Endometriose zu einem Wechsel des Zellphänotypus im Sinne einer Epithelial-Mesenchymalen Transition kommt, zum anderen wurden mit Claudin-11 und Claudin-7 zwei für die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten wichtige Strukturproteine untersucht.

Hierzu wurden Gewebeproben aus Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose sowie endometriotischen Läsionen des Ovars, des Peritoneums und tief infiltrierender Endometriose immunhistochemisch gefärbt und mithilfe des HSCOREs ausgewertet.

In der quantitativen Analyse zeigten sich für alle drei untersuchten Proteine hohe Ähnlichkeiten sowohl zwischen endometrialen Proben von Frauen ohne und mit Endometriose, als auch im Vergleich von eutopem Endometrium mit den ektopen endometriotischen Läsionen. Klare Abweichungen fanden sich lediglich in einer deutlich verminderten Vimentin Expression bei ovariellen Endometriosen und einem vermehrten Vorkommen im Stroma aller endometriotischen Entitäten. Daraus folgern wir, dass Unterschiede höchstwahrscheinlich erst nach der Implantation entstehen. Bemerkenswerterweise konnte für Claudin-11 eine subzelluläre Mislokalisierung von apikal im Endometrium nach basal in den endometriotischen Herden nachgewiesen werden. Claudin-7 zeigte sich darüber hinaus im Serum erkrankter Frauen deutlich erhöht und stellt damit einen möglichen Ansatz für ein nicht-invasives, diagnostisches Testverfahren dar.

Zusammengefasst unterstreichen die, in dieser Arbeit erhobenen Daten, die große Ähnlichkeit zwischen dem endometrialen Ursprungsgewebe und den versprengten pathologischen Läsionen. Es kommt demnach zu keinen pathogenetisch richtungsweisenden Veränderungen des Zellphänotypus. Auf der funktionellen Ebene lassen sich aber durchaus Unterschiede beobachten, deren Bedeutung für die Krankheitsentstehung und -progression noch Raum für weitere Untersuchungen bietet. Weiterhin bleibt die Entwicklung eines zuverlässigen, nicht-invasiven diagnostischen Tests eine dringende Notwendigkeit für die Verbesserung des klinischen Managements der an Endometriose erkrankten und leidenden Frauen.

6 Summary

Even though endometriosis affects up to 10% of women during their reproductive age and impairs their quality of life as well as their fertility, the causes for this chronic disease remain unknown. In this study we aimed to further characterize endometrial and endometriotic cells by analyzing the expression patterns of three structural proteins. As endometriosis appears similar to malignant diseases in terms of metastatic and invasive properties, we focused on mechanisms that are also seen in various forms of cancer.

The mesenchymal marker Vimentin was evaluated to determine, whether or not epithelial cells undergo a phenotype switch, also called epithelial to mesenchymal transition, during the pathogenesis of endometriosis. Furthermore two structural proteins, Claudin-11 and Claudin-7, were chosen to examine the function and formation of tight junctions between cells.

In order to achieve this aim, tissue samples from endometria of women with and without endometriosis as well as endometriotic lesions of the ovary, peritoneum and deep infiltrating endometriosis were analyzed by immunohistochemistry and evaluated by HSCORE.

Quantitative analysis showed high similarities between endometria of women with and without the disease, as well as in comparison with the ectopic endometriotic lesions. Aberrations in protein expression were only seen in a decreased Vimentin expression in ovarian endometriosis while being increased in the stroma of all endometriotic entities. Thus, we suggest, that aberrations in protein expression most likely occur after the invasion of the endometriotic implant.

Of note, a significantly deregulated subcellular localization from apical in eutopic endometria to basal in endometriotic lesions could be shown for Claudin-11. Furthermore, an increased abundance of Claudin-7 was detected in blood serum of women with endometriosis, suggesting a possible use as a non-invasive diagnostic test. Taken together, the data from this study further underlines the high similarity between the proposed endometrial origin and the pathologically dispersed lesions. Hence there seem to be no significant changes of the cellular phenotype along the pathogenesis of the disease. However, on the functional level some differences can be observed, whose significance for the formation and progression of endometriosis warrants further research.

Finally, to improve the clinical management of women suffering from endometriosis, the development of a reliable, non-invasive diagnostic test remains an urgent issue.

7 Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ART	Assisted Reproductive Technologies
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V
BSA	Bovines Serum Albumin
CD10	Cluster of Differentiation 10; auch Neprilysin
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
EEL	Europäische Endometriose Liga
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay
EM	Endometriose
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Endocrinology
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSCORE	Histological SCORE
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
L(S)AB	Labeled-(Strept-)Avidin-Biotin
Lig.	Ligamentum
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
min	Minute
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomograph
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant

Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

nm	Nanometer
NSAR	Nicht-steroidales-Anti-Rheumatikum
OP	Operation
Ov.	Ovariell
PBS	Phosphate buffered saline
Perit.	Peritoneal
rASRM	revised classification of endometriosis der American Society for Reproductive Medicine
RT	Raumtemperatur
SEL	Stiftung EM Forschung
SEM	Standard error of the mean; Standardfehler
Slug	Zinc-finger protein SNAI2
Snail	Zinc-finger protein SNAI1
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIAR	Tissue injury and repair
TIE	Tief infiltrierende Endometriose
Vol %	Volumenprozent
ZEB 1	zinc finger E-box-binding homeobox 1

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit der Lokalisationen der Endometriose (Audebert et al., 2018).....	3
Tabelle 2: Kohorte zur Untersuchung von Vimentin	20
Tabelle 3: Kohorte zur Untersuchung von Claudin-11 & 7	21
Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Serumproben.....	22
Tabelle 5: Puffer und Chemikalien	22
Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper.....	23
Tabelle 7: Laborgeräte, Computerprogramme und sonstigen Materialien	24
Tabelle 8: Protokoll des Paraffin-Einbettungsautomaten	26
Tabelle 9: Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten....	28
Tabelle 10: Protokoll zur Dehydrierung und Eindeckung der Gewebeschnitte.....	30
Tabelle 11: Scoringsystem für die Proteinlokalisierung von Claudin-11.....	31
Tabelle 12: Vimentin HSCOREs in Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose	39
Tabelle 13: Vimentin HSCOREs in Endometrien und endometriotischen Läsionen....	41
Tabelle 14: Claudin-11 Lokalisationsscores in Endometrien und endometriotischen Läsionen	44
Tabelle 15: Claudin-11 HSCOREs in Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose.....	47
Tabelle 16: Claudin-11 HSCOREs in Endometrien und endometriotischen Läsionen .	49
Tabelle 17: Claudin-7 HSCOREs in Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose.....	53
Tabelle 18: Claudin-7 HSCOREs in Endometrien und endometriotischen Läsionen ...	54
Tabelle 19: Claudin-7 Gehalt im Serum	55
Tabelle 20: Diagnostische Wertigkeit der Bestimmung von Claudin-7 im Serum.....	56
Tabelle 21: Interpretation der Likelihood-Ratio (LR+) nach Jaeschke (1994)	56

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Immunhistochemie mit einem Polymer (Dextran) als Verstärker	27
Abbildung 2: Negativkontrolle.....	29
Abbildung 3: Prinzip des Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA).....	32
Abbildung 4: Proteinlokalisationen von Vimentin.. ..	36
Abbildung 5: Übersicht über die Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen von Vimentin.....	37
Abbildung 6: Vimentin in eutopem Endometrium.....	38
Abbildung 7: Vimentin in den endometriotischen Läsionen	40
Abbildung 8: Proteinlokalisation von Claudin-11.....	42
Abbildung 9: Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen von Claudin-11	43
Abbildung 10: Claudin-11 in eutopem Endometrium	46
Abbildung 11: Claudin-11 in endometriotischen Läsionen	48
Abbildung 12: Proteinlokalisation von Claudin-7.....	50
Abbildung 13: Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen von Claudin-7.....	51
Abbildung 14: Claudin-7 in eutopem Endometrium	52
Abbildung 15: Claudin-7 in den endometriotischen Läsionen	53
Abbildung 16: Claudin-7 Gehalt im Serum (ng/ml)	55
Abbildung 17: Übersicht über die Verteilung der verschiedenen Proteinlokalisationen von Vimentin, Claudin-11 und Claudin-7 in eutopem Endometrium und endometriotischen Läsionen.	57
Abbildung 18: HSCORE-Mittelwerte \pm Standardfehler von Vimentin, Claudin-11 und Claudin-7 in endometrialen und endometriotischen Epithelzellen.....	58

8 Literaturverzeichnis

- Agarwal, R., D'Souza, T., & Morin, P. J. (2005). Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Research*, 65(16), 7378–7385.
- Alifano, M., Trisolini, R., Cancellieri, A., & Regnard, J. F. (2006). Thoracic endometriosis: current knowledge. *The Annals of Thoracic Surgery*, 81(2), 761–769.
- Anglesio, M. S., Papadopoulos, N., Ayhan, A., Nazeran, T. M., Noë, M., Horlings, H. M., Lum, A., Jones, S., Senz, J., Seckin, T., Ho, J., Wu, R. C., Lac, V., Ogawa, H., Tessier-Cloutier, B., Alhassan, R., Wang, A., Wang, Y., Cohen, J. D., Wong, F., Hasanovic, A., Orr, N., Zhang, M., Popoli, M., McMahon, W., Wood, L. D., Mattox, A., Allaire, C., Segars, J., Williams, C., Tomasetti, C., Boyd, N., Kinzler, K. W., Gilks, C. B., Diaz, L., Wang, T. L., Vogelstein, B., Yong, P. J., Huntsman, D. G., & Shih, I. M. (2017). Cancer-associated mutations in endometriosis without cancer. *New England Journal of Medicine*, 376(19), 1835–1848.
- Audebert, A., Petousis, S., Margiouda-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.
- 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: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 115(11), 1382–1391.
- Bartley, J., Jülicher, A., Hotz, B., Mechsner, S., & Hotz, H. (2014). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be regulated differently in endometriosis and the endometrium. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289(4), 871–881.
- Benagiano, G., & Brosens, I. (2011). Who identified endometriosis? *Fertility and Sterility*, 95(1), 13–16.
- Benagiano, G., Brosens, I., & Lippi, D. (2014). The history of endometriosis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 78(1), 1–9.

Literaturverzeichnis

- Bhat, A. A., Pope, J. L., Smith, J. J., Ahmad, R., Chen, X., Washington, M. K., Beauchamp, R. D., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2015). Claudin-7 expression induces mesenchymal to epithelial transformation (MET) to inhibit colon tumorigenesis. *Oncogene*, *34*(35), 4570–4580.
- Brosens, I., Brosens, J., & Benagiano, G. (2013). Neonatal uterine bleeding as antecedent of pelvic endometriosis. *Human Reproduction*, *28*(11), 2893–2897.
- Bulletti, C., de Ziegler, D., Polli, V., Diotallevi, L., Del Ferro, E., & Flamigni, C. (2000). Uterine contractility during the menstrual cycle. *Human Reproduction*, *15 Suppl 1*, 81–89.
- Bulletti, C., de Ziegler, D., Stefanetti, M., Cicinelli, E., Pelosi, E., & Flamigni, C. (2001). Endometriosis: absence of recurrence in patients after endometrial ablation. *Human Reproduction*, *16*(12), 2676–2679.
- Bulun, S. E. (2009). Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, *360*(3), 268–279.
- Castro Dias, M., Coisne, C., Lazarevic, I., Baden, P., Hata, M., Iwamoto, N., Francisco, D. M. F., Vanlandewijck, M., He, L., Baier, F. A., Stroka, D., Bruggmann, R., Lyck, R., Enzmann, G., Deutsch, U., Betsholtz, C., Furuse, M., Tsukita, S., & Engelhardt, B. (2019). Claudin-3-deficient C57BL/6J mice display intact brain barriers. *Scientific Reports*, *9*(1), 203.
- Chai, J. Y., Modak, C., Mouazzen, W., Narvaez, R., & Pham, J. (2010). Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line? *Bioscience Trends*, *4*(3), 130–142.
- Chapron, C., Fauconnier, A., Dubuisson, J. B., Barakat, H., Vieira, M., & Bréart, G. (2003). Deep infiltrating endometriosis: Relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Human Reproduction*, *18*(4), 760–766.
- Chen, Y., Zhu, H.-L., Tang, Z.-W., Neoh, K. H., Ouyang, D.-F., Cui, H., Cheng, H.-Y., Ma, R.-Q., Ye, X., Han, R. P., & Chang, X.-H. (2017). Evaluation of circulating endometrial cells as a biomarker for endometriosis. *Chinese Medical Journal*, *130*(19), 2339–2345.

Literaturverzeichnis

- Cheng, F., Shen, Y., Mohanasundaram, P., Lindström, M., Ivaska, J., Ny, T., & Erikss, J. E. (2016). Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(30), 4320–4327.
- Chu, P. G., & Weiss, L. M. (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, *40*(5), 403–439.
- Chui, M. H. (2013). Insights into cancer metastasis from a clinicopathologic perspective: Epithelial-Mesenchymal Transition is not a necessary step. *International Journal of Cancer*, *132*(7), 1487–1495.
- 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), 241–260.
- Cramer, D. W., & Missmer, S. A. (2002). The epidemiology of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *955*, 11–22.
- Dahiya, N., Becker, K. G., Wood, W. H., Zhang, Y., & Morin, P. J. (2011). Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion. *PLoS ONE*, *6*(7), e22119.
- Danielsson, F., Peterson, M., Caldeira Araújo, H., Lautenschläger, F., & Gad, A. (2018). Vimentin diversity in health and disease. *Cells*, *7*(10), 147.
- 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), 481–494.
- Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). (2013). *Leitlinie (S2k) für die Diagnostik und Therapie der Endometriose; der Deutschen, Österreichischen, Schweizerischen und Tschechischen Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe unter Mitarbeit der Stiftung Endometrioseforschung (SEF) und der Europäischen Endometriose Liga (EEL)*. AWMF Nr.: 015/045.

- Diedrich, K., Holzgreve, W., Jonat, W., Schneider, K.-T., & Weiss, J. (Hrsg.) (2000). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 532–542, Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., Cao, J., & Chen, Y. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology*, *142*(2), 305–315.
- Dorien, F. O., Roskams, T., Van den Eynde, K., Vanhie, A., Peterse, D. P., Meuleman, C., Tomassetti, C., Peeraer, K., D’Hooghe, T. M., & Fassbender, A. (2017). The presence of endometrial cells in peritoneal fluid of women with and without endometriosis. *Reproductive Sciences*, *24*(2), 242–251.
- Duignan, N. M., Jordan, J. A., Coughlan, B. M., & Logan-Edwards, R. (1972). One thousand consecutive cases of diagnostic laparoscopy. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth*, *79*(11), 1016–1024.
- Dunselman, G. A. J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D’Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A. W., Kiesel, L., Nap, A., Prentice, A., Saridogan, E., Soriano, D., Nelen, W., & European Society of Human Reproduction and Embryology. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction*, *29*(3), 400–412.
- Ebert, A. (2003). *Endometriose: Ein Wegweiser für die Praxis*. 9–10, Berlin: Walter de Gruyter.
- Eisenberg, V. H., Weil, C., Chodick, G., & Shalev, V. (2018). Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *BJOG*, *125*(1), 55–62.
- English, D. P., & Santin, A. D. (2013). Claudins overexpression in ovarian cancer: Potential targets for clostridium perfringens enterotoxin (CPE) based diagnosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 10412–10437.
- Fink, C., Weigel, R., Fink, L., Wilhelm, J., Kliesch, S., Zeiler, M., Bergmann, M., & Brehm, R. (2009). Claudin-11 is over-expressed and dislocated from the blood-testis barrier in Sertoli cells associated with testicular intraepithelial neoplasia in men. *Histochemistry and Cell Biology*, *131*(6), 755–764.

- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T. C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V., & Gao, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, *527*(7579), 472–476.
- Flores, V. A., Vanhie, A., Dang, T., & Taylor, H. S. (2018). Progesterone receptor status predicts response to progestin therapy in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *103*(12), 4561–4568.
- Fuchs, E., & Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual Review of Biochemistry*, *63*(1), 345–382.
- 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 Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *96*(9), 1128–1135.
- 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), 442–449.
- Gaide Chevronnay, H. P., Selvais, C., Emonard, H., Galant, C., Marbaix, E., & Henriët, P. (2012). Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1824*(1), 146–156.
- Garcia-Murillas, I., Schiavon, G., Weigelt, B., Ng, C., Hrebien, S., Cutts, R. J., Cheang, M., Osin, P., Nerurkar, A., Kozarewa, I., Garrido, J. A., Dowsett, M., Reis-Filho, J. S., Smith, I. E., & Turner, N. C. (2015). Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Science Translational Medicine*, *7*(302), 302ra133.
- García-Solares, J., Donnez, J., Donnez, O., & Dolmans, M. M. (2018). Pathogenesis of uterine adenomyosis: invagination or metaplasia? *Fertility and Sterility*, *109*(3), 371–379.
- Gargett, C. E., Schwab, K. E., Brosens, J. J., Puttemans, P., Benagiano, G., & Brosens, I. (2014). Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, *20*(7), 591–598.

Literaturverzeichnis

- Giudice, L. C., & Kao, L. C. (2004). Endometriosis. *Lancet*, 364(9447), 1789–1799.
- Gordts, S., Koninckx, P., & Brosens, I. (2017). Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertility and Sterility*, 108(6), 872–885.
- Grande, M. T., Sánchez-Laorden, B., López-Blau, C., De Frutos, C. A., Boutet, A., Arévalo, M., Rowe, R. G., Weiss, S. J., López-Novoa, J. M., & Nieto, M. A. (2015). Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature Medicine*, 21(9), 989–997.
- Grigore, A., Jolly, M., Jia, D., Farach-Carson, M., & Levine, H. (2016). Tumor budding: The name is EMT. Partial EMT. *Journal of Clinical Medicine*, 5(5), 51.
- Groisman, G. M., & Meir, A. (2003). CD10 is helpful in detecting occult or inconspicuous endometrial stromal cells in cases of presumptive endometriosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 127(8), 1003–1006.
- Gronbach, J. (2015). *Charakterisierung der epithelialen Drüsen im Endometrium und endometriotischen Foci*. Gießen, Dissertation.
- Grund, S., & Grümmer, R. (2018). Direct cell–cell interactions in the endometrium and in endometrial pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), e2227.
- Guarino, M., Tosoni, A., & Nebuloni, M. (2009). Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology*, 40(10), 1365–1376.
- Gupta, D., Hull, M. L., Fraser, I., Miller, L., Bossuyt, P. M. M., Johnson, N., & Nisenblat, V. (2016). Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4(4), CD012165.
- Haas, D., Shebl, O., Shamiyeh, A., & Oppelt, P. (2013). The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: Their strengths and weaknesses. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 92(1), 3–7.
- Halis, G., Mechsner, S., & Ebert, A. D. (2010). The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. *Deutsches Ärzteblatt International*, 107(25), 446–455.

Literaturverzeichnis

- 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), 151–154.
- Harris, H. R., Costenbader, K. H., Mu, F., Kvaskoff, M., Malspeis, S., Karlson, E. W., & Missmer, S. A. (2016). Endometriosis and the risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Nurses' Health Study II. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *75*(7), 1279–1284.
- Heinrich, P. C., Müller, M., & Graeve, L. (Hrsg.) (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Aufl., 159–160, 179, Berlin Heidelberg: Springer.
- Hewitt, K. J., Agarwal, R., & Morin, P. J. (2006). The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*, *6*, 186.
- Hoerscher, 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), 1003–1011.
- 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), 1181–1192.
- Hudelist, G., Keckstein, J., & Wright, J. T. (2009). The migrating adenomyoma: past views on the etiology of adenomyosis and endometriosis. *Fertility and Sterility*, *92*(5), 1536–1543.
- 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), 3412–3416.
- Hung, M. C., & Link, W. (2011). Protein localization in disease and therapy. *Journal of Cell Science*, *124*(20), 3381–3392.
- Hunter, K. W., Crawford, N. P. S., & Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research*, *10 Suppl 1*(Suppl 1), S2.

Literaturverzeichnis

- Husby, G. K., Haugen, R. S., & Moen, M. H. (2003). Diagnostic delay in women with pain and endometriosis. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 82(7), 649–653.
- Jaeschke, R. (1994). Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*, 271(9), 703–707.
- Jenkins, S., Olive, D. L., & Haney, A. F. (1986). Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstetrics and Gynecology*, 67(3), 335–338.
- Jiang, L., Yan, Y., Liu, Z., & Wang, Y. (2016). Inflammation and endometriosis. *Frontiers in Bioscience*, 21, 941–948.
- Johnson, N. P., Hummelshoj, L., Adamson, G. D., Keckstein, J., Taylor, H. S., Abrao, M. S., Bush, D., Kiesel, L., Tamimi, R., Sharpe-Timms, K. L., Rombauts, L., Giudice, L. C., & World Endometriosis Society Sao Paulo Consortium. (2017). World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis. *Human Reproduction*, 32(2), 315–324.
- Kamergorodsky, G., Ribeiro, P. A. A., Galvão, M. A. L., Abrão, M. S., Donadio, N., de Barros Moreira Lemos, N. L., & Aoki, T. (2009). Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertility and Sterility*, 92(6), 2074–2077.
- Karabulut, M., Alis, H., Bas, K., Karabulut, S., Afsar, C. U., Oguz, H., Gunaldi, M., Akarsu, C., Kones, O., & Aykan, N. F. (2015). Clinical significance of serum claudin-1 and claudin-7 levels in patients with colorectal cancer. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(6), 1255–1267.
- Kavoussi, S. K., Lim, C. S., Skinner, B. D., Lebovic, D. I., & As-Sanie, S. (2016). New paradigms in the diagnosis and management of endometriosis. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 28(4), 267–276.
- Kidd, M. E., Shumaker, D. K., & Ridge, K. M. (2014). The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(1), 1–6.

Literaturverzeichnis

- Kirchner, T., Müller-Hermelink, H. K., & Roessner, A. (Hrsg.) (2014). *Grundmann Kurzlehrbuch Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. 12. Aufl., 7–8, München: Elsevier.
- Knapp, V. J. (1999). How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertility and Sterility*, 72(1), 10–14.
- Koninckx, P., Barlow, D., & Kennedy, S. (1999). Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 47 Suppl 1(Suppl. 1), 3–10.
- Koninckx, P., Ussia, A., Adamyan, L., Wattiez, A., Gomel, V., & Martin, D. C. (2019). Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. *Fertility and Sterility*, 111(2), 327–340.
- 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., Horne, F., & Meinhold-Heerlein, I. (2019b). Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis? *Reproduction*, 158(2), R41–R47.
- 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), E1915.
- Kriz, W., Kaissling, B., & Le Hir, M. (2011). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: Fact or fantasy? *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 468–474.
- Kruitwagen, R F, Poels, L. G., Willemsen, W. N., de Ronde, I. J., Jap, P. H., & Rolland, R. (1991a). Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertility and Sterility*, 55(2), 297–303.

Literaturverzeichnis

- Kruitwagen, R F., Poels, L. G., Willemsen, W. N., Jap, P. H., de Ronde, I. J., Hanselaar, T. G., & Rolland, R. (1991b). Immunocytochemical markerprofile of endometriotic epithelial, endometrial epithelial, and mesothelial cells: a comparative study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 41(3), 215–223.
- Kvaskoff, M., Mu, F., Terry, K. L., Harris, H. R., Poole, E. M., Farland, L., & Missmer, S. A. (2014). Endometriosis: A high-risk population for major chronic diseases? *Human Reproduction Update*, 21(4), 500–516.
- Laganà, A. S., La Rosa, V. L., Rapisarda, A. M. C., Valenti, G., Sapia, F., Chiofalo, B., Rossetti, D., Ban Frangež, H., Vrtačnik Bokal, E., & Vitale, S. G. (2017). Anxiety and depression in patients with endometriosis: impact and management challenges. *International Journal of Women's Health*, 9, 323–330.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691.
- Levy, A. R., Osenenko, K. M., Lozano-Ortega, G., Sambrook, R., Jeddi, M., Bélisle, S., & Reid, R. L. (2011). Economic burden of surgically confirmed endometriosis in Canada. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 33(8), 830–837.
- Leyendecker, G., & Wildt, L. (2011). A new concept of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair (TIAR). *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 5(2), 125–142.
- Li, C. F., Chen, J. Y., Ho, Y. H., Hsu, W. H., Wu, L. C., Lan, H. Y., Hsu, D. S. S., Tai, S. K., Chang, Y. C., & Yang, M. H. (2019). Snail-induced claudin-11 prompts collective migration for tumour progression. *Nature Cell Biology*, 21(2), 251–262.
- 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.
- Lin, Z., Zhang, X., Liu, Z., Liu, Q., Wang, L., Lu, Y., Liu, Y., Wang, M., Yang, M., Jin, X., & Quan, C. (2013). The distinct expression patterns of claudin-2, -6, and -11 between human gastric neoplasms and adjacent non-neoplastic tissues. *Diagnostic Pathology*, 8(1), 1–7.

Literaturverzeichnis

- Lioni, M., Brafford, P., Andl, C., Rustgi, A., El-Deiry, W., Herlyn, M., & Smalley, K. S. M. (2007). Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *American Journal of Pathology*, *170*(2), 709–721.
- Liu, D. T. Y., & Hitchcock, A. (1986). Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *93*(8), 859–862.
- Lovisa, S., LeBleu, V. S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vadrnagara, K., Carstens, J. L., Wu, C. C., Hagos, Y., Burckhardt, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Nischal, H., Allison, J. P., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature Medicine*, *21*(9), 998–1009.
- Lu, Z., Kim, D. H., Fan, J., Lu, Q., Verbanac, K., Ding, L., Renegar, R., & Chen, Y.-H. (2015). A non-tight junction function of claudin-7-Interaction with integrin signaling in suppressing lung cancer cell proliferation and detachment. *Molecular Cancer*, *14*, 120.
- Machairiotis, N., Stylianaki, A., Dryllis, G., Zarogoulidis, P., Kouroutou, P., Tsiamis, N., Katsikogiannis, N., Sarika, E., Courcoutsakis, N., Tsiouda, T., Gschwendtner, A., Zarogoulidis, K., Sakkas, L., Baliaka, A., & Machairiotis, C. (2013). Extrapelvic endometriosis: A rare entity or an under diagnosed condition? *Diagnostic Pathology*, *8*(1), 194.
- Madersbacher, S., & Berger, P. (1991). Double wavelength measurement of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) provides a three-fold enhancement of the ELISA measuring range. *Journal of Immunological Methods*, *138*(1), 121–124.
- Martin, T. A. (2014). The role of tight junctions in cancer metastasis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *36*, 224–231.
- 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), 712–721.
- Mazzucchelli, L. (2002). Protein S100A4: Too long overlooked by pathologists? *American Journal of Pathology*, *160*(1), 7–13.

Literaturverzeichnis

- 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), 315–329.
- Miller, J. A., Missmer, S. A., Vitonis, A. F., Sarda, V., Laufer, M. R., & DiVasta, A. D. (2018). Prevalence of migraines in adolescents with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 109(4), 685–690.
- Mirkin, D., Murphy-Barron, C., & Iwasaki, K. (2007). Actuarial analysis of private payer administrative claims data for women with endometriosis. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(3), 262–272.
- Moen, M. H., & Stokstad, T. (2002). A long-term follow-up study of women with asymptomatic endometriosis diagnosed incidentally at sterilization. *Fertility and Sterility*, 78(4), 773–776.
- 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–e37.
- Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins: Biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 705–733.
- Morrow, C. M. K., Mruk, D., Cheng, C. Y., & Hess, R. A. (2010). Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1679–1696.
- Nagase, H., & Woessner, J. F. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21491–21494.
- Nap, A. W., Groothuis, P. G., Demir, A. Y., Evers, J. L. ., & Dunselman, G. A. . (2004). Pathogenesis of endometriosis. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(2), 233–244.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.

Literaturverzeichnis

- Nisenblat, V., Bossuyt, P. M. M., Shaikh, R., Farquhar, C., Jordan, V., Scheffers, C. S., Mol, B. W. J., Johnson, N., & Hull, M. L. (2016). Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(5), CD012179.
- Nisolle, M., Casanas-Roux, F., & Donnez, J. (1995). Coexpression of cytokeratin and vimentin in eutopic endometrium and endometriosis throughout the menstrual cycle: Evaluation by a computerized method. *Fertility and Sterility*, 64(1), 69–75.
- Nisolle, M., & Donnez, J. (1997). Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and Sterility*, 68(4), 585–596.
- Nissinen, L., Siljamäki, E., Riihilä, P., Piipponen, M., Farshchian, M., Kivisaari, A., Kallajoki, M., Raiko, L., Peltonen, J., Peltonen, S., & Kähäri, V. M. (2017). Expression of claudin-11 by tumor cells in cutaneous squamous cell carcinoma is dependent on the activity of p38δ. *Experimental Dermatology*, 26(9), 771–777.
- Oppelt, P., Chavtal, R., Haas, D., Reichert, B., Wagner, S., Müller, A., Lermann, J. H., & Renner, S. P. (2012). Costs of in-patient treatment for endometriosis in Germany 2006: an analysis based on the G-DRG-Coding. *Gynecological Endocrinology*, 28(11), 903–905.
- Ornek, T., Fadiel, A., Tan, O., Naftolin, F., & Arici, A. (2008). Regulation and activation of ezrin protein in endometriosis. *Human Reproduction*, 23(9), 2104–2112.
- 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), 1692–1699.
- 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.
- Pospisilova, E., Kiss, I., Souckova, H., Tomes, P., Spicka, J., Matkowski, R., Jedryka, M., Ferrero, S., Bobek, V., & Kolostova, K. (2019). Circulating endometrial cells: a new source of information on endometriosis dynamics. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1938.

Literaturverzeichnis

- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. (1997). *Fertility and Sterility*, 67(5), 817–821.
- Rodríguez, D., Morrison, C. J., & Overall, C. M. (2010). Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 39–54.
- Rosenthal, R., Günzel, D., Theune, D., Czichos, C., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2017). Water channels and barriers formed by claudins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397(1), 100–109.
- Salamanca, A., & Beltrán, E. (1995). Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 64(1), 193–195.
- Sampson, J. A. (1925). Heterotopic or misplaced endometrial tissue. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 10(5), 649–664.
- 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), 93-110.43.
- Sanghvi-Shah, R., & Weber, G. F. (2017). Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 81.
- Sawada, N. (2013). Tight junction-related human diseases. *Pathology International*, 63(1), 1–12.
- Schindler, A. E. (2007). Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose. *J Fertil Reprod*, 17(4), 22–27.
- Schulzke, J. D., Günzel, D., John, L. J., & Fromm, M. (2012). Perspectives on tight junction research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257(1), 1–19.
- 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 and Cell Biology*, 144(6), 571–585.

Literaturverzeichnis

- Scioscia, M., Bruni, F., Ceccaroni, M., Steinkasserer, M., Stepniewska, A., & Minelli, L. (2011). Distribution of endometriotic lesions in endometriosis stage IV supports the menstrual reflux theory and requires specific preoperative assessment and therapy. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *90*(2), 136–139.
- Simoens, S., Dunselman, G., Dirksen, C., Hummelshoj, L., Bokor, A., Brandes, I., Brodsky, V., Canis, M., Colombo, G. L., DeLeire, T., Falcone, T., Graham, B., Halis, G., Horne, A., Kanj, O., Kjer, J. J., Kristensen, J., Lebovic, D., Mueller, M., Vigano, P., Wullschleger, M., & D'Hooghe, T. (2012). The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Human Reproduction*, *27*(5), 1292–1299.
- Singh, A. B., Uppada, S. B., & Dhawan, P. (2017). Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *469*(1), 69–75.
- Sohler, F., Sommer, A., Wachter, D. L., Agaimy, A., Fischer, O. M., Renner, S. P., Burghaus, S., Fasching, P. A., Beckmann, M. W., Fuhrmann, U., Strick, R., & Strissel, P. L. (2013). Tissue remodeling and nonendometrium-like menstrual cycling are hallmarks of peritoneal endometriosis lesions. *Reproductive Sciences*, *20*(1), 85–102.
- Soliman, A. M., Yang, H., Du, E. X., Kelley, C., & Winkel, C. (2016). The direct and indirect costs associated with endometriosis: A systematic literature review. *Human Reproduction*, *31*(4), 712–722.
- Song, I. O., Hong, S. R., Huh, Y., Yoo, K. J., Koong, M. K., Jun, J. Y., & Kang, I. S. (1998). Expression of vimentin and cytokeratin in eutopic and ectopic endometrium of women with adenomyosis and ovarian endometrioma. *American Journal of Reproductive Immunology*, *40*(1), 26–31.
- Stammler, A., Lüftner, B. U., Kliesch, S., Weidner, W., Bergmann, M., Middendorff, R., & Konrad, L. (2016). Highly conserved testicular localization of claudin-11 in normal and impaired spermatogenesis. *PLoS ONE*, *11*(8), e0160349.
- Suda, K., Nakaoka, H., Yoshihara, K., Ishiguro, T., Adachi, S., Kase, H., Motoyama, T., Inoue, I., & Enomoto, T. (2019). Different mutation profiles between epithelium and stroma in endometriosis and normal endometrium. *Human Reproduction*, *34*(10), 1899–1905.

Literaturverzeichnis

- Tarin, D. (2013). Role of the host stroma in cancer and its therapeutic significance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3–4), 553–566.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–890.
- Thompson, E. W., & Newgreen, D. F. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: A role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Research*, 65(14), 5991–5995.
- Tosti, C., Pinzauti, S., Santulli, P., Chapron, C., & Petraglia, F. (2015). Pathogenetic mechanisms of deep infiltrating endometriosis. *Reproductive Sciences*, 22(9), 1053–1059.
- Tuttliès, F., Keckstein, J., Ulrich, U., Possover, M., Schweppe, K., Wustlich, M., Buchweitz, O., Greb, R., Kandolf, O., Mangold, R., Masetti, W., Neis, K., Rauter, G., Reeka, N., Richter, O., Schindler, A., Sillem, M., Terruhn, V., & Tinneberg, H. (2005). ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose. *Zentralblatt Für Gynäkologie*, 127(05), 275–281.
- Vallvé-Juanico, J., López-Gil, C., Ballesteros, A., & Santamaria, X. (2019). Endometrial stromal cells circulate in the bloodstream of women with endometriosis: A pilot study. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3740.
- van der Linden, P. J., Dunselman, G. A., de Goeij, A. F., van der Linden, E. P., Evers, J. L., & Ramaekers, F. C. (1995). Epithelial cells in peritoneal fluid—of endometrial origin? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(2), 566–570.
- Walesch, S. K., Richter, A. M., Helmbold, P. H., & Dammann, R. H. (2015). Claudin11 promoter hypermethylation is frequent in malignant melanoma of the skin, but uncommon in nevus cell nevi. *Cancers*, 7(3), 1233–1243.
- Warren, L. A., Shih, A., Renteira, S. M., Seckin, T., Blau, B., Simpfendorfer, K., Lee, A., Metz, C. N., & Gregersen, P. K. (2018). Analysis of menstrual effluent: diagnostic potential for endometriosis. *Molecular Medicine*, 24(1), 1.

Literaturverzeichnis

- Xiong, Y., Liu, Y., Xiong, W., Zhang, L., Liu, H., Du, Y., & Li, N. (2016). Hypoxia-inducible factor 1 α -induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells may contribute to the development of endometriosis. *Human Reproduction*, *31*(6), 1327–1338.
- Xu, C., Wang, K., Ding, Y. H., Li, W. J., & Ding, L. (2019). Claudin-7 gene knockout causes destruction of intestinal structure and animal death in mice. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(5), 584–599.
- Yang, J., Liu, X., Yuan, X., & Wang, Z. (2015). MiR-99b promotes metastasis of hepatocellular carcinoma through inhibition of claudin 11 expression and may serve as a prognostic marker. *Oncology Reports*, *34*(3), 1415–1423.
- Young, V. J., Brown, J. K., Saunders, P. T. K., & Horne, A. W. (2013). The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction Update*, *19*(5), 558–569.
- Young, V. J., Brown, J. K., Saunders, P. T. K., Duncan, W. C., & Horne, A. W. (2014). The peritoneum is both a source and target of TGF- β in women with endometriosis. *PLoS ONE*, *9*(9), e106773.
- Yovich, J. L., Rowlands, P. K., Lingham, S., Sillender, M., & Srinivasan, S. (2020). Pathogenesis of endometriosis: Look no further than John Sampson. *Reproductive Biomedicine Online*, *40*(1), 7–11.
- Zhang, P., Sun, Y., & Ma, L. (2015). ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle*, *14*(4), 481–487.

9 Publikationsverzeichnis

Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften sowie auf Kongressen veröffentlicht und vorgestellt.

Fachzeitschriften:

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), 1181–1192.

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.

Kongressbeiträge:

Horné, F., Konrad, L., Gronbach, J., Dietze, R., Berkes, E., Oehmke, F., Tinneberg, H.-R. (2017). Phänotypische Charakterisierung von endometrialen und endometriotischen Epithelzellen. *Kurzvortrag auf dem 12. Endometriosekongress deutschsprachiger Länder*, Berlin

Horné, F., Konrad, L., Gronbach, J., Dietze, R., Berkes, E., Oehmke, F., Tinneberg, H.-R. (2018). Phänotypische Charakterisierung von endometrialen und endometriotischen Epithelzellen. *Postersitzung: Konservative Gynäkologie/Übergreifende Themen I des 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., P200*, Berlin

10 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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 und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Lutz Konrad für die Auswahl und Überlassung des Themas sowie die exzellente wissenschaftliche Betreuung. Ich bin sehr froh, meine ersten wissenschaftlichen Erfahrungen unter seiner motivierenden Führung gemacht zu haben. Dabei hat Herr Konrad mir nicht nur das Handwerkszeug der akademischen Forschung vermittelt, sondern mich auch ermutigt, eigene Ideen zu entwickeln und zu verfolgen. Durch sein außergewöhnliches Engagement und seine Unterstützung hat er in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit, sowie deren Präsentation auf Kongressen und in Fachzeitschriften beigetragen. Dass sich darüber hinaus eine auf Sympathie und Wertschätzung beruhende Zusammenarbeit entwickelte, empfinde ich als großes Glück.

Ich danke dem ehemaligen Direktor des Zentrums für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Hans-Rudolf Tinneberg und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. Ivo Meinhold-Heerlein für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit unter ihrer Leitung realisieren zu können sowie für die engagierte Unterstützung von klinischer Seite. Dank gebührt ebenfalls den Kollegen der Ärzteschaft und Pflege, durch deren Einsatz der Auf- und Ausbau einer Gewebebank erst ermöglicht wird, sowie dem Institut für Pathologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner für die diagnostischen Gutachten.

Die Arbeit im Labor bereitete mir Freude und wurde durch ein kollegiales Miteinander aufgelockert. Dafür danke ich Dr. Raimund Dietze, Dr. Pradeep Kudipudi und Lea Fruhmann-Berger. Besonderer Dank gilt Frau Cornelia Hof für ihre geduldige und exakte Einarbeitung und technische Unterstützung. Auch Frau Schneider möchte ich danken, ohne deren tatkräftigen Einsatz an der Schnittstelle zwischen Klinik und Labor diese Forschung nicht möglich wäre.

Der größte Dank gebührt schließlich meinen Eltern, Verena und Bernd Horné, deren liebevolle, uneingeschränkte Unterstützung und aufmunternden Worte für mich von unschätzbarem Wert waren.

Ebenso danke ich Dr. med. Anton Freilinger, Dr. rer. nat. Ulrike Berg und Prof. Dr. med. Dieter Berg, deren Vorbild mir allzeit eine große Motivation war.

Zuletzt gilt meine besondere und tiefste Dankbarkeit dir, Elena Berg, für den gemeinsamen Weg durch Studium, Wissenschaft und Leben und die gegenseitige Motivation und bedingungslose Unterstützung.