Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Vergleichende Expressionsanalyse von VEGF, Midkine, CXCR4, Heparanase und Survivin in Endometriose, Endometrium und Endometriumkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Julia Printz, geb. Korte
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. med. Daniel Rein
Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Daniela Bruch-Gerharz

Für meine Liebsten

Zusammenfassung

Endometriose ist gekennzeichnet durch das ektope Auftreten endometrialen Gewebes außerhalb des Uterus. Die Patientinnen leiden unter Unterbauchschmerzen sowie Sterilität. Das ektope Gewebe unterliegt, genauso wie das eutope Endometrium dem hormonellen Einfluss. Therapeutisch gilt die laparoskopische Entfernung der Endometrioseherde als Goldstandard. Daneben werden auch hormonelle sowie analgetische Therapien eingesetzt.

Das Endometriumkarzinom ist das vierthäufigste Karzinom der Frau. Leitsymptom ist hier vor allem die postmenopausale Blutung. Als Therapie steht hier ebenfalls die chirurgische Entfernung an erster Stelle. Adjuvante Strahlen- oder Chemotherapien sind möglich.

Als moderne Therapieform kommt eine zielgerichtete Therapie in Frage. Eine solche Therapie basiert auf molekularen Unterschieden zwischen gesundem und krankem Gewebe. Es gibt verschiedene Ansätze einer solchen Therapie, zum Beispiel der Einsatz von Antikörpern, *small molecules* oder Gentherapien. Um eine zielgerichtete Therapie zu entwickeln, ist es notwendig in dem erkranktem Gewebe spezifische Marker zu identifizieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, geeignete Zielstrukturen zur Entwicklung einer zielgerichteten Therapie der Endometriose und des Endometriumkarzinoms zu detektieren. Als mögliche Promotoren wurden nach ausführlicher Literaturrecherche VEGF, Midkine, $CXCR_4$, Survivin und Heparanase ausgewählt. Es wurden 45 Endometriose-, 17 Endometrium- und 27 Endometriumkarzinomproben hinsichtlich der Expression dieser Zielgene mittels *real-time quantitative* PCR (qPCR) untersucht. Diese wurde mit der $\Delta\Delta C_T$-Methode ausgewertet. Verbliebene Endometriose- und Endometriumproben wurden ebenfalls immunhistochemisch untersucht, um die Ausprägung der entsprechenden Genprodukte nachzuweisen.

VEGF war in den Karzinomproben signifikant höher exprimiert als in den Endometrioseproben. Im Vergleich zum Endometrium ergab sich keine Signifikanz. Auch immunhistochemisch ließ sich im Vergleich Endometriose zu Endometrium kein Unterschied erkennen. Für Survivin zeigte sich in der qPCR eine signifikant höhere Expression in den Karzinomproben sowohl im Vergleich zu den Endometriose- als auch im Vergleich zu den Endometriumproben. Immunhistochemisch zeigte sich in den Endometriose- und Endometriumproben eine schwache bis mäßige Anfärbung. Midkine wies eine signifikant höhere Expression in den Endometrioseproben im Vergleich zu den Karzinomproben auf, jedoch nicht im Vergleich zu den Endometriumproben. Immunhistochemisch zeigten die Endometriumproben eine etwas stärkere Färbung als die Endometrioseproben. Für Heparanase und $CXCR_4$ konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede nachgewiesen werden. Auch immunhistochemisch konnte in den Endometriose- und Endometriumproben ein vergleichbares Färbeverhalten für Heparanase gezeigt werden. Auf eine immunhistochemische Untersuchung für $CXCR_4$ wurde verzichtet.

Eine zielgerichtete Therapie der Endometriose scheint, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, schwierig zu sein. Ein selektiver Marker konnte nicht nachgewiesen werden. Die hohe Streubreite der Ergebnisse könnte auf eine zyklusabhängige Expresssion der Zielstrukturen hindeuten, sodass eine klare Identifikation eines solchen Markers nur schwer zu ermöglichen ist. Bei den untersuchten Endometriumkarzinomproben ergab sich jedoch ein eindeutiges Ergebnis: Survivin ist hier sowohl im Vergleich zum Endometrium als auch im Vergleich zur Endometriose signifikant höher exprimiert und somit ein möglicher Kandidat einer zielgerichteten Therapie zur Behandlung des Endometriumkarzinoms. Abschließend kann man sagen, dass erste Hinweise zur Selektion möglicher Promotoren erabeitet werden konnten, diese jedoch im Rahmen weiterer Studien validiert werden müssen.

Abstract

Endometriosis is characterized by the presesence of endometrial tissue outside the uterus. The estrogen-dependent disease is associated with pelvic pain and sterility. Laparoscopic removal of the endometriotic lesions represents the gold standard of therapeutical interventions. Other options include analgetics and hormonal therapeutics.

The endometrial carcinoma is the fourth most common cancer in women. Leading symptom is postmenopausal bleeding. Surgery ist the most popular treatment, with chemotherapy and radiotherapy as adjuvant therapies.

Targeted therapies are a novel promising approach, which is nowadays wide established in various fields of modern medicine. It is based on molecular differences between healthy and diseased tissue. As it is important that only diseased cells are destroyed, the need for special promoters, that are distinctive for the diseased tissue, seems obvious.

Aim of this work is to identify special promotors for endometriosis and endometrial carcinoma. Based on comprehensive literature search VEGF, midkine, $CXCR_4$, survivin and heparanase seem to be promising candidates. The gene expression levels of these five promotors were analyzed with *real-time quantitative* PCR (qPCR) in 45 samples of endometriosis, 17 samples of endometrium and 27 samples of endometrial carcinoma. To analyze the relative gene expression the $\Delta\Delta C_T$-method was used. A subsample was also examined by immunohistochemistry.

The results show, that the expression of VEGF in carcinoma samples is significantly higher than in those of endometriosis. No significant difference between carcinoma and endometrium could be detected. The immunohistochemical staining showed no difference between endometriosis and endometrium. The expression of survivin was significantly higher in carcinoma samples than in endometriosis and endometrium. The immunohistochemistry shows a weak staining of both endometriosis and endometrium. For midkine the expression in endometriosis samples is significantly higher compared to carcinoma samples, but not to endometrium samples. The immunohistochemical staining of the endometrial samples is stronger than those of endometriosis. There were no significant results for heparanase and $CXCR_4$ in qPCR and immunohistochemical staining.

In this work, we can't identify special promotors for endometriosis. For this case a targeted therapy seems to be difficult. Survivin expression in qPCR is the most interesting result in the matter of a targeted therapy for endometrial carcinoma. In conclusion the results of this work give first evidence of possible promotors, which have to be validate in following studies.

Abkürzungen

ASRM	*American Society for Reproductive Medicine*
bFGF	*basic fibroblast growth factor*
BIRC 5	*baculoviral IAP repeat-containing 5*
cDNA	komplementäre DNA (*complementary DNA*)
C_T	*threshold cycle*
ΔC_T	delta-C_T-Wert
$\Delta\Delta C_T$	delta-delta-C_T-Wert
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4
DAB	Diamnobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEC	Endoskopische Endometriumklassifikation
EGF	*Endothelial Growth Factor*
FIGO	*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*
HNPCC	hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
IAP	*Inhibitors of apoptosis protein*
IGF-1	*Insulin-like Growth Factor*
IL-1	Interleukin-1
IL-1β	Interleukin-1β
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IRS	Immunreaktiver Score (*immunoreactive score*)
LSAB	*Labelled* (Strept-)Avidin-Biotin
NEGF-2	*neurite growth-promoting factor-2*
NSAP	nichtsteroidale Antiphlogistika
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
mRNA	Boten-RNA (*messenger RNA*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP	Prozentualer Anteil der gefärbten Zellen (*percentage of positive cells*)
qPCR	*real-time quantitative* PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDF-1	*stromal cell-derived factor 1*
SI	Farbintensität (*staining intensity*)
SLPI	*secretory leukoprotease inhibitor*
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF-α	*Transforming Growth Faktor-α*
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
VPF	*Vascular Permeability Factor*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen III

Abbildungsverzeichnis VI

Tabellenverzeichnis VII

1. Einleitung 1
   1.1. Endometriose . . . 1
      1.1.1. Ätiologie . . . 1
      1.1.2. Klassifikation . . . 3
      1.1.3. Morphologie . . . 4
      1.1.4. Klinik . . . 6
      1.1.5. Diagnostik . . . 7
      1.1.6. Therapie . . . 7
   1.2. Endometriumkarzinom . . . 8
      1.2.1. Ätiologie . . . 8
      1.2.2. Klassifikation . . . 9
      1.2.3. Grading . . . 9
      1.2.4. Prognostische Faktoren . . . 10
      1.2.5. Klinik . . . 10
      1.2.6. Diagnostik . . . 10
      1.2.7. Therapie . . . 11
   1.3. Neue Therapieansätze – Zielgerichtete Therapie . . . 11
      1.3.1. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) . . . 12
      1.3.2. Midkine . . . 14
      1.3.3. Heparanase . . . 15
      1.3.4. $CXCR_4$ . . . 15
      1.3.5. Survivin . . . 16
   1.4. Zielsetzung der Arbeit . . . 18

2. Material und Methoden 19
   2.1. Material . . . 19
      2.1.1. Gewebe . . . 19
   2.2. Methoden . . . 19
      2.2.1. Zellkultur . . . 19
      2.2.2. Molekulargenetische Methoden . . . 20
      2.2.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA . . . 22
      2.2.4. cDNA-Synthese . . . 23
      2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . 23
      2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese . . . 25
      2.2.7. *Real-time quantitative* PCR (qPCR) . . . 26

2.3. Immunhistochemie . . . 31
2.3.1. Hämotoxylin-Eosin-Färbung . . . 31
2.3.2. *Labelled* (Strept-)Avidin-Biotin (LSAB)-Methode . . . 31
2.3.3. Durchführung der immunhistochemischen Färbungen . . . 32
2.3.4. Mikroskopische Auswertung . . . 32
2.4. Statistische Auswertung . . . 34

3. Ergebnisse 35
3.1. RNA-Isolation . . . 35
3.2. β-Aktin-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) . . . 35
3.3. *Real-time quantitative* PCR (qPCR) . . . 36
3.3.1. PCR-Effizienzen . . . 36
3.3.2. Genexpressionsanalyse . . . 40
3.4. Immunhistochemie . . . 45
3.4.1. Progesteronrezeptor . . . 46
3.4.2. Östrogenrezeptor . . . 49
3.4.3. VEGF . . . 52
3.4.4. Survivin . . . 55
3.4.5. Midkine . . . 58
3.4.6. Heparanase . . . 61

4. Diskussion 64
4.1. VEGF . . . 65
4.2. Midkine . . . 66
4.3. Heparanase . . . 68
4.4. CXCR4 . . . 69
4.5. Survivin . . . 71
4.6. Zusammenfassung und Ausblick . . . 73

Literaturverzeichnis 75

A. Rohwerttabellen der RNA-Isolation 89

B. Rohwerttabellen der Genexpressionsanalyse 92

C. Rohwerttabellen der Immunhistochemie 104

Abbildungsverzeichnis

1.1. **ASRM-Klassifikation der Endometriose (rASRM)** 4
1.2. **Laparoskopische Bilder** 5
1.3. **Histologische Darstellung von Endometriose-Herden** 6

3.1. **Gelelektrophorese der β-Aktin-RT-PCR** 36
3.2. **Gelelektrophorese der Target-Gen-RT-PCR** 36
3.3. **Effizienz der GAPDH-PCR** 37
3.4. **Effizienz der VEGF-PCR** 37
3.5. **Effizienz des Survivin-PCR** 38
3.6. **Effizienz der Midkine-PCR** 38
3.7. **Effizienz der Heparanase-PCR** 39
3.8. **Effizienz der CXCR4-PCR** 39
3.9. **VEGF-Expressionen in Zielgeweben** 41
3.10. **Survivin-Expressionen in Zielgeweben** 42
3.11. **Midkine-Expressionen in Zielgeweben** 43
3.12. **Heparanase-Expressionen in Zielgeweben** 44
3.13. **CXCR4-Expressionen in Zielgeweben** 45
3.14. **Mikroskopie von Progesteronrezeptor-Ak** 46
3.15. **Mikroskopie der Endometriose für Progesteronrezeptor-Ak** 47
3.16. **Mikroskopie des Endometriums für Progesteronrezeptor-Ak** 48
3.17. **Mikroskopie von Östrogenrezeptor-Ak** 49
3.18. **Mikroskopie der Endometriose für Östrogenrezeptor-Ak** 50
3.19. **Mikroskopie des Endometriums für Östrogenrezeptor-Ak** 51
3.20. **Mikroskopie von VEGF-Ak** 52
3.21. **Mikroskopie der Endometriose für VEGF-Ak** 53
3.22. **Mikroskopie des Endometriums für VEGF-Ak** 54
3.23. **Mikroskopie von Survivin-Ak** 55
3.24. **Mikroskopie der Endometriose für Survivin-Ak** 56
3.25. **Mikroskopie des Endometriums für Survivin-Ak** 57
3.26. **Mikroskopie von Midkine-Ak** 58
3.27. **Mikroskopie der Endometriose für Midkine-Ak** 59
3.28. **Mikroskopie des Endometriums für Midkine-Ak** 60
3.29. **Mikroskopie von Heparanase-Ak** 61
3.30. **Mikroskopie der Endometriose für Heparanase-Ak** 62
3.31. **Mikroskopie des Endometriums für Heparanase-Ak** 63

Tabellenverzeichnis

1.1. **Endoskopische Endometriumklassifikation (EEC)** 4
1.2. **Lokalisation von Endometriose-Herden** 5
1.3. **Symptome der Endometriose** 6
1.4. **Erhöhung des Erkrankungsrisikos** 9
1.5. **FIGO-Klassifikation des Endometriumkarzinoms** 10

2.1. **Zellkultur – Chemikalien und Lösungen** 20
2.2. **Zellkultur – Materialien und Geräte** 21
2.3. **RNA-Isolation – Chemikalien und Lösungen** 21
2.4. **RNA-Isolation – Materialien und Geräte** 22
2.5. **Mastermix cDNA-Synthese** 23
2.6. **Mastermix β-Aktin-RT-PCR** 24
2.7. **Taq-Mix** 24
2.8. **β-Aktin cDNA-Kontrolle** 25
2.9. **Reaktionsbedingungen β-Aktin-RT-PCR** 25
2.10. **Gelelektrophorese – Chemikalien und Lösungen** 27
2.11. **Geräte und Materialien für die Gelelektrophorese** 28
2.12. **MasterMix SYBR-Green** 30
2.13. ***Real-time quantitative* PCR (qPCR) – Chemikalien und Lösungen** 30
2.14. ***Real-time quantitative* PCR (qPCR) – Geräte und Materialien** . . 30
2.15. **Immunhistochemie – Chemikalien und Lösungen** 33
2.16. **Immunhistochemie – Antikörper** 33
2.17. **Immunhistochemie – Geräte und Materialien** 33

3.1. **Auswertung der IRS-Werte für Progesteronrezeptor** 46
3.2. **Auswertung der IRS-Werte für Östrogenrezeptor** 49
3.3. **Auswertung der IRS-Werte für VEGF** 52
3.4. **Auswertung der IRS-Werte für Survivin** 55
3.5. **Auswertung der IRS-Werte für Midkine** 58
3.6. **Auswertung der IRS-Werte für Heparanase** 61

A.1. **Gewonnene RNA-Mengen aus Endometrium** 89
A.2. **Gewonnene RNA-Mengen aus Endometriose** 90
A.3. **Gewonnene RNA-Mengen aus Endometrium-Karzinom** 91

B.1. **Kalibrierung Zelllinie mit VEGF** 92
B.2. **VEGF-Expression in Endometriose** 93
B.3. **VEGF-Expression in Endometrium** 94
B.4. **VEGF-Expression in Endometriumkarzinom** 94
B.5. **Kalibrierung Zelllinie mit Survivin** 94
B.6. **Survivin-Expression in Endometriose** 95
B.7. **Survivin-Expression in Endometrium** 95

B.8. **Survivin-Expression in Endometriumkarzinom** 96
B.9. **Kalibrierung Zelllinie mit Midkine** 96
B.10. **Midkine-Expression in Endometriose** 97
B.11. **Midkine-Expression in Endometrium** 98
B.12. **Midkine-Expression in Endometriumkarzinom** 98
B.13. **Kalibrierung Zelllinie mit Heparanase** 98
B.14. **Heparanase-Expression in Endometriose** 99
B.15. **Heparanase-Expression in Endometrium** 100
B.16. **Heparanase-Expression in Endometriumkarzinom** 100
B.17. **Kalibrierung Zelllinie mit CXCR4** 101
B.18. **CXCR4-Expression in Endometriose** 102
B.19. **CXCR4-Expression in Endometrium** 103
B.20. **CXCR4-Expression in Endometriumkarzinom** 103

C.1. **IRS-Werte für Progesteronrezeptor-Antikörper in Endometriose** . 104
C.2. **IRS-Werte für Progesteronrezeptor-Antikörper in Endometrium** . 105
C.3. **IRS-Werte für Östrogenrezeptor-Antikörper in Endometriose** . . . 105
C.4. **IRS-Werte für Östrogenrezeptor-Antikörper in Endometrium** . . . 106
C.5. **IRS-Werte für VEGF-Antikörper in Endometriose** 106
C.6. **IRS-Werte für VEGF-Antikörper in Endometrium** 107
C.7. **IRS-Werte für Survivin-Antikörper in Endometriose** 107
C.8. **IRS-Werte für Survivin-Antikörper in Endometrium** 108
C.9. **IRS-Werte für Midkine-Antikörper in Endometriose** 108
C.10. **IRS-Werte für Midkine-Antikörper in Endometrium** 109
C.11. **IRS-Werte für Heparanase-Antikörper in Endometriose** 109
C.12. **IRS-Werte für Heparanase-Antikörper in Endometrium** 110

KAPITEL 1

Einleitung

1.1. Endometriose

Unter Endometriose versteht man das ektope Auftreten von endometrialem Gewebe außerhalb des Uterus. Es handelt sich um eine benigne, östrogenabhängige Erkrankung, die meistens chronisch verläuft und mit Unterbauchschmerzen und Infertilität in Verbindung gebracht wird (Giudice u. Kao 2004). Das ektope Endometrium zeigt eine große Ähnlichkeit zum normalen Endometrium. Neben dem charakteristischen Aufbau von Drüsen und Stroma, weist das ektope Gewebe auch die typische hormonabhängige Sekretion und Proliferation auf, jedoch nicht in dem Maße wie eutopes Endometrium. Endometrioseherde sind vor allem im kleinen Becken, den Ovarien und im rektovaginalen Septum zu finden (*Endometriosis genitalis externa*). In seltenen Fällen findet man auch Herde außerhalb des kleinen Beckens beispielsweise am Darm, in der Pleura oder sogar im Gehirn (*Endometriosis extragenitalis*) (Giudice u. Kao 2004). Der Begriff *Endometriosis genitalis interna* ist veraltet. Die Erkrankung, bei der es zum Auftreten von endometrialem Gewebe innerhalb des Myometriums kommt, wird heute als *Adenomyosis uteri* bezeichnet und als eigene Entität angesehen (Olive u. Schwartz 1993).

Eine genaue Prävalenz der Endometriose kann nicht exakt angegeben werden, da eine defintive Diagnose nur durch eine Laparoskopie gestellt werden kann. Schätzungsweise liegt sie bei ca. 6 % bis 10 % der Frauen im gebärfähigen Alter (Giudice u. Kao 2004). Bei Frauen, die unter chronischen Unterbauchschmerzen und/oder Infertilität leiden, wird die Prävalenz auf 35 % bis 50 % geschätzt (Paupoo et al. 2010). Hervorzuheben ist, dass der Zeitraum bis zur endgültigen Diagnose oft bis zu 11 Jahre andauert, weil die Symptome sehr variabel und unspezifisch sind (Hadfield et al. 1996).

1.1.1. Ätiologie

Endometriose wurde erstmals 1860 von dem Wiener Pathologen Rokitansky beschrieben (Rokitansky 1860). Um die Ätiologie zu erklären, gibt es verschiedene Ansatzpunkte, allerdings scheint es sich um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln.

Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Theorie aufgestellt, dass die endometriotischen Läsionen aus embryonalen Resten entstehen (von Recklinghausen 1896; Russell 1899). Diese Theorie konnte bisher jedoch nicht wissenschaftlich belegt werden.

Anfang des 20. Jahrhunderts stellte Meyer die Metaplasietheorie auf. Diese besagt, dass es durch wiederholte Irritationen des Peritoneums, durch Infektionen oder chemische Substanzen, zu Metaplasien kommt. Diese führen letztendlich zur Transformation des pluripotenten Zölomepithels in endometriales Gewebe (Meyer 1919). Jedoch lässt sich diese Theorie kaum durch klinische und experimentelle Daten stützen. Wenn das Mesothel zur Metaplasie fähig wäre, müssten Endometrioseherde auch in anderen Zölomepithelien des Organismus vorkommen (Vinatier et al. 1996). Eine Weiterführung dieser These ist die Induktionstheorie, die konstatiert, dass das peritoneale Gewebe durch endogene biochemische oder immunologische Stoffe aus dem Menstrualblut in endometriales Gewebe umgewandelt wird (Witz 1999).

Untersuchungen zeigten, dass es eine Streuung der Herde über Lymphwege und Blutgefäße gibt, wodurch das extragenitale Auftreten erklärt werden könnte (Sampson 1927a).

Die anerkannteste Entstehungstheorie stammt von Sampson (1927) und besagt, dass während der Menstruation das Endometriumgewebe retrograd durch die Tube in die Bauchhöhle versprengt und dort implantiert wird (*Implantationstheorie*) (Sampson 1927b).

Gestützt wird die These dadurch, dass bei Frauen, die von Endometriose betroffen sind, häufig ein stärkerer Reflux von Blut und endometrialen Gewebe ins kleine Becken beobachtet wird (Halme et al. 1984). Auch die subendometrialen, myometrialen Kontraktionen sind stärker (Salamanca u. Beltrán 1995). Die retrograde Menstruation ist jedoch ein physiologischer Vorgang der bei ca. 70 % bis 90 % der Frauen auftritt (Kyama et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Peritonealflüssigkeit von menstruierenden Frauen endometriale Zellen enthält, die zu 98 % adhärieren und proliferieren können (Kruitwagen et al. 1991). Die Prävalenz der Endometriose beträgt aber nur etwa 10 %. So scheinen sich die peritonealen Gegebenheiten sowie die Reaktion des Immunsystems auf die versprengten Endometriumzellen bei Patienten mit Endometriose von gesunden Frauen zu unterscheiden.

Die immunologische Reaktion des Organismus scheint hier eine entscheidende Rolle zu spielen. Neben der Volumenzunahme, steigt auch die Konzentration von Leukozyten, Makrophagen, inflammatorischen Mediatoren und natürlichen Killerzellen in der Peritonealflüßigkeit (Gazvani u. Templeton 2002). Die Anwesenheit von endometrialen Zellen in der Peritonealhöhle bewirkt somit eine entzündliche Reaktion, die wiederum das Fortschreiten der Erkrankung begünstigt. So wird inflammatorischen Zytokinen (TNF-α, IL-8 und IL-6) eine Rolle bei dem Adhäsionsprozess endometrialer Zellen zugesprochen: IL-8 stimuliert die Adhäsion an Fibronektin, wobei TNF-α neben der Proliferation endometrialer Zellen, auch die Adhäsion an extrazelluläre Matrixkomponenten fördert (Kyama et al. 2003).

Makrophagen werden in höherer Anzahl gefunden und zeigen eine gesteigerte Aktivität. Sie induzieren Neovaskularisation, Inflammation und Gewebereparatur, indem sie Zytokine, Komplementfaktoren, Prostaglandine und hydrolytische Enzyme sezernieren (Gazvani u. Templeton 2002). Zudem werden bei gesunden Frauen versprengte endometriale Zellen von natürlichen Killerzellen eliminiert, die bei Betroffenen eine reduzierte zytotoxische Aktivität aufweisen (Wilson et al. 1994). Auch wurde ein verändertes Aktivitätsmuster im Bereich der T-Lymphozyten in mehreren Studien beschrieben: Es hat sich gezeigt, dass T_H2-Zellen aus der Peritonealflüssigkeit die zelluläre Immunität, durch erhöhte Sekretion von IL-4 und IL-10, unterdrücken (Harada et al. 2004).

Endometriosegewebe unterscheidet sich in vielen Punkten von gesundem Endometrium. Dies betrifft neben dem Apoptoseverhalten auch Veränderungen in der Struktur, der Proliferation, Immunkomponenten, Adhäsionskomponenten etc.(Sharpe-Timms 2001). Die Apoptoseaktivität ist in Endometriosegewebe herabgesetzt, denn im gesunden Organismus würden versprengte Zellen, die nicht in den lokalen Zellverband passen, dem programmierten Zelltod unterliegen. Dieses scheint vor allem in der späten sekretorischen und Menstruations-Phase bei Endometriose-Patienten zu fehlen (Harada et al. 2004).

Es bleibt jedoch zu klären, ob die reduzierte Apoptose bei den Betroffenen im eutopen Gewebe oder erst nach der Versprengung in das kleine Becken an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist. Dies wird allerdings schwierig zu untersuchen sein, da Patienten in frühen Endometriose-Stadien nur selten diagnostiziert werden (Harada et al. 2004).

Auch eine genetische Disposition scheint bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle zu spielen. Frauen, deren Verwandte 1. Grades an schwerer Endometriose leiden, haben ein sechsmal höheres Risiko zu erkranken (Simpson et al. 1980). Dies konnte durch weitere Studien, insbesondere bei der Untersuchung mit Zwillingen, gestützt werden (Burney u. Giudice 2012).

Es wird vermutet, dass Umweltgifte, wie zum Beispiel Dioxin, oder Stoffe, die ähnlich wie Östrogen wirken, an der Pathogenese beteiligt sind (Giudice u. Kao 2004).

Die Endometriosezellen müssen nicht nur in die Bauchhöhle gelangen, sondern dort auch implantiert werden. Eine ausreichende Blutversorgung muss vorhanden sein. Daher konnten molekulargenetische Untersuchungen eine Reihe von Genen aufzeigen, die bei Patienten mit Endometriose stärker exprimiert sind. Hierzu gehören Aromatase, *endometrial bleeding factor*, 17-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, HoxA10, HoxA11, *leukemia inhibitory factor*, Matrix Metalloproteinase-7 und -11 sowie Progesteron-Rezeptoren (Giudice 2003).

Endometriose-Patienten haben zudem ein erhöhtes Risiko am Ovarialkarzinom zu erkranken. Ovarielle Endometrioseherde können sich maligne verändern. Es wurde eine genetische Veränderung der Tumorsuppressorgene wie PTEN, p53 und bcl nachgewiesen. Hier wird nochmals deutlich, welchen Stellenwert eine frühzeitige Diagnose und Therapie der Endometriose einnimmt (Nezhat et al. 2008).

1.1.2. Klassifikation

Um die Erkrankung einzuteilen, gibt es verschiedenste Klassifikationen. Die weitverbreitetste Klassifikation wurde 1979 von der *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) veröffentlicht. Sie wurde 1996 revidiert und wird daher heute *rASRM*-Klassifikation genannt. Bei diesem Klassifikationssystem wird nach einem Punkteschema der Schweregrad der Erkrankung angegeben. Berücksichtigung finden Größe, Tiefe, Ausdehnung und Lokalisation der Endometrioseherde. Extragenitale Manifestationen werden jedoch nicht mit eingerechnet. Es ergeben sich vier Schweregrade (s. Abbildung 1.1 auf der nächsten Seite): gering, mäßig, schwer und ausgedehnt (Canis et al. 1997).

Die EEC-Klassifikation ist eine endoskopische Klassifikation, die den laparoskopischen Befund beschreibt und ebenfalls vier Stadien beschreibt (Semm 1983) (s. Tabelle 1.1 auf der nächsten Seite).

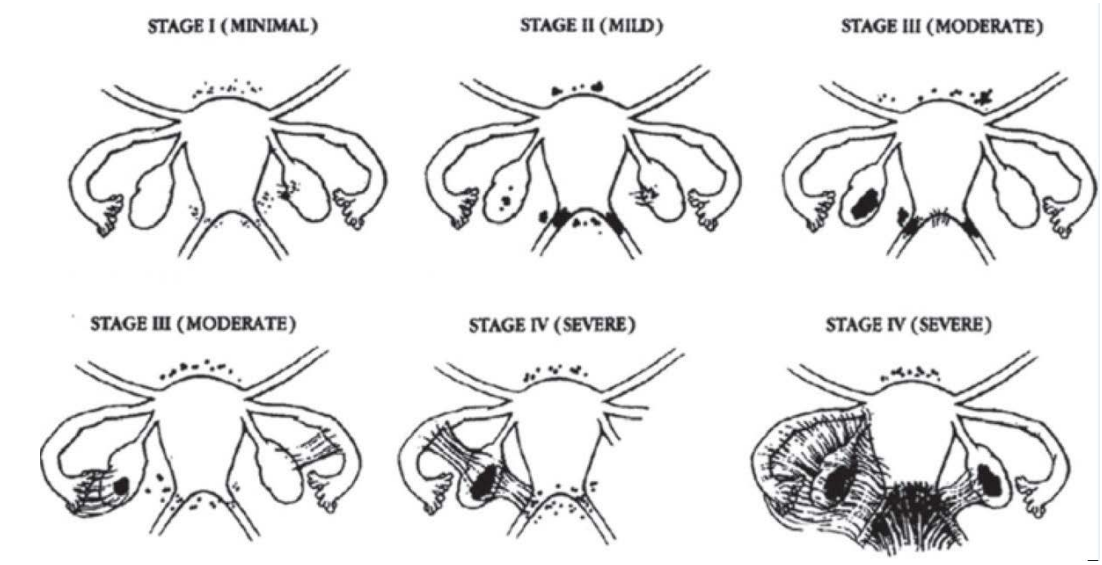


Abb. 1.1.: ASRM-Klassifikation der Endometriose (rASRM)
Darstellung der vier Schweregrade übernommen von Bloski u. Pierson (2008), lizensiert durch Copyright Clearance Center's RightsLink®, Order-No. 4192711124345

Tabelle 1.1.: Endoskopische Endometriumklassifikation (EEC)

Grad	Kriterien
EEC1	Herde <5 mm im Durchschnitt, uneingeschränkte Tubendurchgängigkeit
EEC2	Herde >5 mm im Durchschnitt, Blasendachherde, Adhäsionen, Ampullenstenosen/-phimosen
EEC3	Adenomyosis, Schokoladenzysten, Knoten in den Ligamenten
EEC4	Verwachsungen

Die ENZIAN-Klassifikation stellt eine weitere, an onkologische Klassifikationen angelehnte Einteilung dar. Hier wird die *rASRM*-Einteilung hinsichtlich der Beschreibung der tiefen Endometriose-Herde und dem Befall des Retroperitoneums sowie von Fremdorganen erweitert (Haas et al. 2011).

1.1.3. Morphologie

Makroskopisch

Es finden sich meistens gruppiert stehende, stecknadelgroße, leicht erhabene Bezirke auf dem Peritoneum, die farblich stark variieren können. Die Herde wachsen polypös oder infiltrierend aber niemals destruierend wie ein Karzinom. Bei der Ovarialendometriose findet man häufig die sogenannten Schokoladenzysten, die nach ihrem cremigen, dunkelbraunen Inhalt benannt sind (Stauber u. Weyerstrahl 2005).

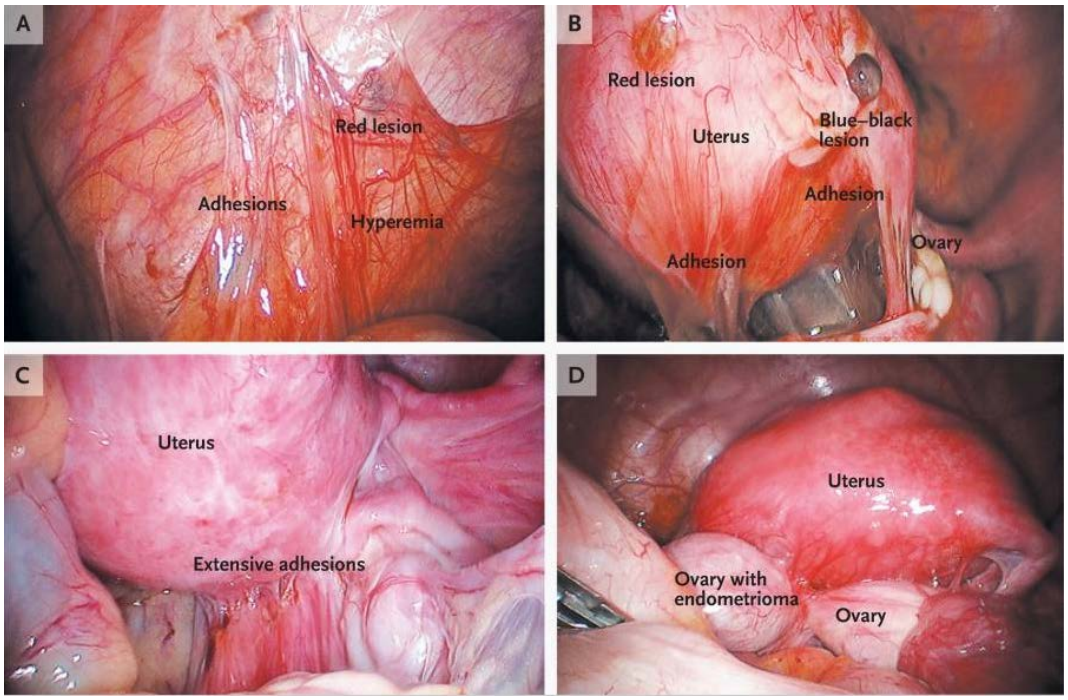


Abb. 1.2.: Laparoskopische Bilder
A: Rote Läsion, Adhäsionen, Hyperämie des Peritoneums; *B*: Rote und schwarze Läsionen, Verwachsungen; *C*: ausgedehnte Verwachsungen; *D*: ovarielle Endometriose; reproduced with permission from (Giudice 2010), Copyright Massachusetts Medical Society

Mikroskopisch

Zu 50 % findet man hochdifferenzierte Drüsen, die hormonabhängig reagieren, sowie Stroma. In 15 % kann man Drüsenepithel unterschiedlichen Differenzierungsgrades und in 35 % hochdifferenziertes Epithel ohne Endometriumspezifität nachweisen. Diese Formen zeigen jedoch keine Hormonabhängigkeit (Stauber u. Weyerstrahl 2005). Beispielhaft zeigt Abbildung 1.3 auf der nächsten Seite einige histologische Befunde der Endometriose.

Die häufigsten Lokalisationen der Endometriose sind Tabelle 1.2 zu entnehmen.

Tabelle 1.2.: Lokalisation von Endometriose-Herden

Lokalisation	Häufigkeit
Inneres Genital:	
Ovarien	50 %
Tuben	10 %
Sakrouterinligamente und Douglasperitoneum	60 %
Blase	15 %
Genital und Darm/Ureter	20 %
Aussschließlich extragenital	8 %
Extraabdominell (Lunge/Pleura), Extremitäten, Spinalkanal	sehr selten

Übernommen aus Diedrich et al. (2007)

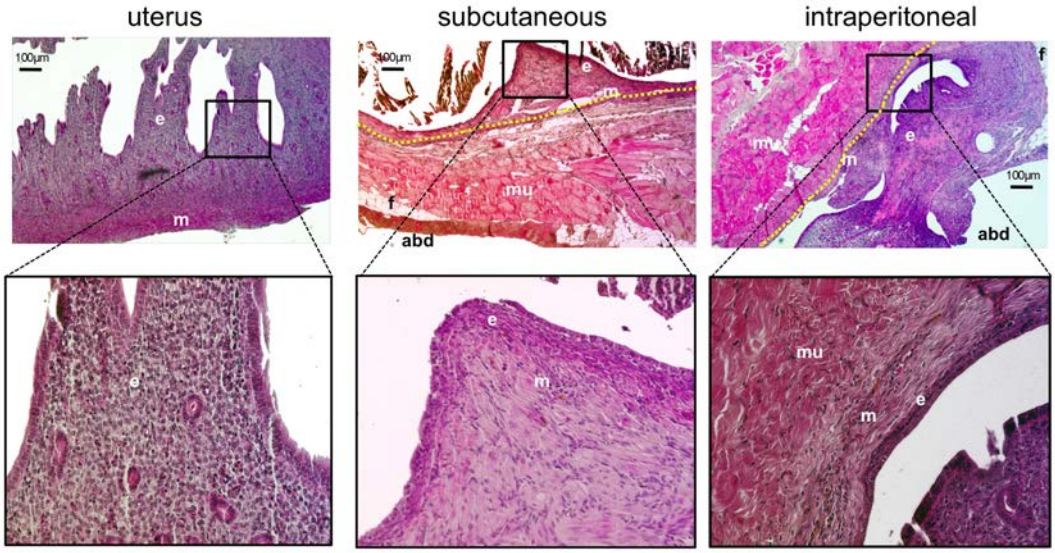


Abb. 1.3.: Histologische Darstellung von Endometriose-Herden
HE-Färbung; *e*: Endometriose-Herd, *m*: Myometrium, *mu*: Muskulatur, *f*: Fettgewebe, *abd*: Bauchhöhle (Schreinemacher et al. 2012), licensed under Creative Commons Licence CC-BY 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode)

1.1.4. Klinik

Die Endometriose ist eine Erkrankung bei Frauen im gebährfähigen Alter, kann also mit der Menarche beginnen und endet stets mit der Menopause, da die Aktivität der Endometriose der hormonellen Stimulation unterliegt. Leitsymptom der Erkrankung ist der Unterbauchschmerz, der chronisch verläuft und in der Intensität zyklische Schwankungen aufzeigen kann (Giudice 2010). Besonders häufig werden Dysmenorrhoe und Dyspareunie als Hauptsymptom angegeben. Es kann aber auch zu Defäkationsbeschwerden und/oder Dysurie kommen (Neunhoeffer u. Lawrenz 2011). Die klinischen Beschwerden korrelieren nicht zwingend mit dem Ausmaß, sondern eher mit der Lokalisation der Endometrioseherde. Oft sind die betroffenen Patientinnen in ihren täglichen Leben sowie körperlichen Aktivität stark eingeschränkt (Giudice 2010). Ein weiteres Leitsymptom der Endometriose ist die

Tabelle 1.3.: Symptome der Endometriose

Symptome der Endometriose	Häufigkeit
Dysmenorrhoe	50 % bis 60 %
Zyklische Unterbauchschmerzen	30 % bis 40 %
Ungewollte Kinderlosigkeit	30 % bis 50 %
Dysurie	2 % bis 5 %
Prämenstruelle Schmierblutungen und Hypermenorrhoe	5 % bis 15 %
Defäkationsbeschwerden	5 %
Zyklische Hämaturie/blutige Defäkation	<1 %

Übernommen aus Stauber u. Weyerstrahl (2005)

ungewollte Kinderlosigkeit, die ca. 40 % der Patienten betrifft. Ursächlich könnten eine Verlegung der Tuben durch Endometrioseherde, die Dyspareunie und wiederholte operative Eingriffe sein (Neunhoeffer u. Lawrenz 2011; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2006). Die typische Symptomatik und deren Häufigkeit sind in Tabelle 1.3 auf der vorherigen Seite aufgeführt.

1.1.5. Diagnostik

Neben einer ausführlichen Anamnese und bimanuellen Untersuchungen bilden Kolposkopie, Sonographie und auch MRT wichtige Säulen der Diagnostik. Bei der bimanuellen Untersuchung kann ein schmerzhafter Douglas-Raum sowie eine schmerzhafte Beweglichkeit des Uterus durch Befall der Sakrouterinligamente auf Endometriose hinweisen. Die Kolposkopie kann nur einen Befall der Vulva, Vagina, Zervix und Portio bewerten. Eine sichere Diagnose kann jedoch nur mittels Laparoskopie gestellt werden, wodurch die exakte Lokalisation, das Ausmaß und der Aktivitätsgrad sicher festgestellt werden kann. (Giudice 2010; Stauber u. Weyerstrahl 2005)

1.1.6. Therapie

Die Therapie gliedert sich in mehrere Säulen und ist stark abhängig von den individuellen Faktoren, die die Patienten mitbringen z. B. Alter, Kinderwunsch, etc. Bisheriges Ziel der Therapie ist es, die bestehenden Herde zu beseitigen und neues Auftreten zu verhindern (Stauber u. Weyerstrahl 2005). Eine symptomatische Therapie mittels Analgetika ist vor allem den Frauen zu empfehlen, die keinen Kinderwunsch haben (Diedrich et al. 2007). Hier werden vor allem nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAP, geläufiger nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)) eingesetzt z. B. Ibuprofen, Diclofenac (Neunhoeffer u. Lawrenz 2011). Weitere medikamentöse Behandlungsoptionen beeinflussen die ovarielle Aktivität und sind im Folgenden aufgeführt (Farquhar 2007). Die kontinuierliche Gabe von Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparaten bremst die GnRH- und die LH-/FSH-Sekretion. Das Endometrium wird zunächst stimuliert, anschließend kommt es zur Amenorrhoe und zur Nekrose und Resorption der bestehenden Endometrioseherde. Die alleinige Gestagentherapie soll die Schmerzen und ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung mildern, ist jedoch mit einigen Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme oder Akne behaftet (Stauber u. Weyerstrahl 2005). Danazol verhindert einen LH-/FSH-Peak durch Hemmung der Steroidsynthese in den Gonaden und der Nebennierenrinde und vermindert die Östrogeneffekte. Hierbei ist mit einer Gewichtszunahme, Hautveränderungen oder sogar Hirsutismus zur rechnen ist, sodass der klinische Einsatz begrenzt ist (Farquhar 2007). GnRH-Analoga bewirken durch den stark reduzierten Östrogenspiegel der Menopause ähnliche Symptome mit Amennorhoe durch Atrophie des Endometriums und können die Knochendichte negativ beeinflussen. Es konnte jedoch eine Linderung der Schmerzen erreicht werden (Giudice 2010). Die operative Therapie kann offen oder laparaskopisch durchgeführt werden und besteht vor allem darin die bestehenden Herde zu resiszieren, die Ovarien zu rekonstruieren und die Fertilität wiederherzustellen. In ca. 65 % der Fälle können so die Schmerzen gelindert und die Lebensqualität der Betroffenen gesteigert werden (Giudice 2010). Zudem können

gleichzeitig efferente Nerven in den Ligamenta sacrouterina ablatiert werden (LUNA: *laparaskopic uterine nerve ablation*), was das Outcome in Bezug auf die Schmerzen noch verbessert (Neunhoeffer u. Lawrenz 2011). Die Infertilität kann mittels Gonadotropin, intrauteriner Insemination und *In-vitro*-Fertilisation effektiv behandelt werden (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2006). Insgesamt ist die bisherige Behandlung der Endometriose kompliziert und nicht zufrieden stellend, sodass nach neuen Therapieoptionen geforscht werden muss.

1.2. Endometriumkarzinom

Das Endometriumkarzinom bildet mit 95 % den häufigsten malignen Prozess im weiblichen Uterus (Madison et al. 2004). Mit einer Inzidenz von 170 000 neudiagnostizierten Fällen pro Jahr und weltweit, betrifft das Endometriumkarzinom vor allem Frauen im postmenopausalen Alter. So steht diese Erkrankung in ihrer Inzidenz der Tumoren bei Frauen direkt hinter Brust-, Darm- und Lungenkrebs (Stauber u. Weyerstrahl 2005). Es werden hinsichtlich der Morphologie und Prognose zwei Typen des Endometriumkarzinoms unterschieden: Das Typ I Karzinom ist mit ca. 80 % der diagnostizierten Neuerkrankungen deutlich häufiger. Es entsteht auf Grundlage einer atypischen Hyperplasie und ist Östrogen-abhängig. Histologisch ähnelt es den endometrialen Zellen. Betroffen sind vor allem Patientinnen in der Menopause. Als Risikofaktoren gelten Adipositas, Hyperlipidämie, Infertilität, Nullipara sowie eine späte Menopause (Prat 2004). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt hier je nach Stadium ca. 90 % (Johanna et al. 2010). Das Typ II Karzinom ist somit deutlich seltener (ca. 20 %) und umfasst vor allem das klarzellige und seröse Karzinom sowie die undifferenzierten, muzinöse und squamöse Karzinome (Prat 2004). Es entsteht häufig in Folge von Polypen oder präkanzerösen Läsionen. Die Pathogenese ist östrogenunabghängig (Bokhman 1983; Felix et al. 2010). Es geht häufig mit einer schlechteren Prognose einher, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 30 % bis 40 % (Johanna et al. 2010).

1.2.1. Ätiologie

Die genaue Pathogenese des Endometriumkarzinoms ist noch nicht vollständig erklärt. Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung des Typ I Endometriumkarzinoms ist eine dauerhafte endogene oder exogene Östrogenexposition. Durch eine übermäßige, einseitige Östrogen-Stimulation kommt es zur endometrialen Proliferation. Die Progesteron-induzierte Zelldifferenzierung fehlt, es kommt zu einer erhöhten mitotischen Aktivität und zum vermehrten Auftreten von DNA-Replikationsfehlern (Akhmedkhanov et al. 2001). Eine Östrogen-Ersatztherapie und die Einnahme von Tamoxifen zur Therapie des Mammakarzinoms werden als Risikofaktoren diskutiert (Elit 2000). Eine Schwangerschaft scheint einen protektiven Effekt auf die Entwicklung des Endometriumkarzinoms auszuüben, da es zum einem zum mechanischen Entfernen von malignen oder prämalignen Zellen kommt und zum anderen die erhöhten Progesteronwerte eine schützende Funktion erfüllen (Hinkula et al. 2002). Weitere Risikofaktoren sind Adipositas, Diabetes mellitus, Hypertension, Nullipara sowie eine späte Menopause (nach dem 55. Lebensjahr) (Brinton et al. 1992). Frauen die

bereits an einem anderen gynäkologischen Tumor, wie Mamma- oder Ovarialkazinom, oder an nicht heriditärem Darmkrebs erkrankt sind, scheinen ein erhöhtes Erkrankungs-Risiko zu haben. Auch wurde gezeigt, dass Patienten, die an hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom leiden, ein 10 % höheres Risiko tragen, ein Endometriumkarzinom zu entwickeln. Zudem spielen Mutationen und Amplifikationen von Onkogenen, wie K-ras und Her2/neu, sowie Mutationen und Deletionen von Tumor-Supressorgenen und DNA-Reparaturfunktionen genauso eine Rolle bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms wie Umwelteinflüsse, Ernährung und hormonelle Faktoren (Münstedt et al. 2004). Die wichtigsten Risikofaktoren sind in Tabelle 1.4 aufgeführt.

1.2.2. Klassifikation

Neben der oben aufgeführten histologischen Einteilung des Endometriumkarzinoms, erfolgt die Klassifikation nach der chirurgischen Einteilung nach der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) (s. Tabelle 1.5 auf der nächsten Seite).

1.2.3. Grading

Ein wichtiger prognostischer Marker ist das Tumorgrading. Hier unterscheidet man drei Stadien, je nach Differenzierung der Tumorzellen (AWMF 2002):

Grading	**Differenzierung**	**Anteil nicht-plattenepithelialer, solider Tumoranteile**
G1	hoch	≤5 %
G2	mäßig	6 % bis 50 %
G3	undifferenziert	>50 %

Tabelle 1.4.: Erhöhung des Erkrankungsrisikos

Faktoren	**Erhöhung des Erkrankungsrisiko für Endometriumkarzinom**
Frühe Menarche	2,4-fach
Späte Menopause	2,4-fach
Nullipara	2-fach
Polyzystisches Ovar-Syndrom	2,8-fach
Diabetes mellitus	2,8-fach
Hypertonie	1,5-fach
Adipositas	10-fach
Andere östrogenproduzierende Tumoren, atypische endometriale Hyperplasien	-
HNPCC	10-fach

Übernommen aus Münstedt et al. (2004)

Tabelle 1.5.: FIGO-Klassifikation des Endometriumkarzinoms

FIGO	TNM[1]	Beschreibung
-	Tx	Tumor nicht beurteilbar
-	T0	Kein Primärtumor
0	Tis	Carcinoma in situ
Ia	T1	Tumor auf Uterus begrenzt
	T1a	Tumor auf Endometrium begrenzt
Ib	T1b	Tumor infiltriert innere Hälfte des Myometriums
Ic	T1c	Tumor infiltriert äußere Hälfte des Myometriums
IIa	T2	Tumor infiltriert Zervix
	T2a	Endozervikaler Drüsenbefall
IIb	T2b	Befall des Zervixstromas
IIIa	T3	Lokale/regionale Ausbreitung über den Uterus hinaus
	T3a	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe und/oder Tumorzellen in Aszites/Peritoneallavage
IIIb	T3b	Befall der Vagina
IIIc	N1	Befall von Becken- und paraaortalen Lymphknoten
IVa	T4	Infiltration von Blasen- und Darmschleimhaut
IVb	M1	Fernmetastasen

[1]TNM-Klassifikation Sobin et al. (2011)

1.2.4. Prognostische Faktoren

Die wichtigsten prognostischen Faktoren sind der Karzinomtyp, das Grading, die Invasionstiefe in das Myometrium, der Lymphknotenbefall sowie die Zervixinfiltration (Elit 2000).

1.2.5. Klinik

Häufig bleibt das Endometriumkarzinom symptomlos, allerdings zeigt sich als Kardinalsymptom die vaginale Blutung, die bei 90 % der Fälle auftritt und besonders bei postmenopausalen Frauen untersucht werden muss (Diedrich et al. 2007). Bei prämenopausalen Patientinnen können Meno- oder Metrorrhagien auf ein Endometriumkarzinom hinweisen. Fluor und Schmerzen können Folge eines Hämato- oder Pyometra sein und so auf ein fortgeschittenes Tumorstadium hinweisen (Stauber u. Weyerstrahl 2005).

1.2.6. Diagnostik

Neben der Anamnese mit besonderem Fokus auf Blutungsstörungen, sollte bei der gynäkologischen Untersuchung vor allem auf Konsistenzveränderungen, Blut und Eiter geachtet

werden. Ein histologisch auffälliger Zervix-Abstrich kann ein Hinweis auf ein Endometriumkarzinom sein, wobei es sich dann häufig um ein fortgeschrittenes Tumorstadium handelt (DuBeshter et al. 2003). Ein wichtiges diagnostisches Instrument ist der transvaginale Ultraschall zur Ermittlung der Endometriumdicke (Gupta et al. 2002). Eine sichere Diagnose ist letztendlich jedoch nur durch eine histologische Sicherung nach Biopsie möglich (Taylor u. Gomel 1995). Zum Tumorstaging gehört anschließend eine Zystoskopie, eine Rektoskopie sowie ein CT/MRT. Als Tumormarker wird CA125 bestimmt (Münstedt et al. 2004).

1.2.7. Therapie

Bei jedem Tumorstadium steht die chirurgische Intervention an erster Stelle. Neben einer abdominellen Hysterektomie sowie Adnexektomie wird auch eine peritoneale Lavage durchgeführt. Zeigt sich in der anschließenden histologischen Untersuchung eine Invasion des Myometrium von $> 50\,\%$, wird eine pelvine und paraaortale Lymphektomie durchgeführt (Münstedt et al. 2004). Falls ein seröses oder klarzelliges Karzinom vorliegt sollte zudem eine Omentektomie erfolgen (DGGG 2011). Nach den aktuellen Empfehlungen, ist eine Strahlentherapie nur bei einem hohen Risiko für ein Lokalrezidiv oder bei einem höheren Tumorstadium, indiziert. Für die Tumorstadien I und II zeigt sich kein Überlebensvorteil durch eine Radiotherapie. Bei Patientinnen mit einem Tumortstadium IB G3 oder II G3 kann eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden. Ab Tumorstadium III wird eine platinhaltige Chemotherapie empfohlen (DGGG 2011).

1.3. Neue Therapieansätze – Zielgerichtete Therapie

Die bisherigen, klassischen Therapien der oben beschriebenen Erkrankungen haben das Outcome der betroffenen Patienten stark verbessert. Die Prognose, vor allem beim fortgeschrittenen Tumorleiden, ist mit den bisherigen Behandlungsstrategien jedoch immer noch nicht befriedigend. Auch die medikamentöse Therapie der Endometriose ist noch verbesserungswürdig. Zudem haben medikamentöse Therapien, wie oben beschrieben zum Teil starke Nebenwirkungen. So ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen unabkömmlich. Einen viel versprechenden Ansatz stellt die zielgerichtete Therapie dar. In der modernen Medizin sind zahlreiche Möglichkeiten einer zielgerichteten Therapie bekannt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Einsatz von Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF, in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie beim fortgeschrittenen Endometriumkarzinom erfolgversprechend ist (Sato et al. 2017). Auch sind die sogenannten *small molecules* ein attraktiver Ansatz. In der Arbeit von Wilczynski et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von *miRNA-205*, RNA-Moleküle, die keine genetische Information tragen, im Endometriumkarzinom mit einem verbesserten Gesamtüberleben korrelieren. Eine weitere Form der zielgerichteten Therapie ist die Gentherapie. Auch diese Therapieform basiert auf molekularen Unterschieden zwischen gesunden und erkrankten Zellen (Bauerschmitz et al. 2002). Vereinfacht gesagt werden hierbei Genprodukte in die malignen Zellen eingeschleust, die über unterschiedliche Wege zur Zerstörung oder Eindämmung des erkrankten Gewebes führen (Rein et al. 2006).

Es gibt verschiedene Ansätze für diese Therapieform, wie Mutationskompensation (Roth 2006), Suizidgentherapie (Ballestrero et al. 2008) und Immunpotenzierung (Chang et al. 2010). Besonders Hervorzuheben ist jedoch der Einsatz von onkolytischen Adenoviren oder konditional replizierender Adenoviren (CRAd's). Das humane Adenovirus Serotyp 5 eignet sich besonders gut, denn es ist genetisch modifizierbar, ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stabil und infiziert Zellen in allen Mitosestadien ohne eine schwere immunologische Reaktion auszulösen (Bauerschmitz et al. 2004). Die erkrankten Zellen werden nach Infektion mit dem Virus als Folge der viralen Replikation zerstört. Die größte Herausforderung bei der Therapie mit viralen Vektoren ist das Schonen des gesunden Gewebes, insbesondere der Leber und somit das zielgerichtete Vorgehen gegen die erkrankten Zellen. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist das transkriptionelle Targeting. Man macht sich hierbei tumorspezifische Promotoren zunutze, die im betroffenen Gewebe hochreguliert und im gesunden Gewebe wenig exprimiert sind. Die tumorspezifischen Promotoren werden vor die, für die Replikation essentiellen Gene (z. B. E1 Gen = *early replication gene 1*), der CRAd's gesetzt. (Rein et al. 2010a). Ein Beispiel für einen tumorspezifischen Promotor ist das Protein *secretory leukoprotease inhibitor* (SLPI), das unter anderem im Ovarial-, Endometrium-, Mamma- und Lungenkarzinom stark exprimiert ist (Rein et al. 2006). Gentherapeutische Ansätze gelten heutzutage vor allem malignen Erkrankungen, allerdings gibt es auch Ansätze einer solchen Therapie bei der Endometriose (Othman et al. 2008; Rein et al. 2010a). Um möglichst gewebespezifisch zu arbeiten ist die Identifikation von spezifischen Promotoren unumgänglich. Potenzielle Promotoren sind VEGF, Midkine, Heparanase, $CXCR_4$ und Survivin (Rein et al. 2006), die im Folgenden genauer vorgestellt werden.

1.3.1. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

Die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Kapillaren wird als Angiogenese bezeichnet und unterliegt der Regulation einer Reihe von Wachstumsfaktoren. Angiogenese ist in physiologische Prozesse stark involviert, beispielsweise in der Embryonalentwicklung, im Menstruationszyklus und in der Schwangerschaft (z. B. endometriales Wachstum oder Plazentation) sowie in der Wundheilung (Mueller et al. 2000). Auch für das Überleben von Tumoren, Metastasen und Endometrioseherden ist die Neubildung von Gefäßen ungemein wichtig (van der Horst et al. 2008). Schon bei einer Größe von über 2 mm würde ein Tumor untergehen, wenn es keine Neovaskularisation gäbe. Aus diesem Grund stellt die Angiogenese einen attraktiven Ansatzpunkt für die Tumortherapie dar. Die Angiogenese wird durch Hypoxie und von Onkogenen angeregt und wird sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Vorgängen durch parakrine und endokrine Mediatoren reguliert. Es handelt sich um einen sehr komplexen Vorgang, wobei es zur Degradierung von Matrixkomponenten, Proliferation und Migration von endothelialen Zellen sowie letztendlich Neubildung von Gefäßen kommt (Mueller et al. 2000). Wie schon erwähnt, zeigt auch das humane Endometrium angiogenetische Aktivität auf. Während des weiblichen Zyklus entwickeln sich die Spiralarterien und bilden die funktionelle Schicht des Endometriums. Diese Endarteriolen reagieren sensitiv auf die Geschlechtshormone. Polypeptide Wachstumsfaktoren könnten die Mediatoren der hormonellen Wirkung auf das Endometrium und schließlich auch auf

die Neubildung von Gefäße sein (Shifren et al. 1996). Auch scheint die Angiogenese eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Endometriose zu spielen. Es wird angenommen, dass nach Versprengung des endometrialen Gewebes ins Peritoneum, die Bildung neuer Blutgefäße das Überleben der Endometrioseherde und die Weiterentwicklung der Erkrankung unterstützt. Dementsprechend bietet sich auch hier eine anti-angiogenetische Therapie an. Diese zeigten in Studien z. B. mit VEGF-Antikörpern im Tiermodell eine erhöhte Nekrose-Neigung der endometrialen Läsionen (Ferrero et al. 2006). Eventuell zeigt sich hier eine neue, moderne Behandlungsoption für Betroffene.

VEGF A gehört zu der Familie der PDGF/VEGF-Wachstumsfaktoren und ist ein Heparin-bindendes, dimerisches Glykoprotein, das mit endothelialen Zellen interagiert. Zu der Familie gehören außerdem der Plazenta-Wachstumsfaktor, VEGF B, C und D, die auch alle in der Regulation der Proliferation und Funktion von Blutgefäßen involviert sind (Sharkey et al. 2000). Im Folgenden wird jedoch VEGF A beleuchtet,und mit VEGF bezeichnet. Das 45 kDa große Protein ist ein sehr potenter Wachstumsfaktor, der im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren wie z. B. *Insulin-like Growth Factor* (IGF-1) sehr spezifisch auf Endothelzellen wirkt (Ferrara und Davis-Smyth, 1997).

Durch die Interaktion mit den endothelialen Zellen kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, zur Induktion von Angiogenese und Vaskularisierung und zum Wachstum endothelialer Zellen. Außerdem wird die Zellmigration unterstützt und die Apoptose verhindert (Mueller et al. 2000). Aufgrund der Steigerung der Gefäßpermeabilität durch Induktion von vaskulären Leckstellen ist VEGF auch unter dem Namen *Vascular Permeability Factor* (VPF) bekannt (Ferrara u. Davis-Smyth 1997). Zudem scheint VEGF mit Komponenten des Immunsystems zu interagieren, da es beispielsweise die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf endothelialen Zellen fördert, wodurch die Adhäsion von natürlichen Killerzellen ermöglicht wird. Auch wurde berichtet, dass VEGF dendritische Zellen, also Antigen-präsentierende Zellen, inhibiert. Durch dieses Zusammenspiel wird vermutet, dass VEGF auch an der Proliferation und Metastasierung von Tumoren jeglicher Art beteiligt ist und dieses fördert (Ferrara u. Davis-Smyth 1997).

Hypoxie, Sexualhormone und verschiedenste Zytokine (TNF-β, IL-6, IL-1, EGF, etc.) sind maßgeblich an der Regulation der Genexpression von VEGF beteiligt (Bourlev et al. 2006). Im humanen Endometrium zeigt sich ein Anstieg der VEGF-mRNA Konzentration vor allem in der späten proliferativen und in der sekretorischen Phase und dies sowohl in glandulären, als auch in Stromazellen (Shifren et al. 1996). *In vitro* konnte ein starker Anstieg der VEGF-mRNA Konzentration in Stromazellen durch Zugabe von Östrogen gezeigt werden und so wird eine Abhängigkeit der VEGF-Expression von den Steroidhormonen angenommen. Zudem scheint es, als sei die, durch die Konstriktion der Spiralarterien bei der Menstruation, ausgelöste Hypoxie ebenfalls ein starker Anreiz für die VEGF-Expression. Hier wird eine wichtige Rolle von VEGF in den postmenstruellen Reparaturmechanismen des Endometriums angenommen (Sharkey et al. 2000). Dies wurde auch in einer weiteren Studie von Graubert et. al gezeigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Hypoxie, TGF-α, IL-1-β, als auch Östrogen und Progesteron potente Stimulatoren für die VEGF-Transkription sind und durch die erhöhte VEGF-Sekretion das Überleben und die Proliferation von endothelialen Zellen gesichert wird (Graubert et al. 2001).

VEGF scheint zudem Einfluss auf die Pathogenese der Endometriose und des Endometriumkarzinoms zu haben (García-Manero et al. 2008), daher wurde eine Untersuchung der Genexpression im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen.

1.3.2. Midkine

Midkine, auch bekannt als *neurite growth-promoting factor-2*, ist ein 13 kDa großes, heparinbindendes Polypeptid, das sich in zwei Domänen unterteilt, wobei sich das biologisch aktive Zentrum im C-terminalen Bereich befindet. Midkine wurde erstmals 1988 als Retinsäureabhängiges Gen beschrieben (O'Brien et al. 1996). Midkine gehört wie auch VEGF zur Familie der Wachstumsfaktoren und gibt Signale sowohl an neuronale als auch an endotheliale Zellen. Es kann eine hohe Expression in der Embryonal-Periode, vor allem im 2. Trimenon, gefunden werden, wobei Midkine an der Bildung von Nerven-, Epithel- und mesodermalen Gewebe beteiligt ist und das Neuritenwachstum sowie das Überleben embryonaler Nerven fördert (Iwasaki et al. 1997). Zudem ist Midkine an der Karzinogenese, der Zellmigration und der Angiogenese beteiligt und fungiert als Plasminogen-Akivator (Chung et al. 2002). Eine Dysregulation des Midkine-Signals konnte in verschiedenen entzündlichen und tumorösen Erkrankungen nachgewiesen werden. Als Modulator der Angiogenese scheint Midkine die von VEGF-A induzierte Proliferation von Kapillaren *in vitro* zu beeinflussen, in dem proangiogenetische Zytokine *down*reguliert werden und Antiangiogenesefaktoren und Gewebe-Inhibitoren der Metalloproteinase 2 hochreguliert werden (van der Horst et al. 2008). Wie schon erwähnt, ist Midkine in verschiedenen Tumoren, wie z. B. in Mamma-, Lungen-, Colon- und Ovarialkarzinom hoch exprimiert (Hirota et al. 2005). Midkine scheint die Angiogenese und Metastasierung von soliden Tumoren zu regulieren, indem die Tumorprogression durch autokrine Stimulation der Tumorzellen und/oder des rekrutierten Stromagewebe sowie Blutzellen gefördert wird (Chung et al. 2002). Daneben wird Midkine auch eine antiapototische Wirkung zugeschrieben (Tanabe et al. 2008). *In vitro* konnte in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 eine erhöhte Vaskularisierung nach Transfektion mit Midkine nachgewiesen werden (Choudhuri et al. 1997) und im Wilms-Tumor ein Schutz vor Cisplatin induzierter Apoptose (Qi et al. 2001). Allerdings ist der genaue Mechanismus, mit dem Midkine in die Tumorgenese involviert ist, weitgehend unbekannt. Im Endometriumkarzinom-Gewebe konnte eine signifikant höhere Konzentration von Midkine nachgewiesen werden, als im normalen Endometrium. Zudem korrelierte die Serumkonzentration mit der Tumorprogression und dem Lymphknotenbefall (Tanabe et al. 2008). Wie auch VEGF wird Midkine eine entscheidende Position bei der physiologischen Angiogenese während des Menstrutionszyklus zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression sowohl von VEGF als auch von Midkine unter Einfluß von 17-β-Östradiol stark ansteigt (Zhang et al. 1995). Midkine scheint auch eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von intraperitonealen Adhäsionen, was die Pathogenese der Endometriose betrifft, zu spielen. Dieses wird darauf zurückgeführt, dass Midkine direkt sowohl Makrophagen als auch Neutrophile stimuliert und somit indirekt die Sekretion von Chemokinen induziert. Dadurch werden wiederum Leukozyten rekrutiert, die Faktoren ausschütten, die die intraperitonealen Adhäsionen fördern (Inoh et al. 2004).

1.3.3. Heparanase

Heparanase ist ein 50 kDa großes, aus 543 Aminosäuren bestehendes, Protein, das als Heparansulfat-spezifische Endo-β-D-Glucoronidase fungiert. Heparansulfat-Proteoglykane sind ubiquitär vorkommende Makromoleküle, die mit Zelloberflächen und extrazellulärer Matrix assoziiert sind und mit vielen extrazellulären Matrixkomponenten, wie z. B. Kollagen, Fibronectin, Laminin und Wachstumsfaktoren interagieren. Sie sind wichtige Bestandteile von Blutgefäßen, indem sie das vaskuläre Endothel unterstützen und die Kapillarwand stabilisieren. Sie haben Einfluß auf Lokomotion und Zelladhäsion (Vlodavsky et al. 1999). Heparanase degradiert diese Proteoglykane, in dem es die Heparansulfat-Ketten depolymerisiert (Hulett et al. 1999). Eine hohe Expression von Heparanase konnte in unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen werden und scheint ein Einfluss auf das Metastasierungspotenzial zu haben (Zhang et al. 2011). So konnte Heparanase unter anderem beim malignen Melanom, beim Magenkarzinom und beim metastasierten Mammakarzinom in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Breidenbach et al. 2006). Eine weitere Eigenschaft des Enzyms ist der Einfluss auf die Angiogenese, besonders durch die Stimulation Heparin-bindender Wachstumsfaktoren und Unterstützung der Rezeptorbindung und die Signalaktivität des *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Goldshmidt et al. 2002). Auch beim Endometriumkarzinom konnte eine erhöhte Expression von Heparanase gezeigt werden. Hier scheint das Tumorstadium mit einer erhöhten Expression des Proteins zu korrelieren. Je höher die Expression, desto tiefer die Infiltration ins Myometrium (Inamine et al. 2008) und desto stärker die Metastasierung (Hasengaowa et al. 2006). Ähnlich zu den oben genannten Tumorentitäten scheint Heparanase auch hier eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression einzunehmen. Im gesunden Endometrium ist Heparanase vor allem in der späten proliferativen Phase nachzuweisen (Hasengaowa et al. 2006). Die Entwicklung der Endometriose scheint ebenfalls von dem Protein abzuhängen. Es konnte gezeigt werden, dass die Heparanase-Expression in Endometriosegewebe höher ist als im eutopen Endometrium (Jingting et al. 2008). Da Heparanase im gesunden Gewebe bis auf einige Ausnahmen wie Zytotrophoblasten, einigen lymphatischen Zellen, endothelialen Zellen und Keratinozyten, nicht nachweisbar ist (Vlodavsky et al. 2003), bietet sich das Enzym als Promoter zu zielgerichteten Gentherapie an.

1.3.4. CXCR4

Der Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4) ist ein 40 kDa großer, G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der mit dem *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), auch bekannt als CXCL12, reagiert und steuert die Zellmigration (Chemotaxis) (Kuil et al. 2012). Der CXCR4 / SDF1-Komplex reguliert Entzündungreaktionen und die Hämatopoese, in dem er Leukozyten anzieht (Cacina et al. 2012). CXCR4 ist in gesunden Zellen, wie zum Beispiel endothelialen Zellen, Astrozyten oder immunregulierenden Zellen weit verbreitet und spielt in der Embryonalperiode eine bedeutende Rolle (Balkwill 2004). Der Chemokin-Rezepter scheint auch auf die Infektion mit dem HI-Virus Einfluss zu nehmen (Feng et al. 1996). Aber auch maligne Zellen exprimieren den Rezeptor. Eine starke Expression konnte in über 20 Tumorentitäten beispielsweise im Mamma-, Ovarial-, Ösophagus- und Prostatakarzinom nachgewiesen wer-

den (Domanska et al. 2012). Hierbei scheint CXCR4 eine zentrale Rolle im Tumorwachstum und der Metastasierung einzunehmen. Die Interaktion zwischen dem Chemokinrezeptor und seinem Liganden CXCL12 scheint hier die Zellmigration zu aktivieren. CXCR4 ist dabei im Tumorgewebe höher exprimiert als sein Ligand, der dafür im gesunden Gewebe aktiviert ist. Entlang diesen Gradienten kommt es zur Zellmigration. Eine erhöhte CXCL12-Expression im Primärtumor verhindert die Tumorausbreitung, da dieser Gradient fehlt (Balkwill 2004). Im Mausmodell konnte eine Reduktion der Proliferationsrate des Mammakarzinoms, nach Inhibition von CXCR4 nachgewiesen werden (Hassan et al. 2011). Der genaue Mechanismus, der den Zusammenhang zwischen CXCR4 und dem starken Tumorwachstum erklärt, ist bis dato allerdings noch nicht bekannt (Domanska et al. 2012). Allerdings scheint CXCR4 Einfluss auf die Angiogenese zu nehmen. Es konnte eine Korrelation zwischen der Expression von CXCR4 und VEGF nachgewiesen werden (Liang et al. 2007). Die Bedeutung des Proteins auf die Pathogenese des Endometriumkarzinom ist noch nicht endgültig geklärt. Studien konnte eine erhöhte Expression von CXCR4 in Endometriumkarzinomgewebe nachweisen. Es wird vermutet, dass der Rezeptor auch in dieser Tumorentität eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Tumorausbreitung und die Metastasierung spielt (Gelmini et al. 2009; Kodama et al. 2007; Tsukamoto et al. 2007). Anders scheint es sich in der Pathogenese der Endometriose zu verhalten, hier konnte eine höhere Expression von CXCR4 im ektopen Endometrium als im eutopen Gewebe nachgewiesen werden. CXCR4 scheint hier die Invasion der endometrialen Zellen außerhalb des Uterus zu gewährleisten (Ruiz et al. 2010). Im gesunden Endometrium zeigte sich eine erhöhte Expression von CXCR4 in der frühen proliferativen Phase, während der Ligand SDF1 keine Schwankung der Expression in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus aufwies (Laird et al. 2011).

1.3.5. Survivin

Survivin gehört zur Gruppe der Apoptose inhibierenden Proteinen *Inhibitors of apoptosis protein* (IAP) und ist auch unter dem Namen *baculoviral IAP repeat-containing 5* (BIRC 5) bekannt. Das Protein hat sowohl in physiologischen Prozessen des Organismus als auch in der Tumorgenese bedeutenden Einfluss. So konnte Survivin eine wichtige Rolle in der Embryonalperiode zugeschrieben werden, und zwar besonders in der embryonalen Mitose, Zytokinese und Apoptose (Li u. Brattain 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Survivin und dessen Spleißvarianten in der unbefruchteten Oozyte bis hin zum Blastozystenstadium exprimiert wird (Kawamura et al. 2003). Behandelt man Mausembryonen mit Survivin-Antisense-Oligonukleotiden, so bleiben diese Embryonen in dem Morula- oder im Blastozysten-Stadium und es kommt zur Unterbrechung der Tubulin-Polymerisation und zu abnormalen Zellkernen (Hardy 1999). In der Embryonalperiode ist Survivin nur in der Mitte des Zentromers der Chromosomen lokalisiert, im Tumorgewebe allerdings zusätzlich in Mitose-Spindeln und Mitochondrien (Dohi et al. 2004). Auch mit hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen interagiert Survivin, in dem es den Eintritt in den Zellzyklus, die Proliferation, die Reifung fördert und die Apoptose verhindert (Li u. Brattain 2006). In differenzierten und gesunden adulten Gewebe ist Survivin bis dato nicht nachgewiesen

worden (Altieri et al. 1999). Dies trifft jedoch nicht für das Endometrium zu. Es konnte eine erhöhte Expression von Survivin in der sekretorischen Phase, weniger jedoch in der proliferativen Phase, und nur im glandulären Gewebe gemessen werden. Dieses lässt darauf schließen, dass Survivin eine entscheidende Position in der Hämostase des normalen Endometriums einnimmt (Konno et al. 2000). Es wird zudem angenommen, dass Survivin mit der Progesteron-Ausschüttung korreliert (Li u. Brattain 2006). Der Mechanismus der Apoptoseinhibition konnte *in vitro* gezeigt werden. Das Protein bindet an die Caspase 3 und 7, verhindert somit deren Aktivität und schützt die Zellen vor dem programmierten Zelltod, obwohl sie Apoptose-Stimuli ausgesetzt sind (Tamm et al. 1998). Zudem konnten auch Interaktionen mit Fas/Fas L sowie einigen Krebstherapeutika analysiert werden. Während des Zellzyklus zeigt sich eine erhöhte Expression vor allem in der G2/M-Phase (Ai et al. 2006). Aufgrund dieser Mechanismen ist eine Beteiligung Survivins an der Tumorgenese leicht nachzuvollziehen. Eine Überexpression von Survivin wurde in verschiedensten humanen Karzinomen, wie z. B. in Lungen-, Magen-, Leber- und Ovarialkarzinom nachgewiesen (Altieri et al. 1999) und wird mit gesteigerter Aggressivität des Tumor und verminderter Überlebensdauer von Patienten in Verbindung gebracht (Tanaka et al. 2000). Für das Melanom (Grossman et al. 2001) und das Lungenkarzinom (Olie et al. 2000) konnte durch eine Inhibition der Survivin-Expression erreicht werden, dass die malignen Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden und den programmierten Zelltod eingehen. Auch im Endometriumkarzinom konnte eine stärkere Expression von Survivin gezeigt werden. Survivin scheint dabei sowohl die Zellproliferation und Zellzyklusprogression zu fördern, als auch die Apoptose zu inhibieren. Zur Verhinderung des weiteren Tumorwachstums kam es, nachdem die Survivin-Expression gehemmt wurde (Ai et al. 2006). Apoptose spielt auch in der Pathogenese der Endometriose eine wichtige Rolle. Allerdings ist der Mechanismus, mit dem die versprengten Endometrioseherde gegen die Apoptose bestehen können, weiterhin unklar. Allerdings konnte eine erhöhte Expression von Survivin in pigmentierten Endometrioseherden nachgewiesen werden. Dieses würde zwar die Apoptoseresistenz und die Invasion ansatzweise erklären, jedoch sind die genauen Interaktionen weiterhin unklar (Ueda et al. 2002). In roten Endometrioseherden konnte eine höhere mRNA-Expression von Survivin als in schwarzen Läsionen nachgewiesen werden(Fujino et al. 2006). Die roten Läsionen scheinen eine erhöhte Proliferationsrate aufzuzeigen und entstehen direkt nach der Versprengung des Gewebes in die Peritonealhöhle (Donnez et al. 1998). So könnte Survivin die Invasion der Herde erleichtern, indem es die Zellen vor dem programmierten Zelltod schützt (Fujino et al. 2006). Die erhöhte Survivin-Expression könnte durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokinen induziert werden, da die peritoneale Umgebung bei Patienten mit Endometriose stark verändert ist (Gebel et al. 1998). Die verschiedenen Studien legen nahe, dass Survivin einen bedeutenden Einfluss auf die Pathogenese der Endometriose hat, der aber noch weitestgehend unklar ist (Ueda et al. 2002).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit war Teil eines übergeordneten Forschungsprojektes zur Entwicklung einer zielgerichteten Therapie im Bereich Endometriose und Endometriumkarzinom. Um dies zu realisieren, ist es unabkömmlich das Genexpressionsmuster der Erkrankungen zu untersuchen, um mögliche Zielstrukturen zu identifizieren. Die folgenden Experimente untersuchen die Genexpression von VEGF, Midkine, Heparanase, CXCR4 und Survivin in Endometriose-, Endometriumkarzinom- und Endometriumproben. Im Anschluss wird die Expression des jeweiligen Genprodukts immunhistochemisch untersucht. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Gibt es im Vergleich zwischen den einzelnen Gewebe signifikante Expressionsunterschiede der beschriebenen Gene?
- Gibt es Ähnlichkeiten in der Genexpression zwischen Endometriose und Endometriumkarzinom?
- Gibt es Übereinstimmung zwischen der Genexpression und dem jeweiligen immunhistochemischen Proteinnachweis?
- In wie weit korrelieren die Ergebnissen mit bisherigen Studien zu dem Thema?
- In wie weit lassen sich die Gene als Zielgen in einer möglichen *targeted*-Therapie einsetzen?

KAPITEL 2

Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Gewebe

Das für die Experimente genutzte Gewebematerial wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. David Curiel, Gene Therapy Center der University of Alabama at Birmingham / USA zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Material, welches in den USA für Forschungszwecke tiefgekühlt archiviert wurde. Die zur Verfügung gestellten Proben beinhalten 45 Endometrioseproben, 17 Endometriumproben und bereits isolierte RNA aus 27 Endometriumkarzinomproben. Die Proben waren vollkommen anonymisiert, also ohne jeglichen Zusatz personenbezogener Daten.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Im Verlauf der weiteren Experimente werden Kontrollzelllinien benötigt. Hierbei handelt es sich um humane Tumorzellen der Zelllinien HeLa (Zervixkarzinom) sowie MDA-MB 231 (Mammakarzinom), die freundlicherweise vom molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf zur Vefügung gestellt wurden.

Die Arbeiten mit den Zellkulturen verliefen unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Zellen wurden bis zum subkonfluenten Wachstum in sterilen 250 ml bzw. 500 ml Gewebekulturflaschen mit 10 ml bzw. 20 ml Medium kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche ausgetauscht. Hierzu wurde das alte Medium mittels steriler Pipette abgenommen und neues, 60 min bei 37 °C im Wasserbad, vorgeheiztes Medium zugefügt. Das Medium wurde durch 50 ml fötalen Kälberserums sowie 500 µl Gentamycin ergänzt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit 5 ml PBS gespült und mit 5 ml 1:10 verdünnten Trypsin für 5 min inkubiert. Nach dem Ablösevorgang wurde die gleiche Menge an Kulturmedium zugeführt. Das darin enthaltende fötale Kälberserum inhibiert das Trypsin. Die abglösten Zellen werden in Falcon Tubes überführt und zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets werden mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt.

Mittels wiederholten Aufziehens durch eine Kanüle (0,8 mm × 40 mm) werden die Zellen zum Zählen vereinzelt. Die Zellzählung erfolgt mittels Doppelbestimmungen in der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde die mit Trypanblau verdünnte Zellsuspension in die Zählkammer aufgetragen und vier Gruppenquadrate ausgezählt. Der Zelltiter berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Flächeneinheiten}}\ (\text{mm}^2) \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung} = \text{Zellen/µl}$$

Ihrem Wachstum entsprechend wurden die Zellen neu ausgesät. Die sedimentierten Zellen konnten nach Resuspension in Kryoröhrchen bei −20 °C eingefroren werden. Zur Langzeitaufbewahrung wurde flüssiger Stickstoff verwand.

Die, für die Zellkultur verwandten Materialien sind in den Tabellen 2.1 bis 2.2 auf den Seiten 20–21 aufgeführt.

2.2.2. Molekulargenetische Methoden

RNA-Isolation

Die RNA-Gewinnung aus dem Gewebe bzw. der Zellen erfolgte nach der Methode mit TRIzol (GIBCO). Dieses Verfahren beruht auf einer monophasischen Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung, die während des Homogenisierens und der Lyse des Gewebes die Integrität der RNA schützt. Die Methode ist eine Weiterenwicklung der Methode nach Chomczynski u. Sacchi (1987).

Um einen Abbau der RNA durch RNAsen zu vemeiden wurden alle verwendeten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat behandelt. Hierzu wurde DEPC im Verhältnis 1:10 mit absolutem

Tabelle 2.1.: Zellkultur – Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	**Herstellerangaben**
Standardkulturmedium DMEM	Invitrogen, Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
L-Glutamin 20 mM	Invitrogen, Gibco
Gentamycin 50 µg/ml	Invitrogen, Gibco
Foetal Calf/Bovin Serum (FCS), 500 ml	Mycoplex, A 15-773 (PAA)
Trypsinlösung	Sigma
PBS Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH, Austria
Formaldehyd (37 %, v/v)	Merck
Trypanblau	Merck
Kochsalzlösung (NaCl)	Merck

Tabelle 2.2.: Zellkultur – Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Herstellerangaben
Gewebekulturflaschen 250 ml, 500 ml	Cellstar®, Greiner bio-one
Kryoröhrchen	Cellstar®, Greiner bio-one
Sterile Einmalpipetten	Greiner bio-one
Falcon-Tubes 15 ml, 50 ml	Cellstar®, Greiner bio-one
Eppendorfröhrchen	Eppendorf
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Wasserbad	Lauda
Mikroskop	Wilovert®
Sterilbank	Clean Air
Zentrifuge	Megafuge1.0, Heraeus
Digitalkamera	DXM 1000, Nikon

Ethanol gemischt, im Verhältnis 1:100 den Lösungen zugesetzt und die Lösung nach Inkubation bei 37 °C über Nacht autoklaviert.

Die bei −80 °C tiefgefrorenen Gewebeproben wurden zunächst mit einem Skalpell auf Trockeneis zerkleinert und in, zuvor für mindestens 30 min in 100%iger Ethanollösung gereinigte, Teflonkapseln gefüllt. Um ein Auftauen zu verhindern, wurde die Kapsel in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wurde das Gewebe in der Kapsel mittels Dismembrator bei 2 000 r/min für 1 min zerkleinert. Die so gewonnene homogene Masse wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurde 1 ml TRIzol dazugegeben und das Gewebe somit lysiert. Dieses lysierte Gewebe konnte dann entweder zur RNA-Isolation weiter verwand werden oder bei −80 °C für mehrere Wochen eingelagert werden.

Tabelle 2.3.: RNA-Isolation – Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	Herstellerangaben
TRIzol	Gibco, Karlsruhe
Chloroform	Sigma
Isopropanol	Merck
75 % Ethanol	eigene Herstellung
Aqua dest. (DEPC behandelt)	Merck
Flüssiger Stickstoff	
Trockeneis	

Tabelle 2.4.: RNA-Isolation – Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Herstellerangaben
Dismembrator	Sartorius
Teflonkapsel	Sartorius
Wolframkugeln, 10 mm	Braun, Biotech int.
Einmalskalpell	Feather
Zentrifuge	Eppendorf-Neatheler-Hinz GmbH
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
Heizblock	SHT2D (Stuart Scientific)
Sterile Einmalpipetten	Eppendorf
Sterile Eppendorfgefäße	Eppendorf

Die Proben wurden dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu ermöglichen. Nach der Zugabe von 200 µl Ethanol, vorsichtiger Durchmischung per Hand und kurzer Inkubation von 2–3 min bei Raumtemperatur, wurden die Proben für 15 min bei +4 °C mit 12 000 r/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entstanden 3 Phasen: eine rote Unterphase aus Chloroform und TRIzol, eine proteinhaltige Interphase und eine RNA-haltige, farblose Oberphase. Das Volumen der Oberphase entsprach ca. 60 % der eingesetzten TRIzol-Menge, also etwa 600 µl. Die farblose Oberphase wurde mittels steriler Pipette in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol, wurde die Probe mehrmals vorsichtig vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurden die Proben für 10 min bei 4 °C mit 12 000 r/min zentrifugiert. Dabei präzipierte die RNA zu einem gelartigen Pellet. War nach 10minütiger Zentrifugation noch kein Pellet sichtbar, wurde erneut für 30 min zentrifugiert. Im Anschluß wurde die RNA gewaschen. Zunächst wurde der Überstand, der jederzeit auf Eis gekühlten Proben, abgenommen und 1 ml 75%iger, eisgekühlter Ethanollösung dazugegeben. Es schloss sich eine weitere Zentrifugier-Phase von 5 min bei 4 °C mit 9 500 r/min an. Danach wurde das Ethanol vollständig entfernt und die Proben im Thermoblock bei 55 °C getrocknet. Die RNA wurde dann in ca. 60 µl Aqua dest. gelöst und weitere 10 min bei 55 °C im Thermoblock inkubiert. Um die RNA aus den oben genannten Zellkulturen zu gewinnen, wurde das gleiche Verfahren ab der Zugabe des TRIzols angewandt.

2.2.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die gewonnene RNA wurde mittels Aqua dest. 1:10 verdünnt. Es erfolgte dann die Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Spektralphotometer nach Lambert-Beer bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem NanoDrop ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Zudem wurde der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260 nm/280 nm bestimmt, der optimal im Bereich zwischen 1,7 bis 2,0 liegen sollte und

eine Reinheitskontrolle darstellt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich die Konzentration der Nukleinsäuren aus folgender Formel:

$$C = E \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{d}$$

(C: Konzentration in mg/ml; E: Extinktion bei 260 nm; ε: molarer Extinktionskoeffizient; d: Schichtdicke der Küvette = 1 cm).

Die Tabellen 2.3 bis 2.4 auf den Seiten 21–22 führen die zur RNA-Isolation verwandten Materialien auf.

2.2.4. cDNA-Synthese

Die isolierte Gesamt-RNA aus dem Gewebe sowie aus den gezüchteten Zellen wurde mittels reverser Transkriptase (OmniSkript RT-Kit, Qiagen) und Random-Primern (Hexaoligonukleotide) in cDNA umgeschrieben. Durch die Verwendung unspezifischer Random-Primer wird es ermöglicht, die gesamte RNA-Population zu erfassen und ausgehend von einer einzigen cDNA-Synthese mehrere Transkripte im Anschluss gleichzeitig zu untersuchen und zu quantifizieren. Dazu wurde pro Ansatz der photometrisch erfassten Konzentration die RNA auf ein Endvolumen von 12,5 µl mit RNAse freiem Wasser aufgefüllt und bei 65 °C für 5 min im Thermocycler Omnigene (Hybaid) denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zu der vorbereiteten RNA wurde 7,25 µl des Mastermix gemäß Tabelle 2.5 zugesetzt.

Nach kurzem Vortexen von 5 s und Abzentrifugation wurden die Proben im Thermocycler Omnigene für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und mit anschließender Inaktivierung der reversen Transkriptase für 5 min bei 95 °C. Die Proben wurden nach Abkühlung auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung bei −80 °C gelagert.

2.2.5. PCR

Mit Hilfe der PCR können gezielt spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Das Prinzip basiert auf drei sich wiederholenden Reaktionsschritten. Zunächst werden die vorhandenden DNA-Stränge aufgetrennt (Denaturierung), im Anschluss erfolgt die Bindung

Tabelle 2.5.: Mastermix cDNA-Synthese

Substanz	**Menge/[µl]**
10-Puffer	2,00
dNTP-Mix	2,00
RandomPrimer	2,00
Omniscript RT	1,00
RNAsin	0,25

der Oligonukleotidprimer an die DNA-Einzelstränge (Annealing), im letzten Schritt entsteht dann erneut doppelsträngige DNA (Elongation).

Qualitätskontrolle der cDNA durch β-Aktin-RT-PCR

Die synthetisierte cDNA wurde auf ihre Qualität und Kontamination mit genomischer DNA untersucht, bevor sie in der *real-time quantitative* PCR (qPCR) weiterverarbeitet wurde. Da sich β-Aktin in allen humanen Zellen nachweisen lässt, eignet sich diese Methode besonders gut zur Qualitätssicherung. Die Arbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die bei −80 °C tiefgekühlte cDNA wurde langsam auf Eis aufgetaut und anschließend abzentrifugiert. Da die cDNA in einer 1:5 Verdünnung als Template eingesetzt werden musste, wurde die cDNA entsprechend mit Aqua dest. verdünnt.

Das Template wurde dann mit 43 µl Mastermix sowie 5 µl Taq-Mix versetzt (s. Tab. 2.6 bis 2.7 auf dieser Seite). Das Reaktionsvolumen für eine PCR betrug stets 50 µl. Für die PCR wurde ein Hybaid OmniGene PCR-Cycler benutzt.

Um unerwünschte Amplifikations-Produkte zu vermeiden, wurde eine HotStar Taq-Polymerase eingesetzt, die bei Raumtemperatur inaktiv ist und erst bei einer Inkubation bei 95 °C aktiviert wird. Die eingesetzten Primer wurden so gewählt, dass sich die genomische DNA in der anschließenden Gelelektrophorese von den cDNA-Fragmenten unterscheiden lässt (s. Tab. 2.8 auf der nächsten Seite). Aufgrund zusätzlicher Intronsequenzen zeigt genomische DNA dann ein größeres Fragment (653 bp) als die cDNA (446 bp).

Der entstandene PCR-Ansatz durchlief nach kurzer Abzentrifugation im Hybaid OmniGene PCR-Cycler für 27 Zyklen das in Tabelle 2.9 auf der nächsten Seite dargestellte Programm. Anschließend wurden die Proben bei ca. 5 °C gekühlt.

Tabelle 2.6.: Mastermix β-Aktin-RT-PCR

Substanz	Menge
Aqua dest	29,5 µl
Puffer 10 ×	4,5 µl
Primer 3′	2,5 µl
Primer 5′	2,5 µl
dNTPs	4,0 µl

Tabelle 2.7.: Taq-Mix

Substanz	Menge
Aqua dest.	4,0 µl
Puffer 10 ×	0,5 µl
Taq-Polymerase	5,0 µl

Tabelle 2.8.: β-Aktin cDNA-Kontrolle

Amplifizierte DNA	Basensequenz
β-Aktin forward	5′-AGAGATGGCCACGGCTGCTT-3′
β-Aktin reverse	5′-ATTTGCGGTGGACGATGGAG-3′

Tabelle 2.9.: Reaktionsbedingungen β-Aktin-RT-PCR

Temp.	Zeit	Reaktionsschritt
95 °C	15 min	Aktivierung der Taq-Poymerase
94 °C	1 min	**Denaturierung:** Auftrennung der doppelsträngigen DNA
62 °C	1 min	**Primerhybridisierung:** Anlagerung der Primer an die DNA
72 °C	1 min	**Elongation:** Anlagerung der freien Nukleotiden

2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Herstellung eines Agarose-Gels

Die PCR-Produkte wurden später auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurde zunächst 50 ml 1 × TBE-Puffer mit 0,75 g Agarose gemischt und die Agarose durch Erhitzung in der Mikrowelle aufgelöst. Anschließend wurde das Gemisch nochmals gewogen und die Gewichtsdifferenz mit Aqua dest. aufgefüllt. Wenn sich die gesamte Agarose mit dem Puffer verbunden hat, wurde die Flüssigkeit in eine Agarose-Gelelektrophorese-Kammer (GibcoBrl) gefüllt und ein Gel-Kamm eingeführt, um Taschen zum Einfüllen der PCR-Produkte zu bekommen. Das Gel härtete ca. 60 min aus und der Kamm wurde wieder entfernt. Anschließend wurde das Gel mit 5 × TBE-Puffer übergossen.

Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld aufgrund ihres Phosphatbestandteils zur Anode. Da kleinere DNA-Fragemente im siebartigen Agarose-Gel schneller in Richtung Anode wandern, gelingt die Auftrennung in kleinere und größere Fragmente. Wie bereits erwähnt hat genomische DNA aufgrund zusätzlicher Intronsequenzen ein größeres Fragment (653 bp) als die kleineren cDNA-Fragmente (446 bp), sodass bei Auftragen des PCR-Produktes und Aktivierung des elektrischen Feldes eine Verunreinigung der gewonnen cDNA mit genomischen Komponenten deutlich wird.

Es wurde ein Probenvolumen von 5–10 µl in die vorher entstandenen Taschen gefüllt. Um die Proben sichtbar zu machen, wurden sie vor dem Auftragen mit einem SB-Probenpuffer vermischt. Zur Fragmentgrößenbestimmung wurde auf jedem Gel ein SmartLadder-Grö-

ßenstandard (Eurogenetic) mitgeführt. Nach dem Auftragen wurde unter Verwendung eines PowerPac 300 Power Supply (Bio-Rad) eine Spannung von initial maximal 90 V für ca. 15 min, anschließend von 110 V für weitere 60–90 min angelegt. Im Anschluss daran mussten die Gele für mindestens 30 min mit einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) inkubiert werden.

Die DNA-Fragmente wurden dann unter UV-Licht (λ= 312 nm) aufgrund des zwischen den Basenpaaren interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar. Das entstandene Bild wurde dann für die Dokumentation mit einer Kamera aufgenommen. Falls sich Verunreinigungen fanden oder keine cDNA vorhanden war, mussten die Experimente bis zu dieser Stelle wiederholt werden.

Die, für die Gelelektrophorese verwendeten, Materialien sind in den Tabellen 2.10 bis 2.11 auf den Seiten 27–28 aufgeführt.

2.2.7. *Real-time quantitative* PCR (qPCR)

Real-time quantitative PCR zum Nachweis von Unterschieden in der Genexpression

Um die Expressionsunterschiede der zu untersuchenden Gene im Endometrium, endometriotischen Läsionen sowie Karzinom-verändertem Gewebe zu untersuchen, wurde eine quantitative qPCR durchgeführt.

Grundlagen der *real-time quantitative* PCR

Mit der qPCR lässt sich synthetisierte DNA quantifizieren. Die DNA-Synthese wird mittels fluoreszierender Substanzen in Echtzeit nachvollzogen. Die zu messende Fluoreszenz verhält sich proportional zum PCR-Produkt, sodass die Ausgangskonzentration des Zielgens ermittelt werden kann. Zur Fluoreszenzdetektion wurde in den folgenden Versuchen der Farbstoff SYBR-Green verwandt. Der Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA.

Der asymmetrische Cyanin-Farbstoff SYBR-Green absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{max} = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{max} = 521$ nm. Weitere, wenn auch deutlich schwächere, Absorptionsmaxima liegen im UV-Bereich bei 284 nm und 382 nm, daher muss der Farbstoff stets vor Licht geschützt werden.

Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass sich SYBR-Green unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert. Daher muss eine eindeutige Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer DNA erfolgen, dies geschieht mittels Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wird überprüft, ob es zu einem oder zu mehreren PCR-Produkten gekommen ist. Die Temperatur wird langsam kontinuierlich erhöht, von 50 °C auf 95 °C mit 0,1 °C/s bis 0,2 °C/s. Bei einer für ein DNA-Fragment spezifischen Temperatur, denaturiert die DNA und wird in zwei Einzelstränge aufgespalten. Dabei wird der Farbstoff SYBR-Green freigesetzt. Spezifische DNA-Fragmente haben eine höhere Schmelztemperatur als unspezifische DNA-Fragmente, sodass eine Unterscheidung möglich wird. Automatisch wurde stets nach dem letzten PCR-Zyklus eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Qia 2006).

Tabelle 2.10.: Gelelektrophorese – Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	**Herstellerangaben**
Omniscript/Sensiscript-RT-Kit	Qiagen, Hilden
dNTP	Roche
DNA-Puffer	Eigene Herstellung:
	100 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl pH 8
	25 mM EDTA pH 8
	0,5 % SDS
RNAse-freies Wasser	Merck
Taq-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Agarose	Invitogen
Ethidiumbromid	Sigma
SB-Probenpuffer	Eigene Herstellung:
	7 M Harnstoff
	40 % Glycerin
	50 mM EDTA
	10 mM TRIS
	0,1 % Glycerin, pH 8
TBE (1 ×)	Eigene Herstellung:
	0,2 M Tris
	0,17 M Borsäure
	2 mM EDTA, pH 8
TBE (5 ×)	Eigene Herstellung:
	1,0 M Tris
	0,85 M Borsäure
	10 mM EDTA, pH 8

Tabelle 2.11.: Geräte und Materialien für die Gelelektrophorese

Geräte und Materialien	Herstellerangaben
Thermocycler Omnigene	Hybaid
Schüttler Vortex Genie2	Heidolph
Tischzentrifuge	Eppendorf
Sterilbank	Clean Air, Hilden
PCR-Cycler	Hybaid Omnigene
UV-Tisch N90 MW 312 nm	Faust
Waage LG 10 D	Sartorius
Mikrowellengerät	Bosch
Agarose- Gelelektrophorese- Kammer	GibcoBrl
Sterile Einmalpipetten	Eppendorf
Sterile Gefäße	Eppendorf

Um synthetisierte DNA zu quantifizieren, macht man sich den C_T-Wert (*threshold cycle* = Schwellenwert-Zyklus) zunutze. Der C_T-Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant ansteigt. Bis zu diesem Zeitpunkt wird das PCR-Produkt noch exponentiell vermehrt. Der C_T-Wert wird für die anschließende Auswertung genutzt. Je niedriger der C_T-Wert, desto höher ist die Konzentration der eingesetzten cDNA.

Nun lässt sich die Konzentration des Zielgens entweder relativ oder absolut quantifizieren. Bei der absoluten Quanitifizierung macht man sich einen externen Standard zunutze. Bei der relativen Quantifizierung bezieht man sich auf ein Housekeeping-Gen, dessen Konzentration in den entsprechenden Geweben bzw. Zellen als konstant angenommen wird. Dieses Verfahren wurde auch in den folgenden Versuchen angewandt. Als internes Kontrollgen (*housekeeping*-Gen), wurde in den folgenden Versuchen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwandt, da es ubiquitär vorkommt. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat.

Zur relativen Quantifizierung wurde die vergleichende C_T-Methode herangezogen. Hierbei subtrahiert man den gemessenen C_T-Wert des *housekeeping*-Gens jeder einzelnen Probe von dem gemessenen C_T-Wert des Zielgens und erhält den ΔC_T-Wert. Nun wird die Expressionsstärke des jeweiligen Gens mit einem Kalibrator verglichen. Hierbei wurden in diesem Fall Kontrollzelllinien verwandt, bei denen durch vorherige Testung sichergestellt wurde, dass die entsprechende Gene ausreichend exprimiert werden.

Um den $\Delta\Delta C_T$-Wert zu erlangen, wurde also der ΔC_T-Wert des Kalibrators von dem ΔC_T-Wert der Probe abgezogen.Die relative Genexpression erhält man nun über die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Hierbei wurden stets die Mittelwerte der C_T-Werte verwandt, da die Proben mindestens im Duplikat getestet wurden (Bio 2004).

Etablierung

Zunächst musste die Effizienz der PCR-Reaktionen untersucht werden. Als Template wurde hier die, aus der RNA der Kontrollzellinien MDA-MB 231 und HeLa synthetisierte, cDNA eingesetzt. Für diese Zelllinien konnte in der Literatur eine hohe Expression der Zielgene experimentell nachgewiesen werden. Die cDNA wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (1:5, 1:50, 1:500, 1:500).

Im Anschluss wurde aus den gemessenen Ergebnissen eine Standardkurve erstellt. Hierbei wurde der negative Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge gegen den gemessenen C_T-Wert aufgetragen und hieraus die Steigung der Geraden $m = \frac{y-b}{x}$ extrapoliert. Eine Steigung von $-3{,}32$ steht für eine Effizienz von 100 %, dass heißt das PCR-Produkt hat sich pro Zyklus verdoppelt. Steigungen negativer als $-3{,}32$ würden eine geringere Effizienz bedeuten, Steigungen positiver als $-3{,}32$ bedeuten eine Effizienz größer als 100 %. Letzteres zeigt Probleme bei dem Versuchsablauf, z. B. unsauberes Pipettieren oder eine schlechte Qualität der eingesetzten Probe an.

Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden entsprechend der Herstellerangaben (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Proben mit den genspezifischen Primern sowie mit dem Farbstoff SYBR-Green versetzt. Das Reaktionsvolumen betrug stets 20 µl, wovon 18 µl MasterMix (siehe Tabelle 2.12 auf der nächsten Seite) auf 2 µl Template-cDNA kommen. Die Reaktionsansätze wurden, wie oben erwähnt stets vor Licht geschützt. Jede Gewebeprobe wurde mindestens im Duplikat getestet, um einem Fehler durch Varianzen vorzubeugen. Die PCR-Durchläufe wurden in einem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) auf einer 96 well-Platte (96-well optical reaction plate, Applied Biosystems) mit optischen Deckeln (MicroAmp optical caps, Applied Biosystems) durchgeführt. Bei diesem Gerät handelt es sich um einen Thermocyler für PCR-Reaktionen, der zusätzlich mit einem Laser ausgestattet ist, der die Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR-Green anregt. Die Messung der Fluoreszenzstärke erfolgt durch einen CCD-Detektor (*charged-coupled-device*). Während eines PCR-Durchlaufs akkumuliert das PCR-Produkt und damit die Menge des gebundenen SYBR-Greens. In den Tabellen 2.12 bis 2.14 auf der nächsten Seite werden die verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt.

Tabelle 2.12.: MasterMix SYBR-Green

	Vol. [µl]	**PCR Bedingungen**
Gesamtreaktions-volumen	20	HotGoldStar-Aktivierung 95 °C → 15 min
SYBR Green	10	Denaturierung 94 °C → 15 s
Primer	2	Annealing 55 °C → 30 s
H_2O (RNAse-frei)	6	Extensin 72 °C → 30 s
Template	2	40 Zyklen

Tabelle 2.13.: *Real-time quantitative* PCR (qPCR) – Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	**Herstellerangaben**
Quanti Tect Primer Assay für	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen, Hilden
RNAse-freies Wasser	Merck

Tabelle 2.14.: *Real-time quantitative* PCR (qPCR) – Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	**Herstellerangaben**
Optical Tube	Applied Biosystems
Optical-8-Strip	Applied Biosystems
ABI Prism® 7900 Sequence Detection Systems	Applied Biosystems
Sterile Pipetten	Eppendorf

2.3. Immunhistochemie

Durch immunhistochemische Färbungen können die entsprechenden Genprodukte (Proteine) im Gewebe nachgewiesen werden. Da die noch vorhandenen Gewebeproben in geringer Quantität vorlagen, wurden statt Paraffinschnitte, Gefrierschnitte hergestellt. Bei den molekulargenetisch untersuchten Endometriumkarzinomen war bereits die RNA vorhanden, diese Proben wurden von der Immunhistochemie ausgeschlossen. Zudem waren nicht mehr bei allen Endometriose- und Endometrium-Proben Gewebe vorhanden. Aufgrund der geringen Gewebemengen wurde auf die Untersuchung des Proteins $CXCR_4$ verzichtet. Zusätzlich zu den Zielmarkern wurde auch eine Untersuchung hinsichtlich des Progesteron- sowie Östrogenrezeptors durchgeführt. Da es sich um hormonsensitives Gewebe handelt, ist von einem positiven Ergebniss auszugehen. Um die Qualität der Gewebeproben zu verifizieren wurden alle Gefrierschnitte mit Hämotoxylin-Eosin angefärbt und anschließend mikroskopiert. Proben die zu wenig Gewebe aufwiesen wurden von der Immunhistochemie ausgeschlossen.

2.3.1. Hämotoxylin-Eosin-Färbung

Von dem tiefgefrorenen Gewebe wurden mittels Rotationsmikrotom 4–5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger aufgetragen. Die Kernfärbung erfolgte mittels Mayer's Hämalaun für 10 Minuten, anschließendes kurzes Spülen in Aqua dest. und Bläuen in warmem Leitungswasser für weitere 10 Minuten. Das Zytoplasma wurde zunächst mit einer 1%igen Eosin-Lösung für 3 min angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte erneut in Aqua dest. gespült und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Die gefärbten Präparate wurden mit Eukitt eingedickt und anschließend am Phasenkontrast-Mikroskop ausgewertet.

2.3.2. *Labelled* (Strept-)Avidin-Biotin (LSAB)-Methode

Die immunhistochemische Färbung wurde mittels der LSAB-Methode durchgeführt, die auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin zu Biotin beruht. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykopeptid mit vier Bindungsstellen für Biotin. Da es bei der Verwendung von Avidin zum Teil zu unspezifischen Reaktionen gekommen ist, gewinnt man heute ein reineres Produkt, Streptavidin, welches man aus dem Bakterium Streptomyces avidinii isoliert.

Mit dem Primärantikörper reagiert ein, mit Biotin markierter Brückenantikörper. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin, das sich gut an Brückenantikörper koppeln lässt. So wird schließlich eine Verbindung zum Streptavidin-Enzymkonjugat-Komplex hergestellt, welcher im dritten Schritt hergestellt wird. Mit Hilfe einer chromogenen Substratlösung wird der Primärantikörper sichtbar gemacht. Durch Zugabe des Substrats Diamnobenzidin (DAB) entsteht ein braunes Reaktionsprodukt, das lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann.

2.3.3. Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Die Gewebeschnitte werden zunächst auf Objektträger gezogen und bei −20 °C gefroren. Die Schnitte wurden mit Formalin für 2 Minuten fixiert. Anschließend werden die Objektträger mit Leitungswasser gespült. Die Proben werden anschließend jeweils 15 Minuten mit Avidin, das mit endogenem Biotin reagiert, und im Anschluss mit Biotin inkubiert und nach jedem Schritt für 10 Minuten mit Leitungswasser und anschließend mit Triton-Aqua.dest. gespült. Es erfolgt die 30minütige Inkubation mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur. Nach erneutem Spülen mit Leitungswasser und Triton-A. dest. erfolgte die 15minütige Inkubation mit dem jeweiligen polyklonalen Sekundärantikörper. In gleicher Weise erfolgt die Inkubation mit dem Tertiärreagenz, Streptavidin, welches mit H_2O_2 konjugiert und so die Antigen-Antikörperreaktion erkennbar macht. Im Anschluss erfolgt die Zugabe des Diaminbenzidins, das nach Herstellergaben zubereitet wurde, für weitere 10 Minuten. Nach erneuter Spülung mit Leitungswasser erfolgt die Gegenfärbung mit Hämalaun für 2 Sekunden. Abschließend werden die Schnitte erneut gespült und mit Eukid haltbar gemacht.

2.3.4. Mikroskopische Auswertung

Die Proben wurden lichtmikroskopisch ausgewertet und fotographisch dokumentiert. Als Positivkontrolle dienten Gewebeschnitte des Mammakarzinoms, die freundlicherweise von der Universitätsfrauenklinik zur Verfügung gestellt wurden.

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte nach Remmele u. Stegner (1987). Hierbei handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren, bei dem zum einen der prozentuale Anteil des gefärbten Gewebes, zum anderen die Intensität der Färbung bewertet wird. Entsprechend der subjektiven Bewertung werden für jedes Item Punkte vergeben. Die Farbintensität (*staining intensity*) (SI) wird in drei Kategorien eingeteilt – keine Färbung (0), schwache Färbung (1), mäßige Färbung (2), starke Färbung (3). Der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen (*percentage of positive cells* PP) wird wie folgt bewertet: 0 – keine Färbung, 1 – weniger als 10 %, 2 – mehr als 10 %, aber weniger als 50 %, 3 – weniger als 50 % aber mehr als 80 %, 4 – mehr als 80 %. Im Anschluss wird der Immunreaktive Score (*immunreactive Score*) (IRS) ermittelt. Dafür wird der SI-Wert mit dem PP-Wert multipliziert. Ein IRS kleiner gleich 2 gilt als negativ, 3–4 schwach positiv, 6–8 mäßig positiv und 9–12 stark positiv. Jede Probe wurde zweimal mikroskopiert und bewertet. Aus den vergebenen Punkten wurde im Anschluss der Mittelwert gebildet.

In den Tabelle 2.15 bis 2.17 auf der nächsten Seite sind die für die Immunhistochemie verwendeten Materialien aufgeführt.

Tabelle 2.15.: Immunhistochemie – Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	Herstellerangaben
Avidin	Eig. Herstellung: 1 Eiweiß auf 100 ml Aqua dest.
Biotin in TBS-Puffer	Merck
Tertiärreagenz Streptavidin	Scytek
Triton-A. dest	Scytek
Diamnobenzidin (DAB)	Scytek

Tabelle 2.16.: Immunhistochemie – Antikörper

Verwendete Antikörper	Herstellerangaben
Östrogen-Rezeptor-AK ERα(ER1D5), Maus	Santa Cruz
VEGF (14124), Maus	Santa Cruz
Midkine, MK (A-9), Maus	Santa Cruz
Survivin (3F342), Maus	Santa Cruz
Heparanase, HPA (H-80), Kaninchen	Santa Cruz
Anti-Human-Progesteron-Receptor Clon PGP 636, M3569, Maus	Santa Cruz

Tabelle 2.17.: Immunhistochemie – Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Herstellerangaben
Mikroskop	Axioplan
Kamera	Axio Cam, Zeiss
Software	Axio Vision, Zeiss

2.4. Statistische Auswertung

Wie oben beschrieben, wurden, nach Testung der Primer-Effizienzen, die Endometriose-, Endometrium- und Karzinomproben auf die entsprechenden Gene mittels qPCR untersucht. Als Vergleichsproben wurden die Zelllinien MDA-MB 231 und HeLa untersucht. GAPDH fungiert als *housekeeping*-Gen. Zur Auswertung der Daten, wurde die vergleichende C_T-Methode ($\Delta\Delta C_T$-Methode) herangezogen, die auf Seite 26 bereits ausführlich beschrieben wurde. Da die Ergebnisse eine sehr hohe Streubreite aufweisen und daher inhomogen bzw. nicht normalverteilt erscheinen, wurde zur statistsichen Auswertung der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Rangsummentest für nicht-parametrische Daten, bei dem Werte kleiner als 0,05 als signifikant gelten. Zur deskriptiven Statistik wurden Boxplots erstellt. Die Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit der freien Statistik-Software R durchgeführt (R Development Core Team 2011).

KAPITEL 3

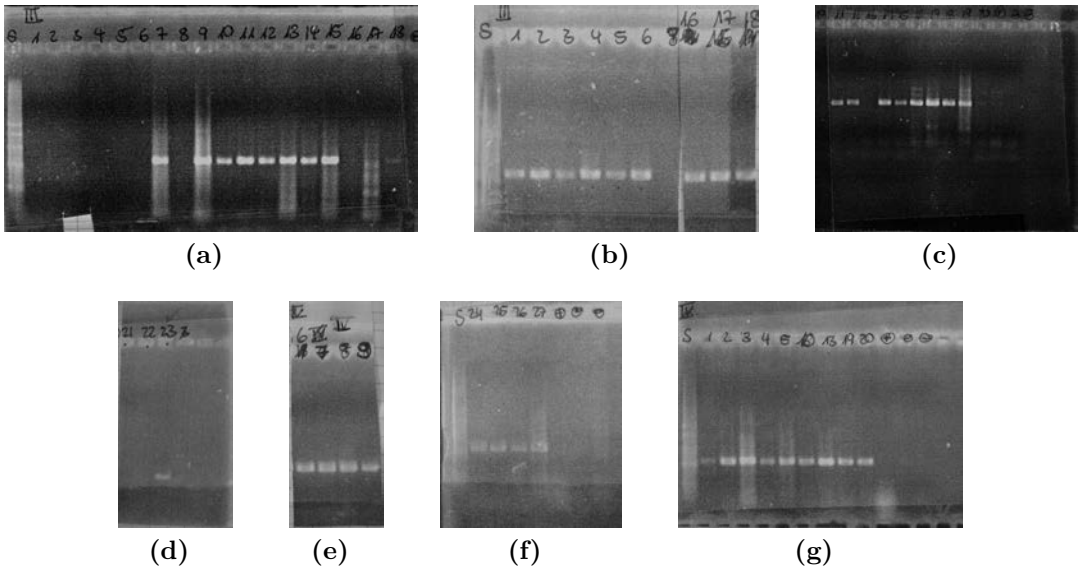
Ergebnisse

3.1. RNA-Isolation

Im ersten Schritt wurde RNA aus dem vorhandenen Gewebe sowie den Zelllinien gewonnen. Der RNA-Gehalt sowie die Reinheit des Materials wurde photometrisch gemessen und im Anschluss berechnet. Die Proben mit der vorhandenen RNA des Endometriumkarzinoms wurden ebenfalls photometrisch vermessen. Wie bereits erwähnt beschreibt der Quotient 260/280 die Reinheit der gewonnenen RNA. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Im Anhang A auf Seite 89 werden die detaillierten Ergebnisse tabellarisch aufgeführt. Hierbei erkennt man auch einige Proben, deren Quotient nicht in dem optimalen Bereich liegen. Diese Proben wurden verworfen.

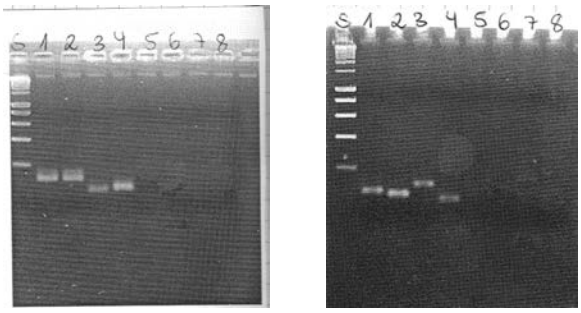
3.2. β-Aktin-RT-PCR

Nachdem die RNA aus den Geweben und Zellen isoliert worden ist, wurde cDNA synthetisiert. Um eine erfolgreiche Synthese zu kontrollieren wurde eine β-Aktin-RT-PCR durchgeführt und die RT-PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese dargestellt. In Abbildung 3.1 auf der nächsten Seite sind beispielhaft einige Bilder der Gelelektrophorese aufgeführt. Für die weiteren Versuche wurde die, so gewonnene und auf Reinheit, in Bezug auf mögliche DNA-Kontamination, kontrollierte, cDNA verwandt.



(a) **(b)** **(c)** **(d)** **(e)** **(f)** **(g)**

Abb. 3.1.: Gelelektrophorese der β-Aktin-RT-PCR
Gelektrophorese der β-Aktin-PCR aus (a)–(b): Endometrium, (c): Endometriose, (d)–(g): Endometrium-Karzinom; **S** steht jeweils für den SmartLedder, den Standard, der bei jeder Elektrophorese mitgeführt wird. Die Ziffern stehen für die verwendeten Proben. Die hellen Balken, zeigen das PCR-Produkt, entsprechend 446 bp. Dies zeigt, das die PCR funktioniert hat und cDNA entstanden ist.



(a) **(b)**

Abb. 3.2.: Gelelektrophorese der Target-Gen-RT-PCR
Gelektrophorese der Target-Gen-PCR in den entsprechenden Zellinien aus (a): 1 Heparanase/ MDA-MB 231, 2 VEGF/ HeLa, 3 Midkine/ HeLa, 4 Survivin/ HeLa, 5 bis 8 Negativkontrollen (b): 1 GAPDH/ MDA-MB 231, 2 CXCR4/ MDA- MB 231, 3 VEGF/ HeLa, 4 Midkine/ HeLa, 5 bis 8 Negativkontrollen

3.3. *Real-time quantitative* PCR (qPCR)

3.3.1. PCR-Effizienzen

Grundlage der nachfolgenden qPCR ist eine Untersuchung der PCR-Effizienzen unter Benutzung der entsprechenden Primer. Wie bereits beschrieben wurde aus dem negativen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge sowie den gemessenen C_T-Werten eine Gerade erstellt. Aus der extrapolierte Steigung der Gerade lässt sich die Effizienz der PCR errechnen. Liegt der Wert bei $-3{,}32$ ist die PCR-Effizienz 100 %. Um die oben beschriebene C_T-Methode ($\Delta\Delta C_T$-Methode) zur Berechnung der relativen Genexpression zu verwenden, ist es wichtig, dass die PCR-Effizienz der eingesetzten Targets mit der Effizienz der Vergleichsprobe nahezu gleich ist. In den Abbildungen 3.3 bis 3.8 auf den Seiten 37–39 sind die ermittelten Geraden für die zu testenden Primer dargestellt.

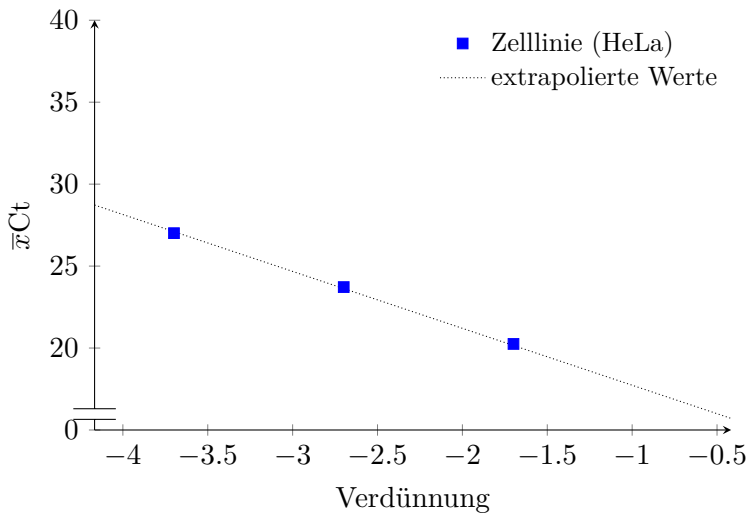


Abb. 3.3.: Effizienz der GAPDH-PCR
Standardkurve ($\overline{x}C_T$ gegen den negativen dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge); Der Korrelationskoeffizient hat den Wert 0,994. Die ermittelte Steigung beträgt −3,47; dies entspricht einer theoretischen PCR- Effizienz von 94,1 %

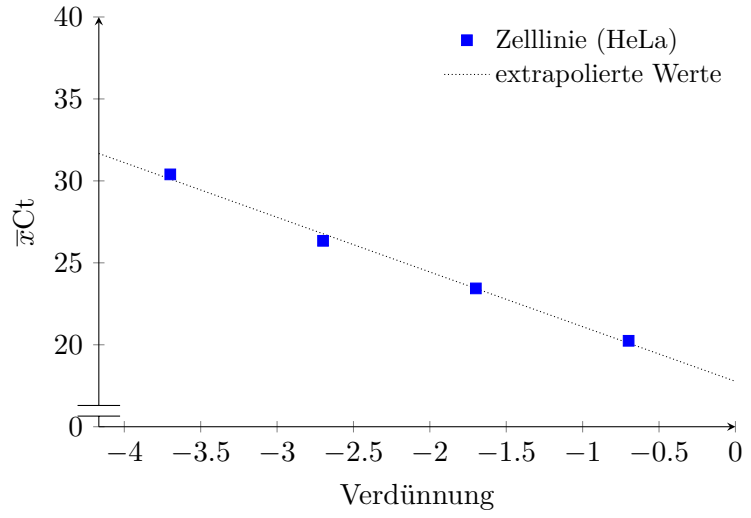


Abb. 3.4.: Effizienz der VEGF-PCR
Standardkurve ($\overline{x}C_T$ gegen den negativen dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge); Der Korrelationskoeffizient hat den Wert 0,994 86. Die ermittelte Steigung beträgt −3,3363; dies entspricht einer theoretischen PCR-Effizienz von 99,4 %

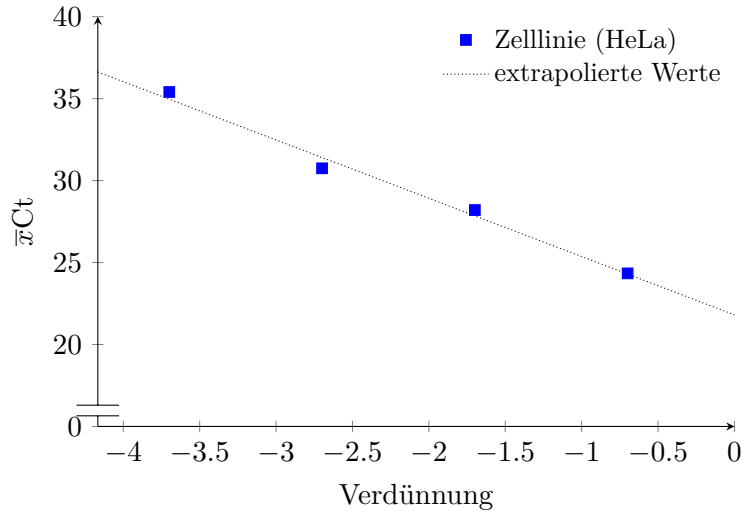


Abb. 3.5.: Effizienz des Survivin-PCR
Standardkurve ($\overline{x}C_T$ gegen den negativen dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge); Der Korrelationskoeffizient hat den Wert 0,984. Die ermittelte Steigung beträgt −3,556; dies entspricht einer theoretischen PCR-Effizienz von 91,07 %

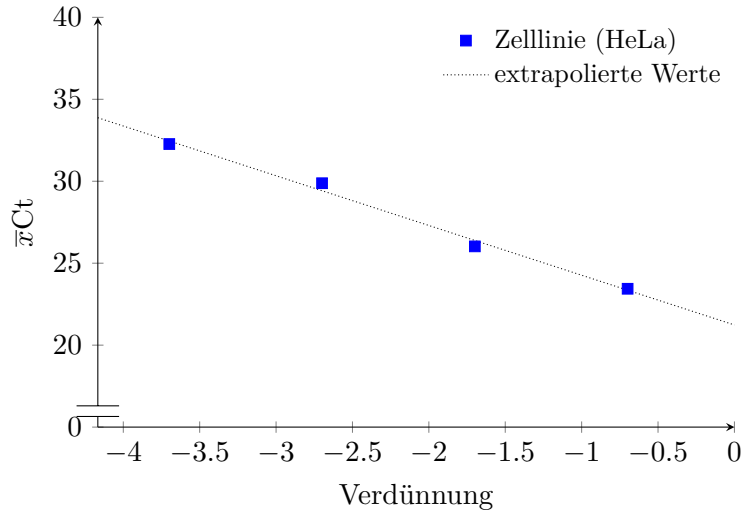


Abb. 3.6.: Effizienz der Midkine-PCR
Standardkurve ($\overline{x}C_T$ gegen den negativen dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge); Der Korrelationskoeffizient hat den Wert 0,99176. Die ermittelte Steigung beträgt −3,0343; dies entspricht einer theoretischen PCR-Effizienz von 135,00 %. Anmerkung: Die theoretische PCR-Effizienz übersteigt deutlich die 100,00 %, dies deutet entweder auf Fehler in der Versuchsdurchführung oder unzureichend qualitative Proben hin. Die PCR-Effizienz wurde mehrfach gemessen bzw. der Versuch mehrfach durchgeführt. Es ließ sich dennoch kein besseres Ergebnis erzielen. Da trotzdem davon auszugehen ist, das eine effektive PCR stattfindet, wurde der Primer für die folgenden Versuch verwendet.

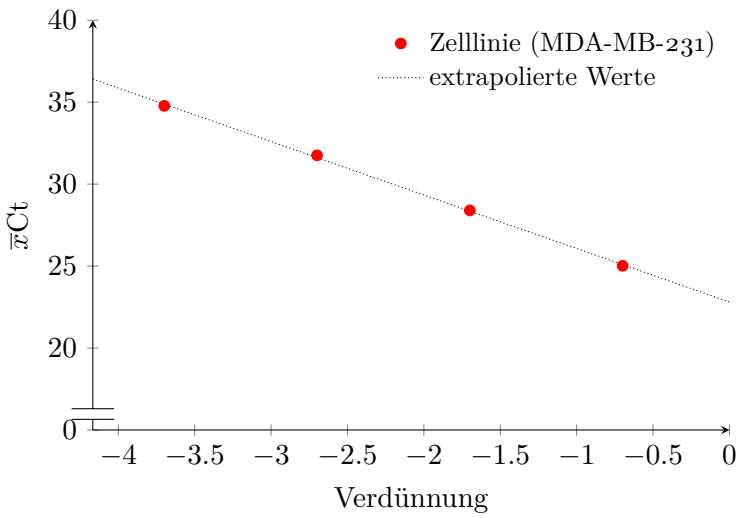


Abb. 3.7.: Effizienz der Heparanase-PCR
Standardkurve ($\overline{x}C_T$ gegen den negativen dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge); Der Korrelationskoeffizient hat den Wert 0,9993. Die ermittelte Steigung beträgt −3,263; dies entspricht einer theoretischen PCR- Effizienz von 102,5 %

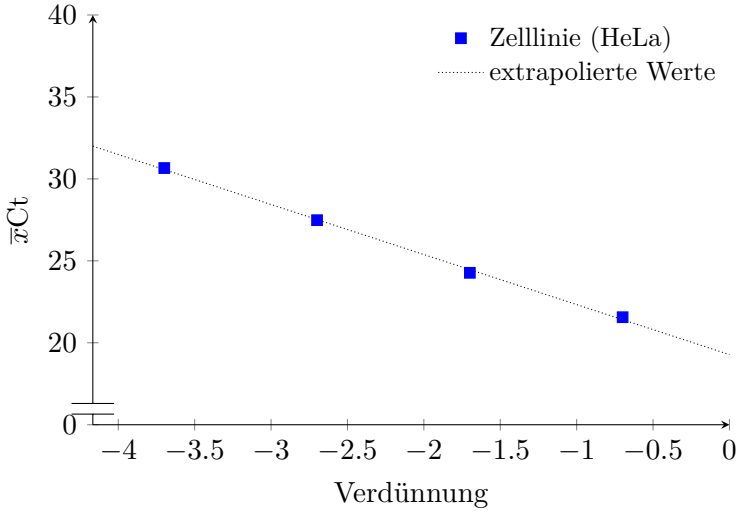


Abb. 3.8.: Effizienz der CXCR4-PCR
Standardkurve ($\overline{x}C_T$ gegen den negativen dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge); Der Korrelationskoeffizient hat den Wert 0,998 51. Die ermittelte Steigung beträgt −3,0523; dies entspricht einer theoretischen PCR- Effizienz von 102,9 %

3.3.2. Genexpressionsanalyse

Nach Testung der Primer-Effizienzen wurden die Endometriose-, die Endometrium- und die Karzinomproben auf ihren Gehalt der entsprechenden Gene mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse sind im Anschluß, nach Zielgenen sortiert, präsentiert. Die relative Genexpression wird für jedes Zielgen mittels Boxplot veranschaulicht. Die ermittelten Werte werden auch tabellarisch dargestellt und sind so im Anhang B auf Seite 92 aufgeführt. Vor den Ergebnistabellen ist jeweils eine Tabelle mit den Ergebnissen der Kalibrierungsproben (Zelllinie / *housekeeping*-Gen) zu finden. Hier sind mehrere Werte aufgeführt, weil nicht alle Proben in einem Versuchsdurchlauf untersucht wurden, sondern mehrere Untersuchungen nacheinander erfolgten. Dies hatte zum einen technische Gründe und zum anderen mussten einige Versuche wiederholt werden. Bei jeder neuen Untersuchung ergaben sich entsprechend neue Kalibrierungswerte. Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass die Ergebnisse eine sehr hohe Streubreite haben und daher inhomogen bzw. nicht normalverteilt erscheinen. Aus diesem Grund wurde zur statistischen Auswertung der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Rangsummentest für nicht-parametrische Daten.

VEGF

Die höchste VEGF-Expression wurde im Endometriumkarzinomgewebe detektiert, gefolgt von der Expression im Endometriumgewebe. Wie in Abbildung 3.9 ersichtlich, ähnelt sich die Expression zwischen Endometrium und Endometriose. Nur ist die Streubreite bei den Endometriumproben etwas höher. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von VEGF konnte nur im Vergleich Endometriumkarzinom zur Endometriose festgestellt werden (p = 0,03). Der Vergleich Endometriose zu Endometrium sowie Endometriumkarzinom zu Endometrium zeigten jeweils keine Signifikanz. Tabelle B.2 bis B.4 auf den Seiten 93–94 zeigen die Einzelwerte der VEGF-Expressionen nach Gewebetypen.

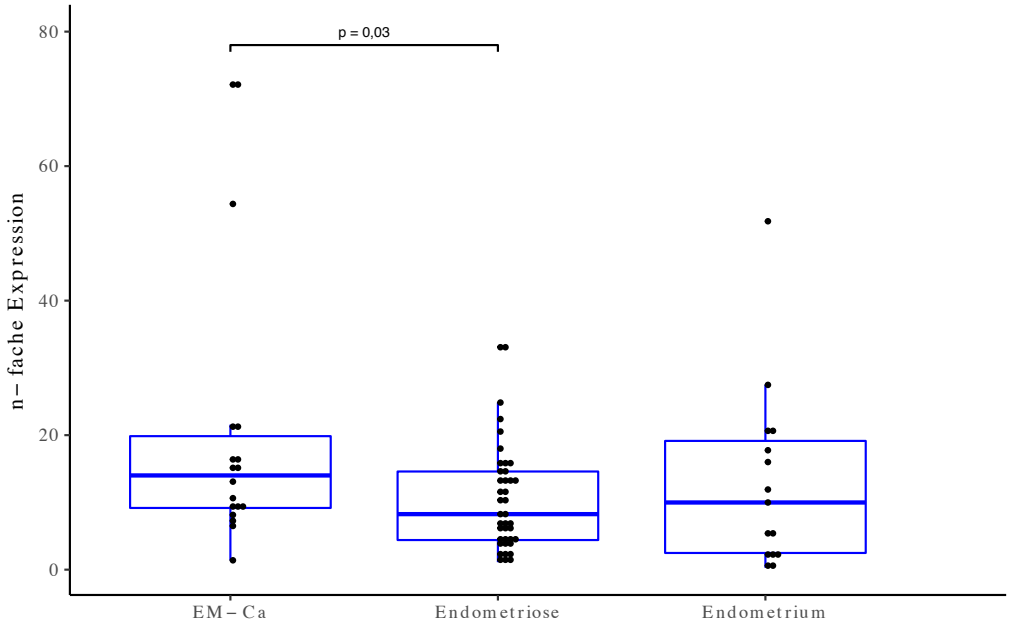


Abb. 3.9.: VEGF-Expressionen in Zielgeweben:
Auf der y-Achse ist die n-fache Expression im Vergleich zur Referenz-Zelllinie HeLa aufgetragen. Für die einzelnen Gewebetypen ergeben sich im Vergleich folgende **p-Werte:** Endometriose vs. Endometrium 0,984 9, Endometriose vs. Endometrium-Ca 0,030 1, Endometrium vs. Endometrium-Ca 0,212 2

Survivin

Für das Zielgen Survivin ließ sich die höchste Expression in den Karzinomproben nachweisen. Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich hier ein signifikanter Wert im Vergleich Karzinom zu Endometrium (p = 0,000 5) sowie Karzinom zu Endometriose (p = 0,023). Rein deskriptiv scheint die Expression in den Endometrioseproben auch etwas höher zu sein, als in den Endometriumproben, jedoch lässt sich hier keine Signifikanz berechnen. Die Streubreite der Ergebnisse sind in den Karzinomproben und in den Endometrioseproben höher als im Endometrium. Die Tabellen B.6 bis B.8 auf den Seiten 95–96 zeigen die Einzelwerte der Survivin-Expressionen nach Gewebetypen.

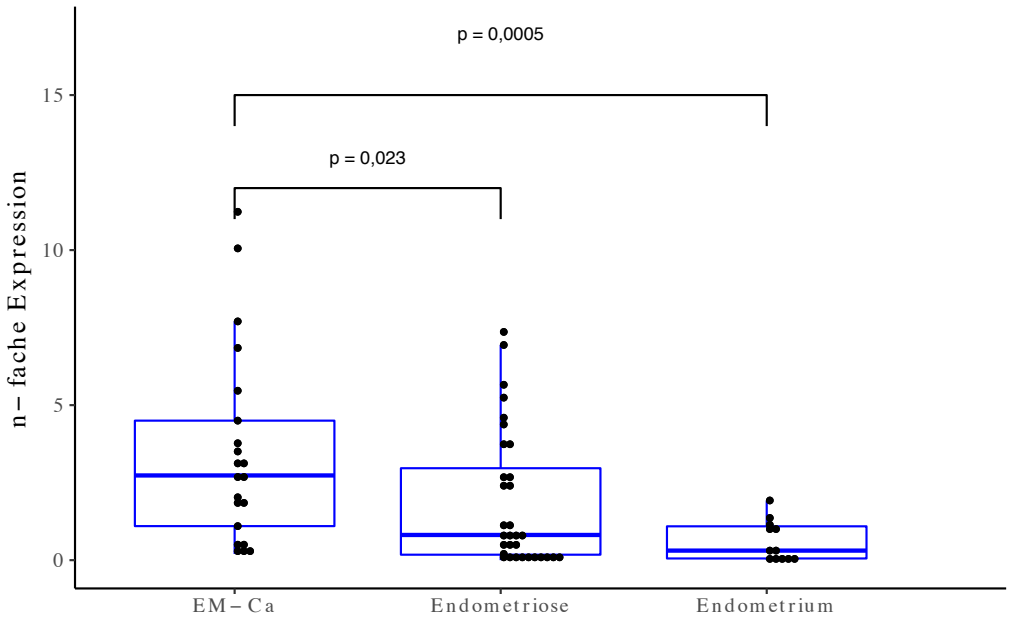


Abb. 3.10.: Survivin-Expressionen in Zielgeweben:
Auf der y-Achse ist die n-fache Expression im Vergleich zur Referenz-Zelllinie HeLa aufgetragen. Für die einzelnen Gewebetypen ergeben sich im Vergleich folgende **p-Werte:** Endometriose vs. Endometrium 0,099 6, Endometriose vs. Endometrium-Ca 0,023 0, Endometrium vs. Endometrium-Ca 0,000 5

Midkine

Die Midkine-Expression ist insgesamt in den Endometrioseproben am höchsten, allerdings auch mit der höchsten Streubreite. Ein signifikanter Unterschied konnte im Vergleich zum Karzinomgewebe nachgewiesen werden (p = 0,010). Im Vergleich mit den Endometriumproben konnten hier keine signifikanten Werte detektiert werden. Wie im Boxplot (Abbildung 3.11) beschrieben, ist die Expression im Endometrium und Endometriumkarzinom, zumindestens deskriptiv, sehr ähnlich. Die Tabellen B.10 bis B.12 auf den Seiten 97–98 zeigen die Einzelwerte der Midkine-Expressionen nach Gewebetypen.

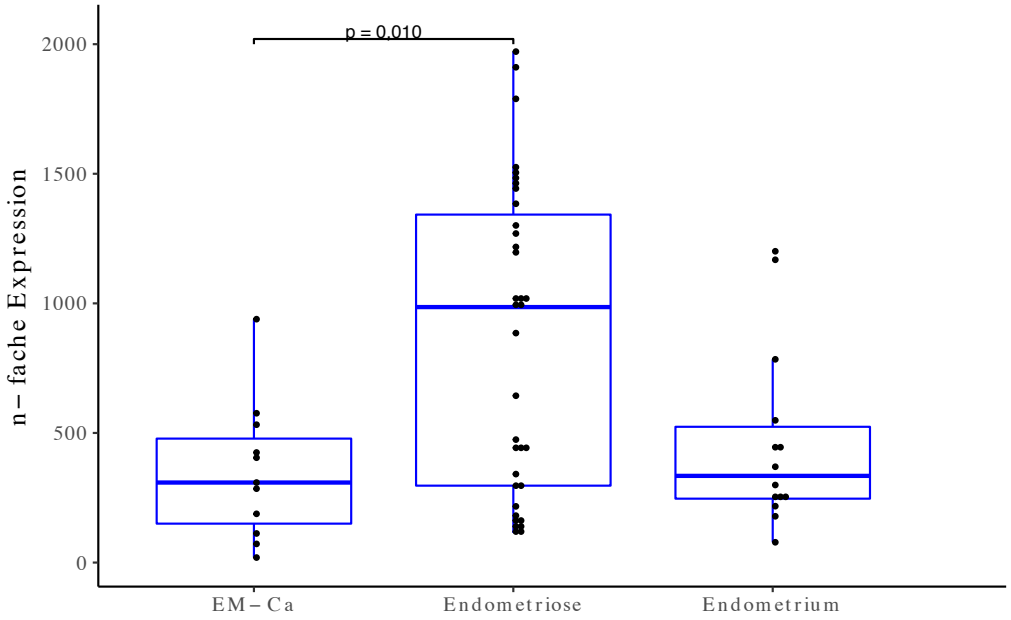


Abb. 3.11.: Midkine-Expressionen in Zielgeweben:
Auf der y-Achse ist die n-fache Expression im Vergleich zur Referenz-Zelllinie HeLa aufgetragen. Für die einzelnen Gewebetypen ergeben sich im Vergleich folgende **p-Werte:** Endometriose vs. Endometrium 0,0641, Endometriose vs. Endometrium-Ca 0,0101, Endometrium vs. Endometrium-Ca 0,5357

Heparanase

Bei diesem Targetgen zeigt sich insbesondere bei den Endometrioseproben eine sehr hohe Streubreite, jedoch rein deskriptiv auch die höchste Expression im Vergleich sowohl zum Karzinom als auch zum Endometrium. Dies lässt sich allerdings nicht mit einer Signifikanz belegen. Die Expression im Karzinomgewebe ist augenscheinlich sogar etwas geringer als im Endometrium. Dies lässt sich jedoch auch nicht als signifikant berechnen. Die Abbildung 3.12 veranschaulicht dieses. Die Tabellen B.14 bis B.16 auf den Seiten 99–100 zeigen die Einzelwerte der Heparanase-Expressionen nach Gewebetypen.

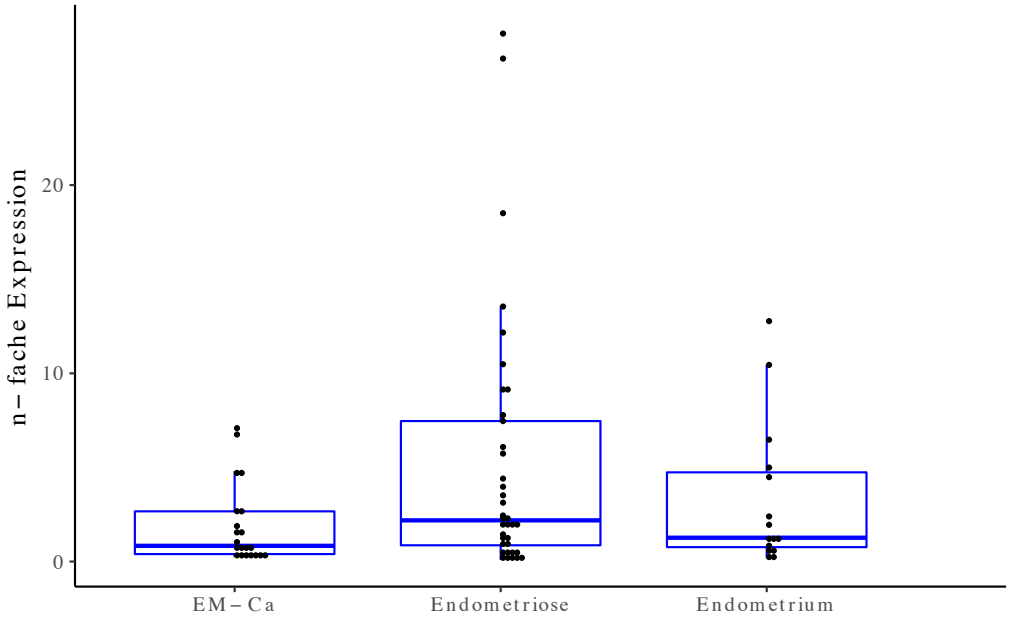


Abb. 3.12.: Heparanase-Expressionen in Zielgeweben:
Auf der y-Achse ist die n-fache Expression im Vergleich zur Referenz-Zelllinie MDA-MB 231 aufgetragen. Für die einzelnen Gewebetypen ergeben sich im Vergleich folgende **p-Werte:** Endometriose vs. Endometrium 0,511 5, Endometriose vs. Endometrium-Ca 0,060 1, Endometrium vs. Endometrium-Ca 0,293 7

CXCR4

Wie im Boxplot ersichtlich erscheint, bei hoher Streubreite, die Expression von CXCR4 im Endometrium deutlich höher als in den Vergleichsproben. Jedoch lässt sich dies nicht mit einer Signifikanz validieren. Die Expression im Karzinom sowie in den Endometrioseproben zeigen ein ähnliches Ergebnis. Auch hier konnte im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. In Abbildung 3.13 werden die Ergebnisse veranschaulicht. Die Tabellen B.18 bis B.20 auf den Seiten 102–103 zeigen die Einzelwerte der CXCR4-Expressionen nach Gewebetypen.

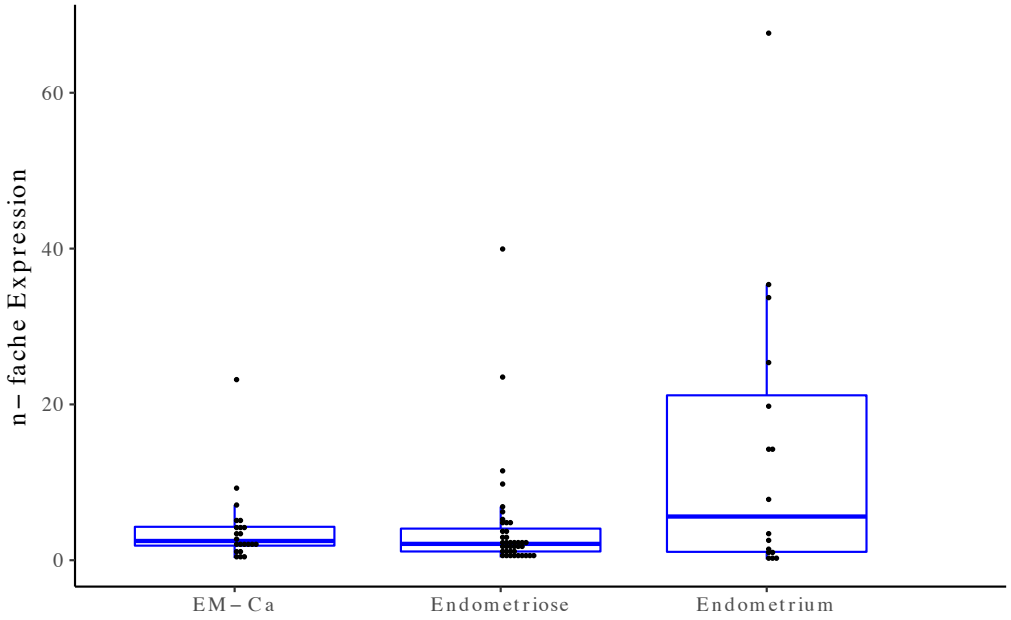


Abb. 3.13.: CXCR4-Expressionen in Zielgeweben:
Auf der y-Achse ist die n-fache Expression im Vergleich zur Referenz-Zelllinie HeLa aufgetragen. Für die einzelnen Gewebetypen ergeben sich im Vergleich folgende **p-Werte:** Endometriose vs. Endometrium 0,182 5, Endometriose vs. Endometrium-Ca 0,507 9, Endometrium vs. Endometrium-Ca 0,356 0

3.4. Immunhistochemie

Das, nach den vorangegangen Versuchen verbliebene, Gewebe wurde immunhistochemisch untersucht. Aufgrund der minimalen Restgewebemenge und den bisherigen Ergebnissen wurde auf eine Untersuchung des Zielproteins CXCR4 verzichtet. Insgesamt wurden 32 Proben mittels Gefrierschnitten untersucht, davon 19 Endometriose- und 13 Endometriumproben. Da es sich hierbei um hormonabhängiges Gewebe handelt, wurde auch eine Untersuchung hinsichtlich des Progesteron- und Östrogenrezeptors durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Gewebe eines, bereits im Rahmen anderer Untersuchungen getesteten, Mammakar-

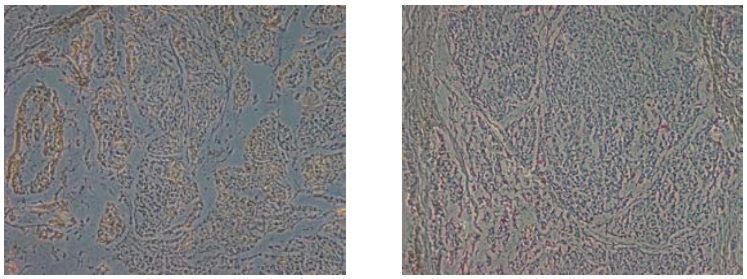
zinoms. Die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mikroskopisch nach dem Prinzip von Remmele u. Stegner (1987). Hierbei wird, wie schon beschrieben, der Immunreaktive Score (*immunoreactive score*) ermittelt. Ein IRS von kleiner gleich 2 steht für ein negatives Ergebnis. Ein IRS von 3–4 für eine schwache, 5–8 für eine mäßige und 9–12 für eine starke Expression des Zielproteins. Die detaillierte mikroskopische Bewertung mit Erfassung der Färbeintensität sowie des prozentualen Anteils des gefärbten Gewebes ist der Tabelle im Anhang C auf Seite 104 zu entnehmen. Im Folgendem werden die Ergebnisse, nach Zielprotein sortiert, dargestellt.

3.4.1. Progesteronrezeptor

Von den 19 Endometrioseproben zeigten 3 eine negative und 16 Proben eine positive Reaktion. Bei den positiven Proben lag der Median bei 6 (Standardabweichung 3,19). Es zeigt sich also eine mäßig starke Reaktion des Progesteronrezeptors. Bei den Endometriumproben waren 4 von 13 negativ, bei den 9 positiven Proben zeigte sich ebenfalls eine mäßige Expression mit einem Median von 6 (Standardabweichung 2,38). In Tabelle 3.1 wird der detaillierte IRS dargestellt. Die Abbildungen 3.14 bis 3.16 auf den Seiten 46–48 zeigen exemplarisch das Färbeverhalten.

Tabelle 3.1.: Auswertung der IRS-Werte für Progesteronrezeptor

Gewebe	Anzahl negativer Proben	Anzahl positiver Proben			Gesamt
		schwach	mäßig	stark	
Endometriose	3	4	6	6	19
Endometrium	4	1	7	2	13



(a) **(b)**

Abb. 3.14.: Mikroskopie von Progesteronrezeptor-Antikörper
(a): Mamma-Ca als Positivkontrolle, (b): Mamma-Ca als Negativkontrolle; Vergrößerung 1:200

Abb. 3.15.: Mikroskopie der Endometriose für Progesteronrezeptor-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Progesteronrezeptor; Vergrößerung: 1:50

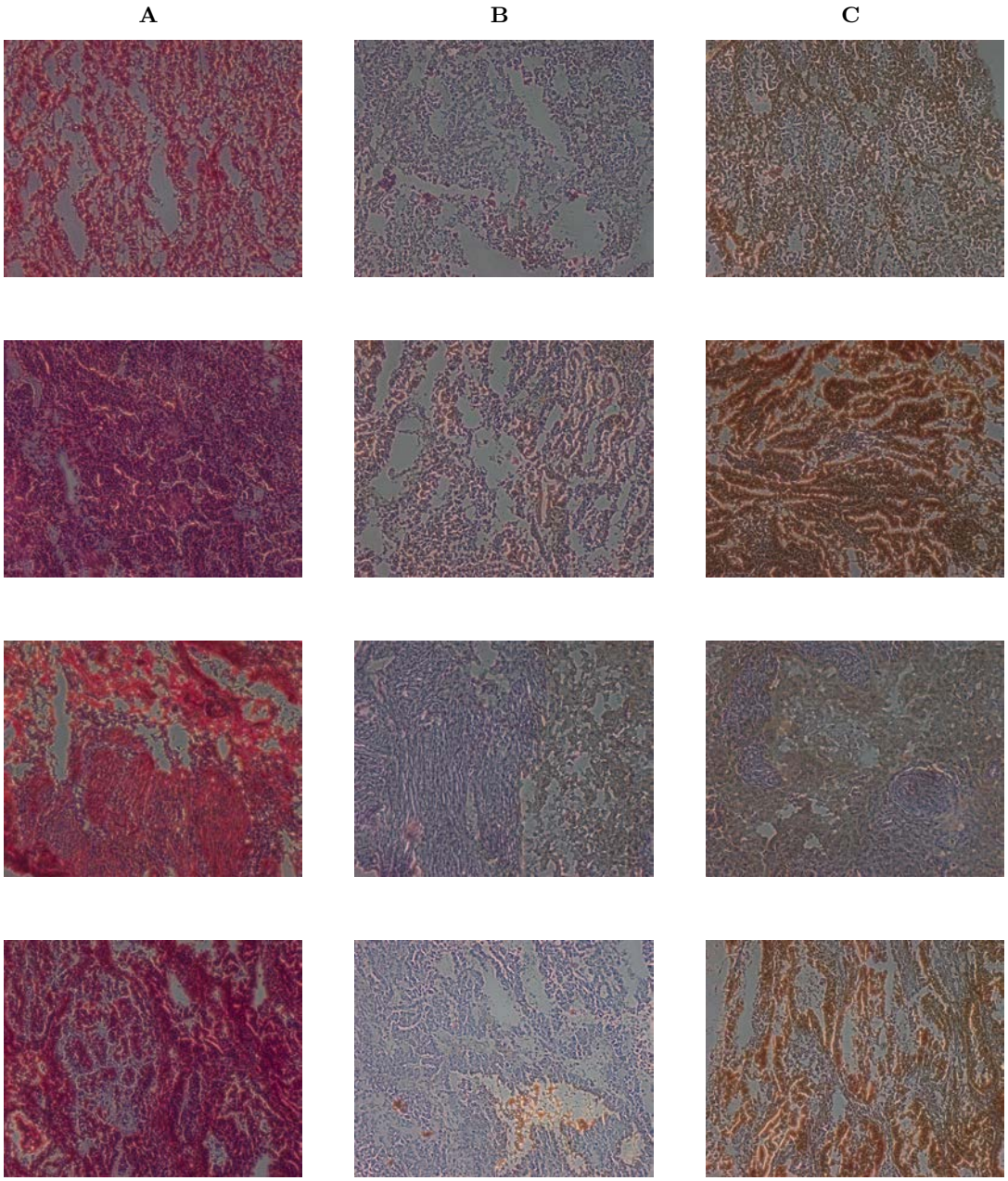


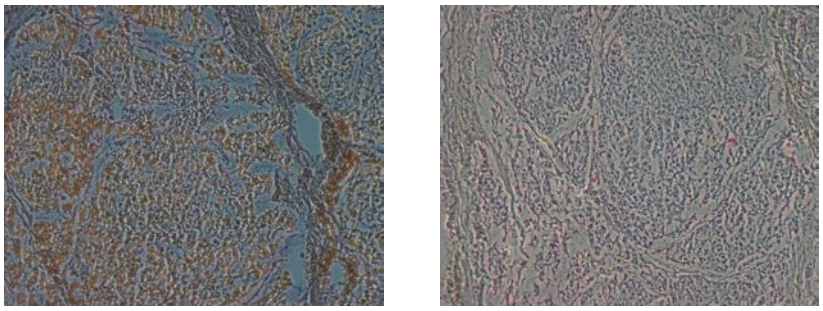
Abb. 3.16.: Mikroskopie des Endometriums für Progesteronrezeptor-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Progesteronrezeptor; Vergrößerung: 1:50

3.4.2. Östrogenrezeptor

Bei den Endometrioseproben wiesen 8 eine negative und 11 Proben eine positive Reaktion. Bei den positiven Proben zeigte sich überwiegend eine starke Reaktion, der Median lag bei 8 (Standardabweichung 1,92). Bei den Endometriumproben waren 5 von 13 negativ, bei den 9 positiven Proben zeigte sich eine mäßige Expression mit einem Median von 7 (Standardabweichung 3,28). In Tabelle 3.2 wird der detaillierte IRS dargestellt. Die Abbildungen 3.17 bis 3.19 auf den Seiten 49–51 zeigen exemplarisch das Färbeverhalten.

Tabelle 3.2.: Auswertung der IRS-Werte für Östrogenrezeptor

Gewebe	**Anzahl negativer Proben**	**Anzahl positiver Proben**			**Gesamt**
		schwach	mäßig	stark	
Endometriose	8	0	7	4	19
Endometrium	5	1	4	3	13



(a) **(b)**

Abb. 3.17.: Mikroskopie von Östrogenrezeptor-Antikörper
(a): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Positivkontrolle, (b): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Negativkontrolle; Vergrößerung 1:200

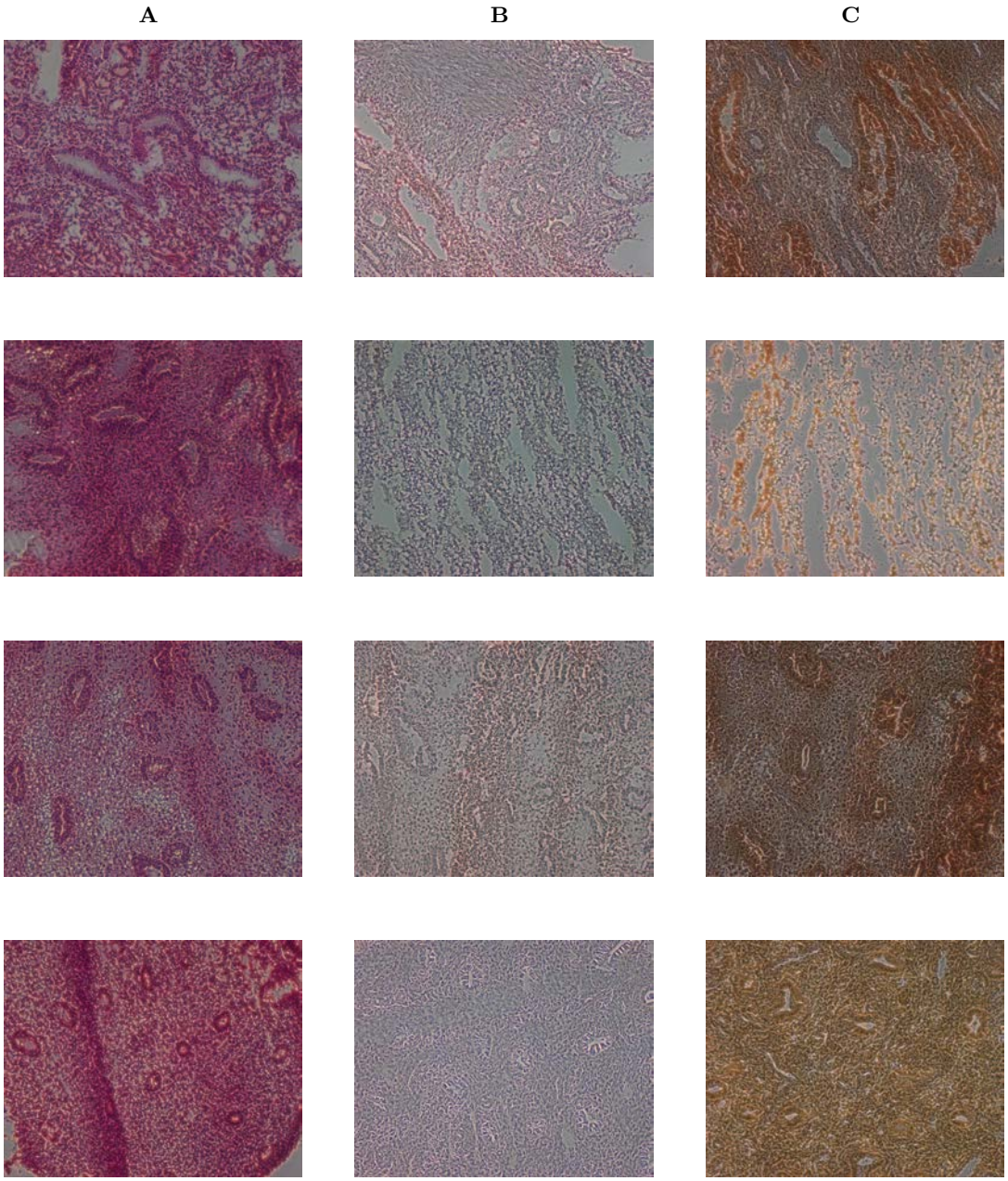


Abb. 3.18.: Mikroskopie der Endometriose für Östrogenrezeptor-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Östrogenrezeptor; Vergrößerung: 1:50

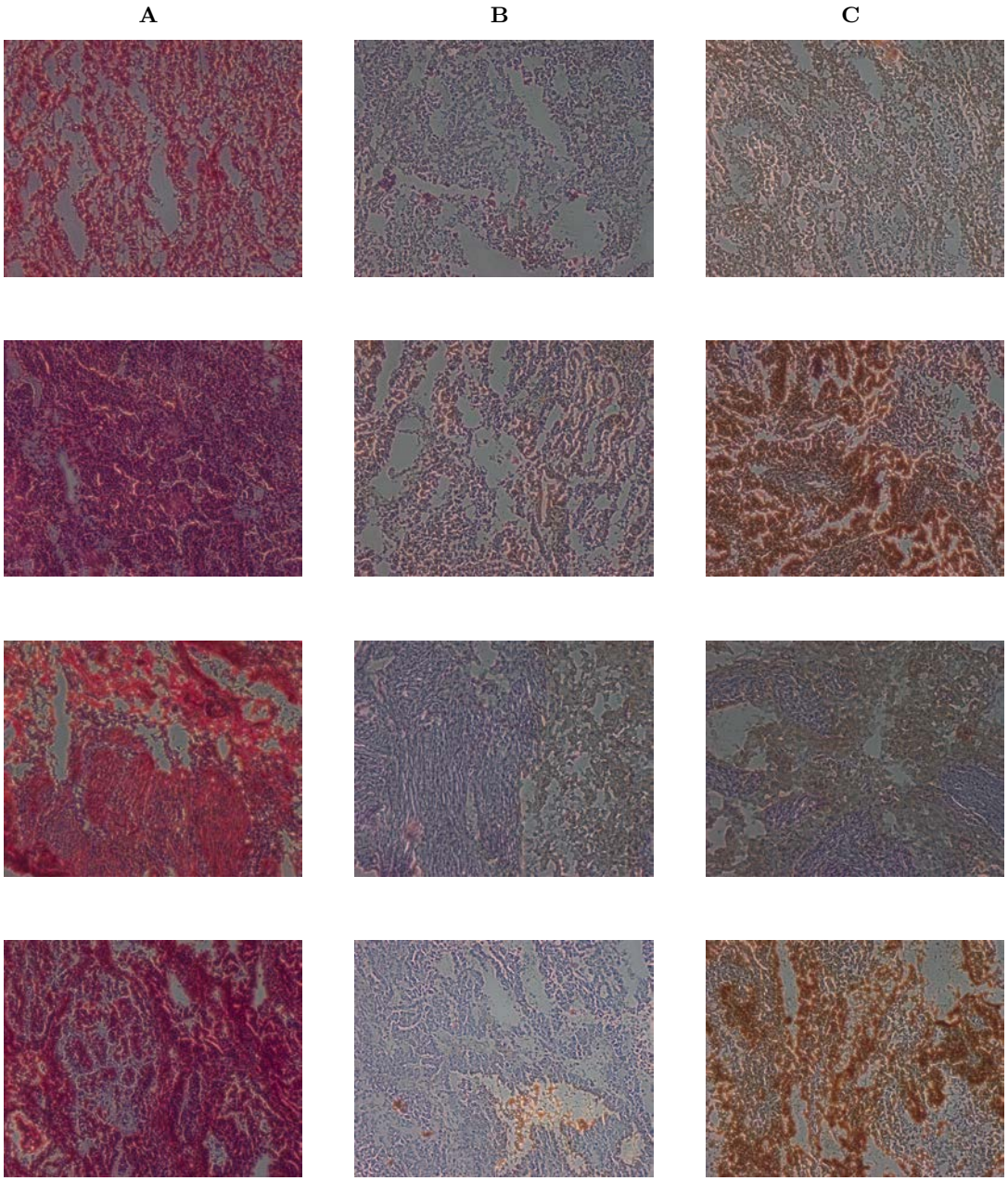


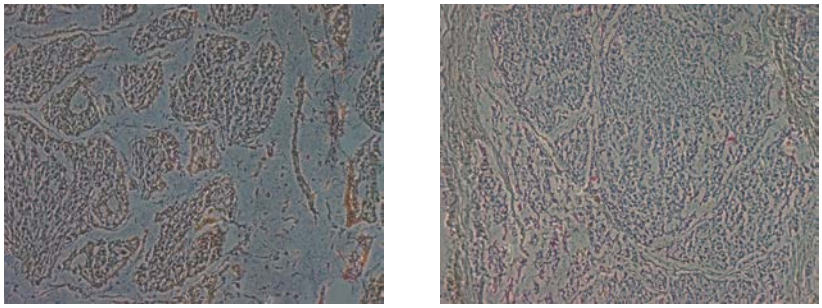
Abb. 3.19.: Mikroskopie des Endometriums für Östrogenrezeptor-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Östrogenrezeptor; Vergrößerung: 1:50

3.4.3. VEGF

Von den 19 Endometrioseproben zeigten 8 eine negative und 11 Proben eine positive Reaktion. Bei den positiven Proben lag der Median bei 4,5 (Standardabweichung 1,95). Es zeigt sich also eine mäßig starke Reaktion, eine starke Reaktion ließ sich hier nicht ermitteln. Bei den Endometriumproben waren 3 von 13 negativ, bei den 9 positiven Proben zeigte sich ebenfalls eine mäßige Expression mit einem Median von 6,75 (Standardabweichung 3,00). In Tabelle 3.3 wird der detaillierte IRS dargestellt. Die Abbildungen 3.20 bis 3.22 auf den Seiten 52–54 zeigen exemplarisch das Färbeverhalten.

Tabelle 3.3.: Auswertung der IRS-Werte für VEGF

Gewebe	**Anzahl negativer Proben**	**Anzahl positiver Proben**			**Gesamt**
		schwach	mäßig	stark	
Endometriose	8	4	7	0	19
Endometrium	3	6	2	2	13



(a) **(b)**

Abb. 3.20.: Mikroskopie von VEGF-Antikörper
(a): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Positivkontrolle, (b): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Negativkontrolle; Vergrößerung 1:200

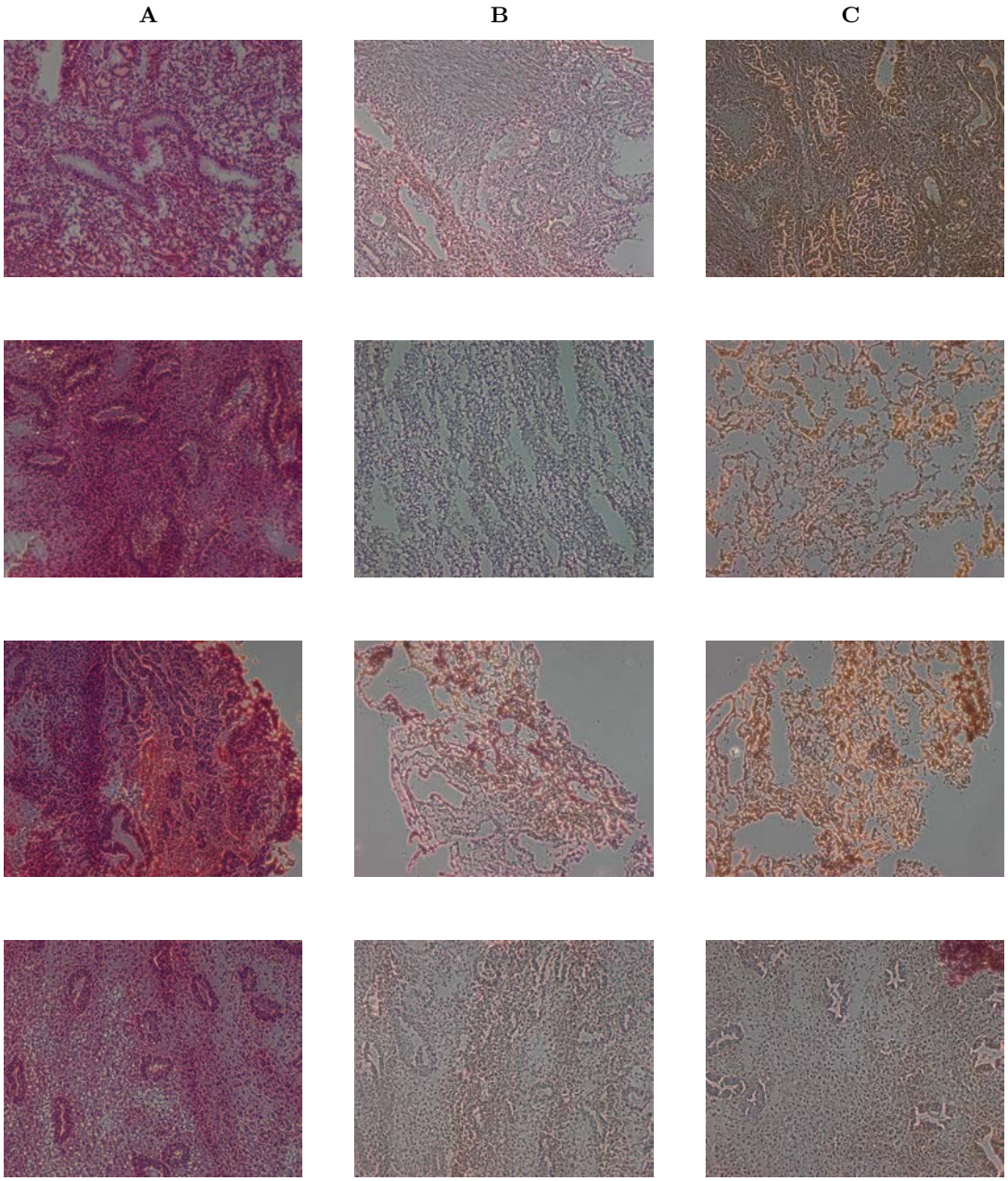


Abb. 3.21.: Mikroskopie der Endometriose für VEGF-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: VEGF; Vergrößerung 1:50

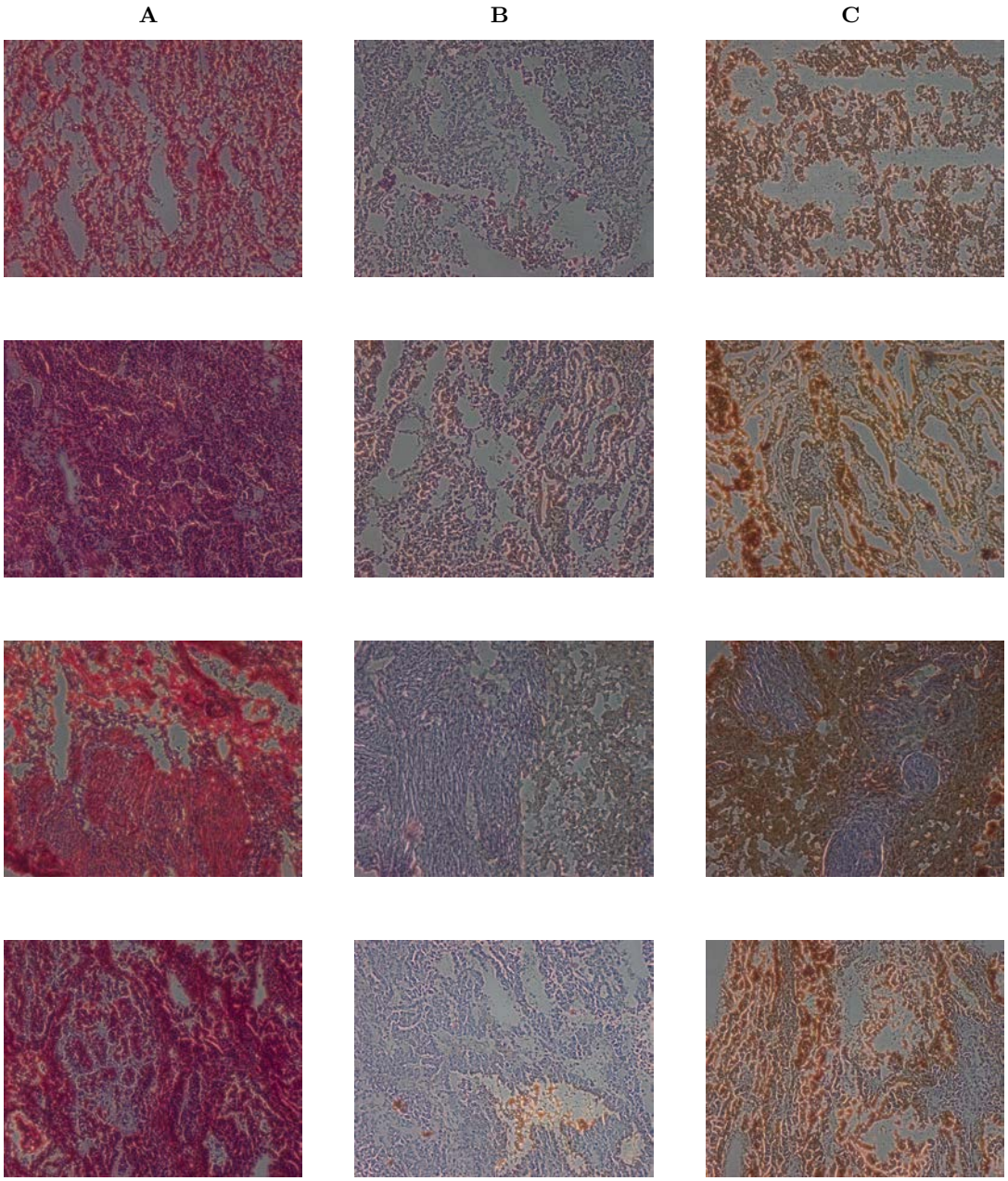


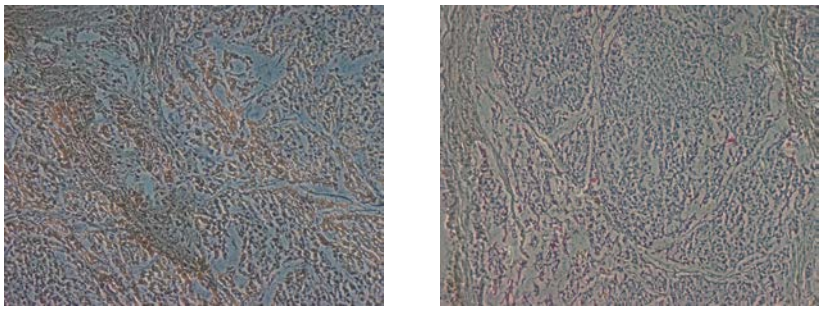
Abb. 3.22.: Mikroskopie des Endometriums für VEGF-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: VEGF; Vergrößerung 1:200

3.4.4. Survivin

Für Survivin zeigte fast die Hälfte der Endometrioseproben eine negative Reaktion. Für 10 Proben konnte eine positive Reaktion nachgewiesen werden. Hierbei lag der Median bei 5,12 (Standardabweichung 2,18), was einer mäßigen Expression entspricht. Bei den Endometriumproben waren 7 von 13 negativ. Die restlichen 5 zeigten eine mäßige Reaktion mit einem Median von 7,75 (Standardabweichung 3,20). In Tabelle 3.4 wird der detaillierte IRS dargestellt. Die Abbildungen 3.23 bis 3.25 auf den Seiten 55–57 zeigen exemplarisch das Färbeverhalten.

Tabelle 3.4.: Auswertung der IRS-Werte für Survivin

Gewebe	**Anzahl negativer Proben**	**Anzahl positiver Proben**			**Gesamt**
		schwach	mäßig	stark	
Endometriose	9	4	5	1	19
Endometrium	7	2	2	2	13



(a) **(b)**

Abb. 3.23.: Mikroskopie von Survivin-Antikörper
(a): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Positivkontrolle, (b): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Negativkontrolle; Vergrößerung 1:200

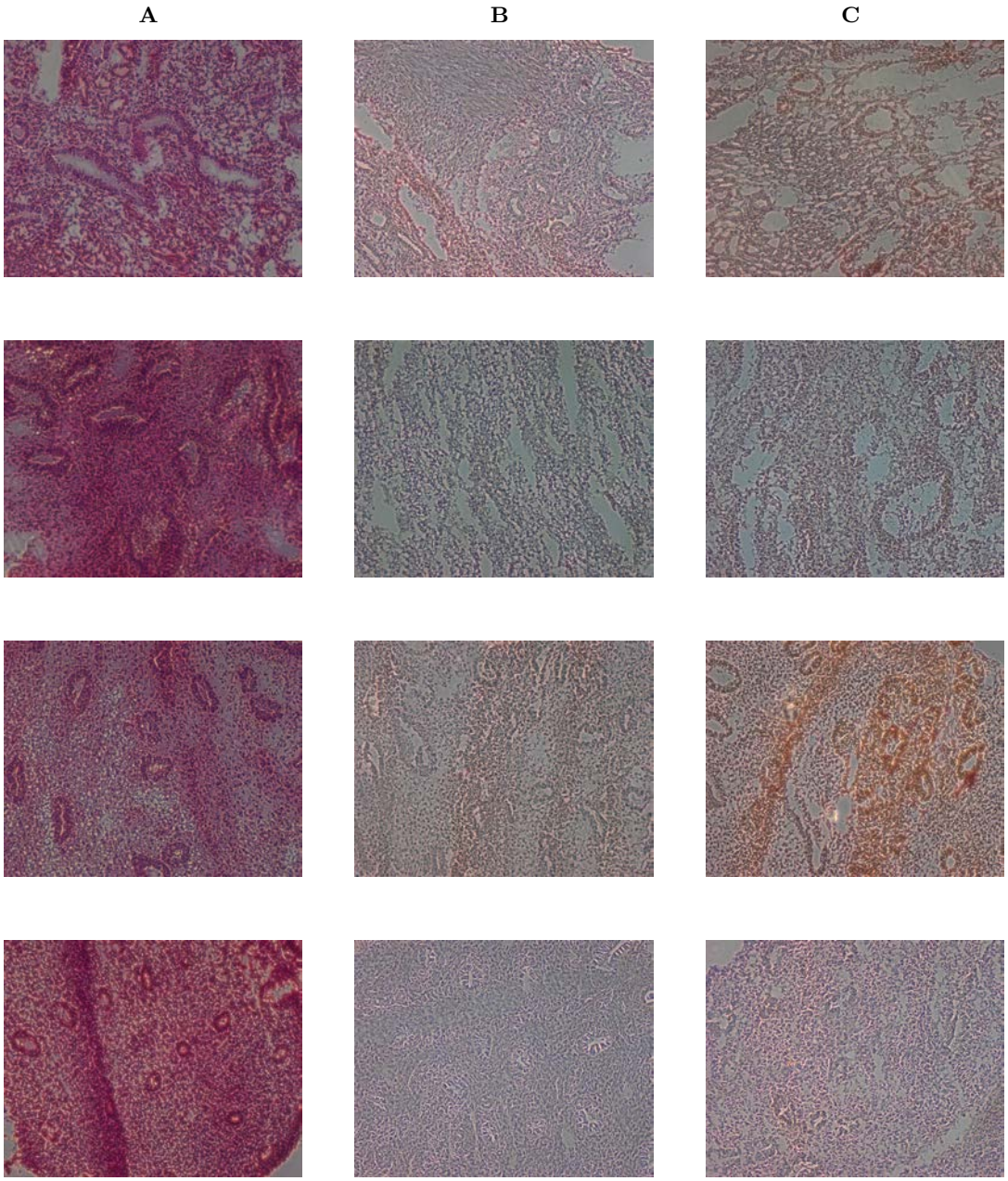


Abb. 3.24.: Mikroskopie der Endometriose für Survivin-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Survivin; Vergrößerung: 1:50

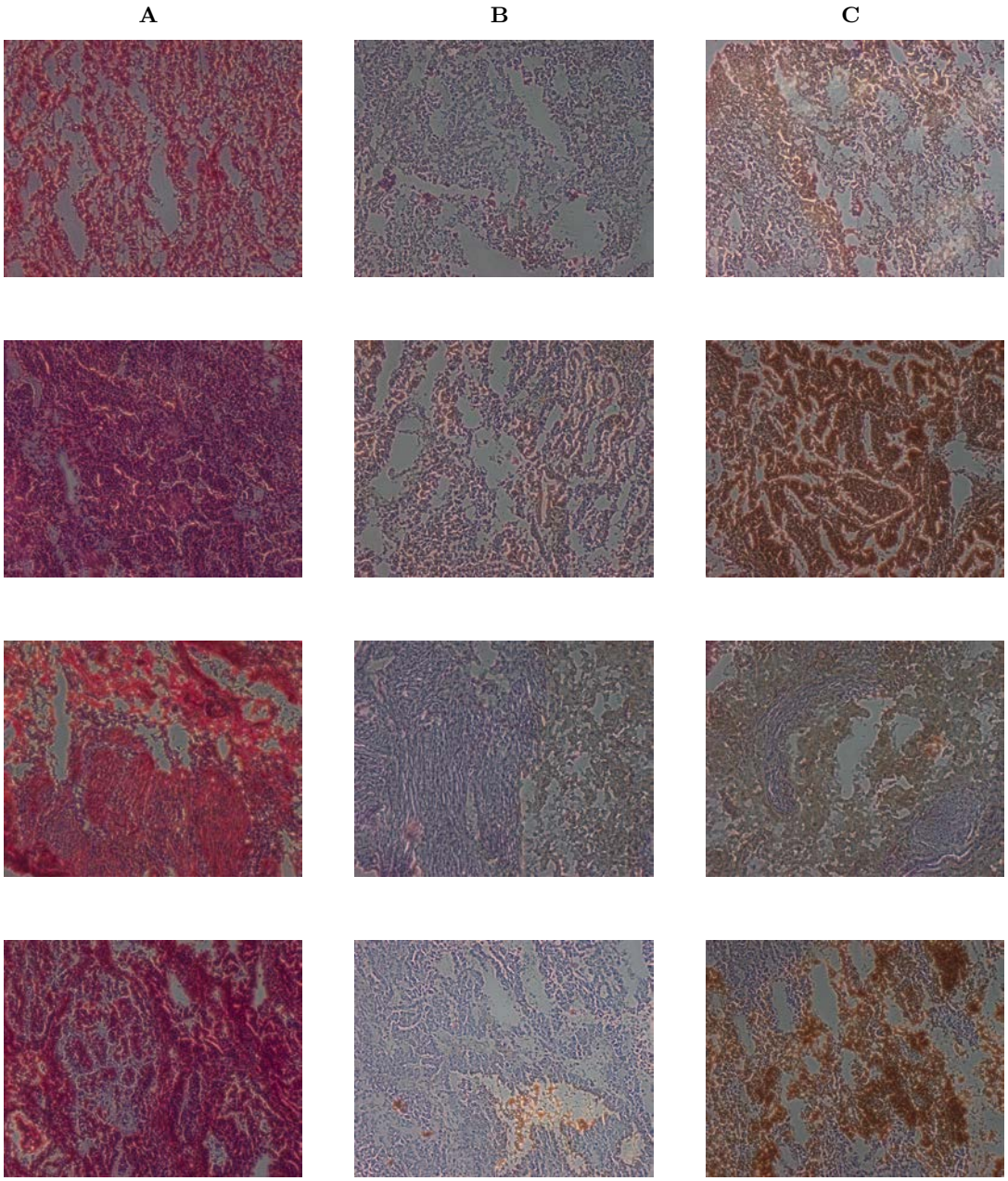


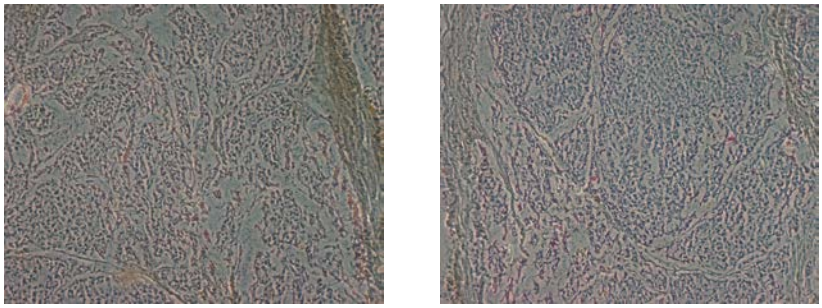
Abb. 3.25.: Mikroskopie des Endometriums für Survivin-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Survivin; Vergrößerung: 1:50

3.4.5. Midkine

Von den 19 Endometrioseproben zeigten nur 4 eine positive Reaktion. Dabei ließ sich auch nur eine schwache Reaktion nachweisen. Der Median lag bei 4 (Standardabweichung 2,00). Eine starke Expression konnte gar nicht beobachtet werden. Bei den Endometriumproben waren 5 von 13 negativ, bei den 8 positiven Proben zeigte sich eine mäßige Expression mit einem Median von 5,25 (Standardabweichung 2,28). In Tabelle 3.5 wird der detaillierte IRS dargestellt. Die Abbildungen 3.26 bis 3.28 auf den Seiten 58–60 zeigen exemplarisch das Färbeverhalten.

Tabelle 3.5.: Auswertung der IRS-Werte für Midkine

Gewebe	**Anzahl negativer Proben**	**Anzahl positiver Proben**			**Gesamt**
		schwach	mäßig	stark	
Endometriose	15	3	1	0	19
Endometrium	5	2	5	1	13



(a) **(b)**

Abb. 3.26.: Mikroskopie von Midkine-Antikörper
(a): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Positivkontrolle, (b): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Negativkontrolle; Vergrößerung 1:200

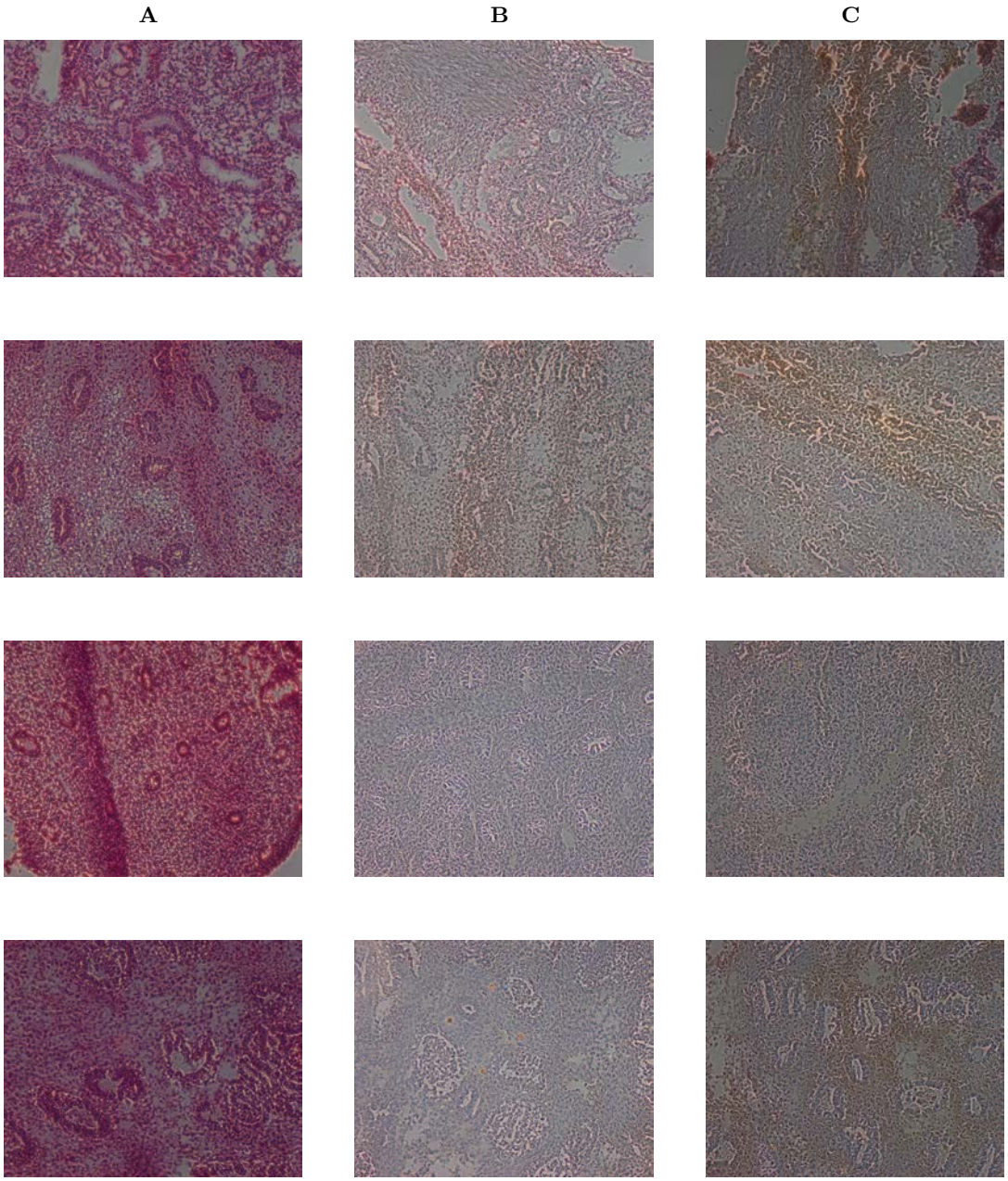


Abb. 3.27.: Mikroskopie der Endometriose für Midkine-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Midkine; Vergrößerung: 1:50

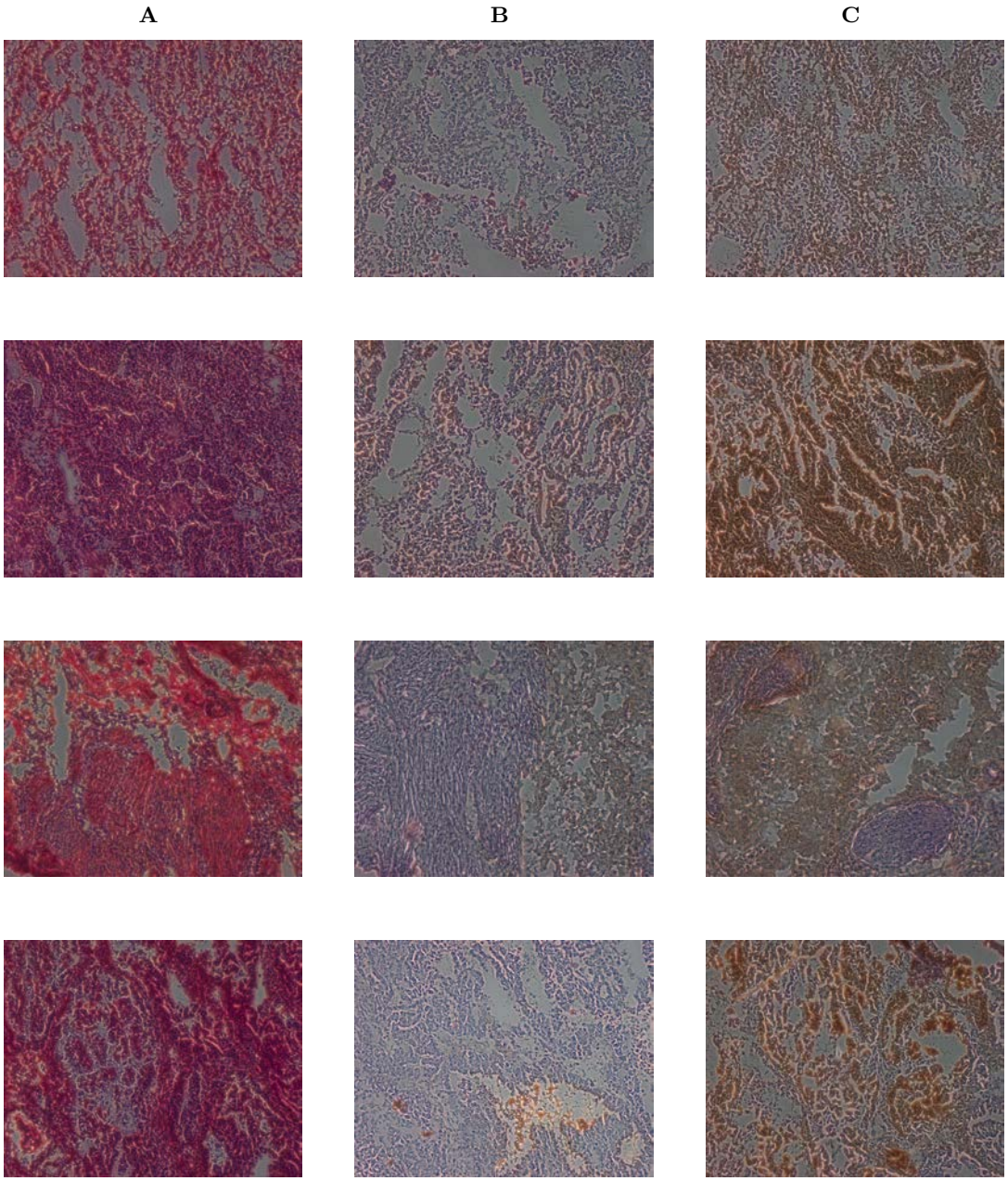


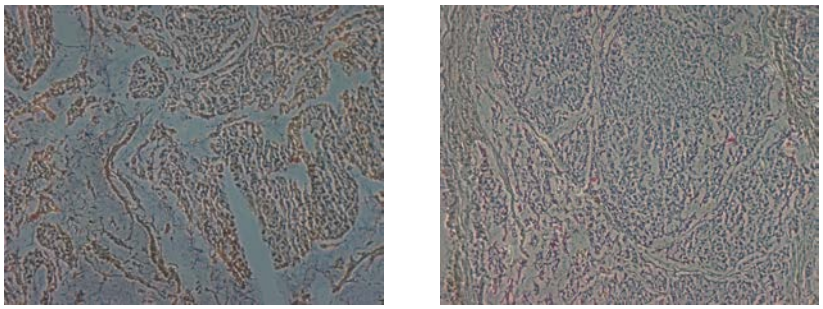
Abb. 3.28.: Mikroskopie des Endometriums für Midkine-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Midkine; Vergrößerung: 1:50

3.4.6. Heparanase

Für dieses Zielprotein konnten in den Endometrioseschnitte 14 als positiv und 5 als negativ gewertet werden. Bei den positiven Proben lag der Median bei 5,62 (Standardabweichung 1,92). Es zeigt sich also eine mäßig starke Reaktion. Bei den Endometriumproben war nur 1 von 13 negativ. Sonst zeigte sich eine mäßige Reaktion mit einem Median von 6,25 (Standardabweichung 2,43). In Tabelle 3.6 wird der detaillierte IRS dargestellt. Die Abbildungen 3.29 bis 3.31 auf den Seiten 61–63 zeigen exemplarisch das Färbeverhalten.

Tabelle 3.6.: Auswertung der IRS-Werte für Heparanase

Gewebe	**Anzahl negativer Proben**	**Anzahl positiver Proben**			**Gesamt**
		schwach	mäßig	stark	
Endometriose	5	4	10	0	19
Endometrium	1	2	10	0	13



(a) **(b)**

Abb. 3.29.: Mikroskopie von Heparanase-Antikörper
(a): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Positivkontrolle, (b): Gewebeschnitt Mammakarzinom als Negativkontrolle; Vergrößerung 1:200

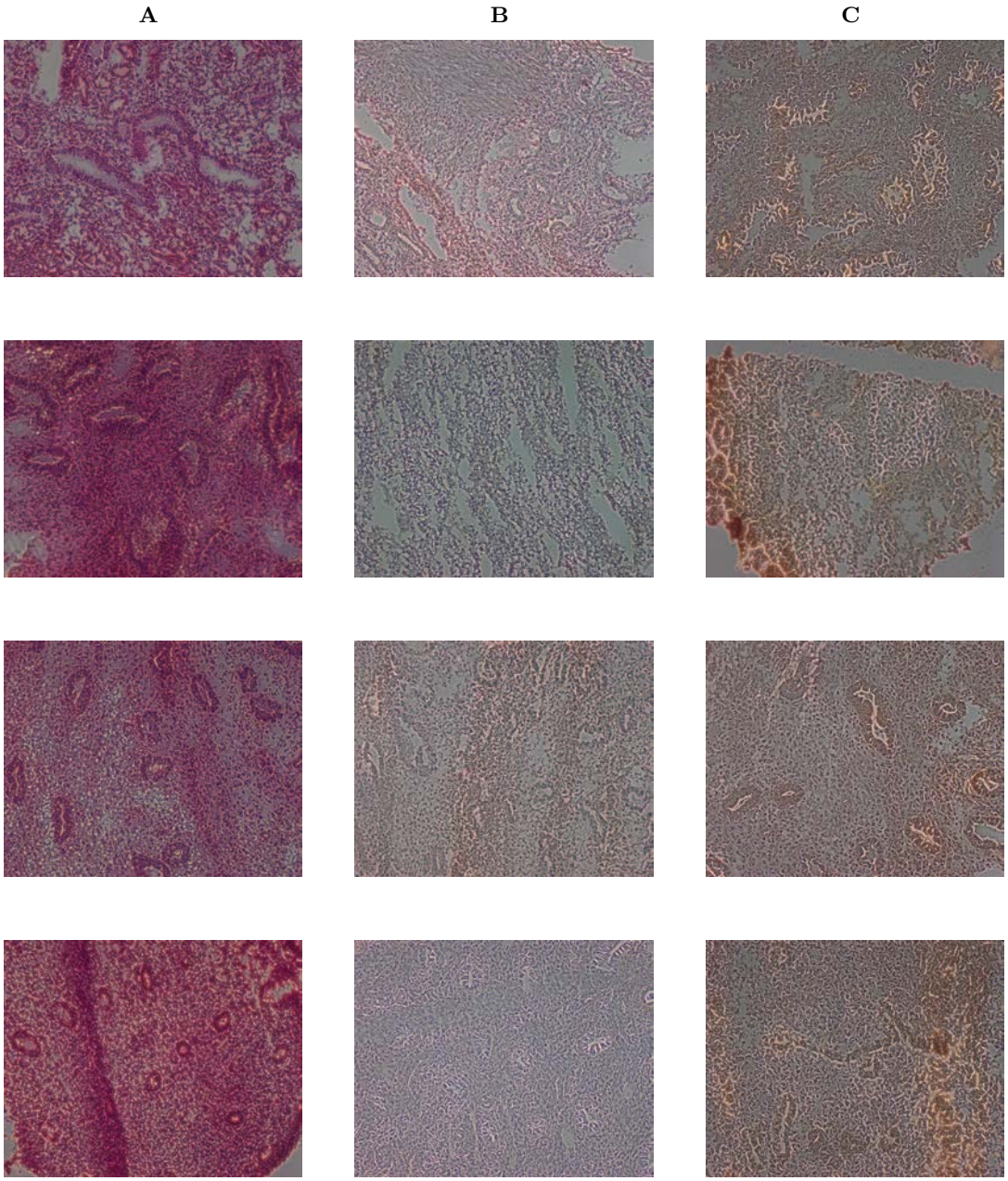


Abb. 3.30.: Mikroskopie der Endometriose für Heparanase-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Heparanase; Vergrößerung: 1:50

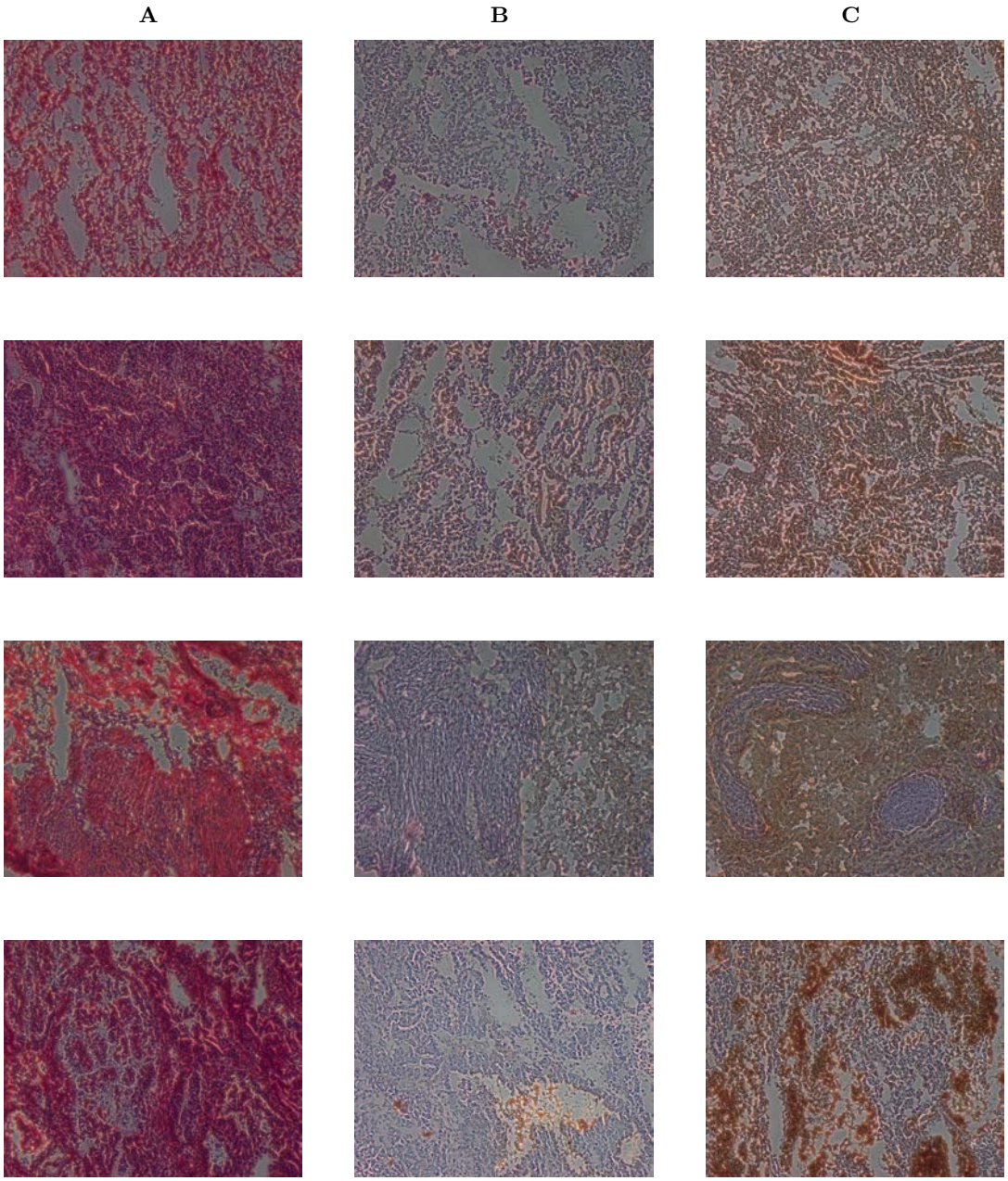


Abb. 3.31.: Mikroskopie des Endometriums für Heparanase-Antikörper
A: HE-Färbung, **B**: Negativkontrolle, **C**: Heparanase; Vergrößerung: 1:50

KAPITEL 4

Diskussion

Die bisherigen Therapieformen der Endometriose sowie des Endometriumkarzinoms sind in Bezug auf die Lebensqualität der Patienten sowie das Outcome verbesserungswürdig. Die Behandlung der Endometriose beinhaltet neben operativen Verfahren den Einsatz von Schmerzmedikamenten sowie Hormonpräparaten. Jedoch haben diese Therapeutika zum Teil starke Nebenwirkungen und einige Patienten sind dennoch nicht beschwerdefrei. Ähnliches gilt für das Endometriumkarzinom. Hier steht die operative Therapie im Vordergrund, die für die Patienten eine erhebliche Belastung bedeutet. Einen neuen Ansatzpunkt bieten zielgerichtete Therapien. Die Adenovirus-basierte Therapie ist dabei hervorzuheben (Rein et al. 2006). Wie in der Einleitung geschildert bringen diese Viren viele Vorteile, wie genetische Modifizierbarkeit, Stabilität und hohe Infektionsraten, mit sich (Bauerschmitz u. Dall 2004). Das Problem ist, dass der Rezeptor, an den die Viren binden, vor allem im epithelialen Gewebe vorkommt. Ein spezifischer Einsatz gestaltet sich folglich schwierig. Ein Lösungsansatz bietet das transkriptionelle *Targeting*. Es werden gewebespezifische Steuerungselemente (Promotoren) gesucht, die dem viralen Genom vorgeschaltet werden. Idealerweise sind diese Promotoren nur im erkrankten Gewebe aktiv. Insbesondere sollte keine oder nur eine geringe Aktivität in der Leber nachgewiesen werden, da die Viren dort abgebaut werden (Bauerschmitz et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit werden solche Promotoren für die oben genannten Erkrankungen gesucht. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass VEGF, Midkine, Heparanase, $CXCR_4$ und Survivin mögliche Kandidaten für eine solche Therapie sind (Rein et al. 2006).

Es wurde eine Genexpressionanalyse mittels qPCR durchgeführt. Durch immunhistochemische Färbungen sollte anschließend das jeweilige Genprodukt untersucht werden. Aus Gewebe von 45 Endometriose- und 17 Endometriumproben wurde zunächst RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Analyse mittels qPCR durchgeführt. Zudem wurde RNA von 27 Endometriumkarzinomproben zur Verfügung gestellt, die ebenfalls molekulargenetisch untersucht wurden, hier entfiel allerdings die immunhistochemische Untersuchung.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit, nach Genen sortiert, diskutiert.

4.1. VEGF

Bereits in der Einleitung wurde die Bedeutung der Angiogenese in der Entstehung der Endometriose sowie des Endometriumkarzinoms erläutert (van der Horst et al. 2008).

In der Literatur findet man Hinweise, dass in der Peritonealflüssigkeit, den Ovarien und dem Endometrium von Patienten mit Endometriose eine erhöhte Konzentration von angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktoren vorliegt. (García-Manero et al. 2008).

Zudem konnte eine erhöhte Konzentration von VEGF im eutopen Endometrium, vor allem in der späten sekretorischen Phase, gefunden (McLaren 2000). Auch das Stadium der Endometriose scheint eine Rolle in der VEGF-Expression zu spielen. So konnten in frischen, roten Endometrioseläsionen höhere Konzentrationen analysiert werden, als in den älteren schwarzen Herden (Donnez et al. 1998).

Die Peritonealflüssigkeit jedoch zeigte bei diesen Patienten eine gesteigerte Aktivität von VEGF auf. Dieses wird dadurch begründet, dass die Anzahl, Größe und Aktivität von Makrophagen in der Peritonealflüssigekeit bei Patienten mit Endometriose ansteigt. Diese wiederum aktivieren durch die Sekretion verschiedener Mediatoren wie z. B. TNF-α, IL-1β, IL-6 Leukozyten und interagieren mit dem ektopen Endometrium. McLaren et al. haben gezeigt, dass die Makrophagen VEGF nicht nur steroidabhängig sezernieren, sondern auch zyklusabhängig VEGF-Rezeptoren exprimieren (McLaren et al. 1996). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass VEGF in ektopen Endometriosegewebe signifikant höher exprimiert ist als in Proben von gesunden Endometrium- und Peritoneumgewebe (Rein et al. 2010b). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass durch eine antiangiogenetische Therapie, die Ausbreitung sowie das Wachstum von Endometrioseherden, an einem *in vivo*-Modell, verhindert werden konnte (Hull et al. 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen dies so nicht. Wie im Ergebnissteil präsentiert, ist die Expression von VEGF im Endometriosegewebe im Vergleich zum Endometriumgewebe sehr ähnlich. Auch ein statistische Signifikanz konnte hier nicht nachgewiesen werde. Man muss jedoch beachten, das bei der Auswahl der Proben weder das Endometriosestadium noch die Zyklusphase des Endometriums berücksichtigt wurde. Peritonealflüssigkeit wurde gar nicht untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine sehr hohe Streubreite. Dies könnte ebenfalls auf die Inhomogenität der verwendeten Proben hindeuten. Immunhistochemisch ließ sich, in der vorliegenden Arbeit, eine mäßig starke Färbung sowohl in den Endometriose- (Median des IRS lag bei 4,5) als auch in den Endometriumproben (Median des IRS lag bei 6,75) nachweisen. Das heißt, es scheint auch eine ähnliche Proteinexpression von VEGF im Vergleich zwischen Endometrium- und Endometriosegewebe vorliegen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse. Jedoch waren von den 19 Endometrioseproben 8 negativ und von den 13 Endometriumproben 3 negativ. Um eine valide Aussage bezüglich der Proteinexpression von VEGF zu machen, ist sicherlich eine höhere Probenanzahl von Nöten. Dennoch scheint ein Einfluss von VEGF in der Pathogenese der Erkrankung nach Angaben der Literatur wahrscheinlich. Rein et al. konnten zeigen, dass eine Infektion von Endometriosezellen mit Adenoviren, denen VEGF als Promoter vorgeschaltet wurde, *in vitro* zur Zellapoptose führte (Rein et al. 2010b). Auch konnte eine geringe Promoteraktivität in der Leber sowie in gesunden Endometriumgewebe

nachgewiesen werden, wodurch sich VEGF gut als Zielgen für eine Gentherapie eignet (Rein et al. 2010b). Um dieses zu untermauern müsste man eventuell schon bei der Auswahl der Proben ein genaues Augenmerk auf den Zyklus bzw. das Erkrankungsstadium setzen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte jedoch die höchste n-fache Expression von VEGF im Endometriumkarzinom nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Endometrioseproben erwies sich dies im statistischen Test (Mann-Whitney-U-Test) sogar als signifikant.

Man könnte jedoch spekulieren, ob VEGF eine Funktion in der Pathogenese des Endometriumkarzinoms einnimmt. Diese These wird durch die aktuelle Literatur gestützt.

Die Angiogenese ist für die Ausbreitung sowie die Metastasierung von Tumoren essentiell (Sanseverino et al. 2006). Auch beim Endometriumkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen der Prognose und der Kapillardichte nachgewiesen werden (Obermair et al. 1999). Weiter konnte gezeigt werden, dass VEGF in Endometriumkarzinomproben immunhistochemisch stark exprimiert ist und eine wichtige Rolle in der Tumorangiogenese einnimmt (Sanseverino et al. 2006; Sivridis et al. 2002).

Auch wurden schon Versuche mit antiangiogenetischen Therapeutika beim Endometriumkarzinom durchgeführt. In einer präklinischen Studie konnte am Mausmodell die Wirksamkeit der monoklonalen VEGF-Antikörpers Bevacizumab in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Docetaxel nachgewiesen werden (Kamat et al. 2007). Eine weitere Studie konnte mit dem Wirkstoff Sorafenib, ein Multikinaseinhibitor, der unter anderem den VEGF-Signalweg inhibiert, Erfolge erzielen. Bei 50 % der Patienten kam es zu einem Wachstumshemmung des Tumors nach 2-monatiger Therapie (Nimeiri et al. 2010).

Anhand der Literaturrecherche ist davon auszugehen, dass VEGF einen bedeutenden Einfluss in der Pathogenese der Endometriose sowie des Endometriumkarzinoms hat und im Hinblick auf neue Therapiekonzepte eine Schlüsselrolle einnehmen könnte. Aus den oben geschilderten Gründen sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dahingehend leider nicht sehr eindeutig. Lediglich in Bezug auf das Endometriumkarzinom könnte man einen solchen Einfluss vermuten.

4.2. Midkine

Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Midkine wird in hohem Maße in der Embryonalperiode exprimiert und induziert hier unter anderem die Neurogenese sowie die Zellmigration (Kurtz et al. 1995). Im gesunden, adulten Gewebe ist Midkine dagegen kaum nachweisbar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Midkine-Expression bei entzündlichen Prozessen sowie der Karzinogenese hochreguliert ist (Weckbach et al. 2011). Eine erhöhte Expression von Midkine konnte in neuronalen Tumoren und auch in verschiedenen soliden Tumoren (z. B. Pankreaskarzinom, Mammakarzinom, Wilms Tumor) nachgewiesen werden (O'Brien et al. 1996). Die Funktion, die Midkine, in der Tumorgenese und -progression einnimmt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Tanabe et al. konnten erstmals zeigen, dass die Expression von Midkine in Gewebe von Endometriumkarzinom signifikant höher ist als in normalen Endometrium (Tanabe et al. 2008). In der aktuellen Studienlage gibt es dazu aber keine weiteren Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zum Endometrium keine erhöhte Expression

in den Endometriumkarzinomproben nachgewiesen werden. Allerdings wurden auch nur 27 Karzinomproben untersucht. Eine erhöhte Expression im normalen Endometriumgewebe ist nachvollziehbar, da Midkine maßgeblich an der physiologischen Angiogenese beteiligt ist. Diese wiederum ist für den Aufbau des gesunden Endometriums wichtig (Zhang et al. 1995). Immunhistochemisch ließ sich eine mäßige Expression von Midkine im Endometrium nachweisen. Die Östrogenrezeptorexpression war ebenfalls mäßig. Da Midkine im gesunden Endometrium östrogenabhängig exprimiert wird, wäre es interessant, zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt des Zyklus eine erhöhte Expression nachweisbar ist. Eventuell könnte so ein signifikanter Unterschied in der Expression von Midkine im Vergleich zum Karzinomgewebe detektiert werden.

Wie im Ergebnissteil veranschaulicht, zeigte sich in den Endometrioseproben die höchste Midkine-Expression. Im Vergleich zu den Karzinom-Proben war diese sogar signifikant höher ($p = 0{,}01$). Allerdings zeigte sich bei der Midkineexpression insgesamt auch eine sehr hohe Streubreite. Immunhistochemisch konnte dies interessanterweise nicht gestützt werden. Von den Endometrioseproben wurden 15 von 19 negativ getestet. Die positiven Proben zeigten auch nur eine leichte Reaktion. Man könnte spekulieren, dass die Proteinexpression gegebenfalls inhibiert wird. Allerdings war auch der Östrogenrezeptor nur mäßig exprimiert. Da die Midkineexpression, wie oben beschrieben, östrogenabhängig ist, könnte dies auch eine Erklärung für die geringe Proteinexpression sein. Die Interpretation der gewonnenen Daten ist also sehr schwierig. Schon bei der Testung der PCR-Effizienz gestaltete sich die Versuchsdurchführung als schwierig, eventuell erklärt dies die enorme Streubreite der Ergebnisse. Zudem wäre eine genauere Untersuchung der Proben im Hinblick auf Krankheitsstadium und Zyklusabhängigkeit lohnenswert gewesen. Wenn man diese Aspekte ausser Acht lässt, könnte man zumindestens annehmen, dass Midkine in der Pathogenese der Endometriose eine Rolle spielt. Dies lässt sich, wie nachfolgend erläutert, auch in der Literatur belegen.

Auch Hirota et al. wies eine erhöhte Expression von Midkine im Endometrium von Frauen, die von Endometriose betroffen sind, nach. In der Peritonealflüssigkeit konnten höhere Konzentrationen bei Erkrankten festgestellt werden. Midkine stimuliert die Proliferation endometrialen Stromas und scheint an der Entstehung endometrialer Foki in der Peritonealhöhle beteiligt zu sein (Hirota et al. 2005). Allerdings wurde in einer weiteren Studie eine höhere Expression von Midkine im eutopen als im ektopen Endometrium gefunden, sodass angenommen wird, dass die Stimulation des Proteins auf die Formation von Endometrioseherden eher autokrin oder parakrin gesteuert wird oder dass das eutope Endometrium bei Patienten mit Endometriose histologisch verändert ist (Chung et al. 2002). Dieses konnte auch durch eine weitere Studie untermauert werden. Immunhistochemisch ließ sich im eutopen Endometrium von erkrankten Patienten eine höhere Aktivität von Midkine im Vergleich zum ektopen Gewebe nachweisen (Zhu et al. 2006).

Entgegen dessen konnte in einer weiteren Studie nachgewiesen werden, dass Midkine in etablierten Endometriosezelllinien, sowie Endometriose- und Endometriumkarzinomgewebe signifikant höher exprimiert ist als in Peritonealgewebe gesunder Probanden. Weiterführend wurden Reportergenanalysen durchgeführt, die ergaben dass die Promotoraktivität von Midkine in Endometriosegewebe höher ist als im Kontrollgewebe. Es konnte dadurch gezeigt

werden, dass sich Midkine als Promotor für eine etwaige Gentherapie eignet (Rein et al. 2008). Paupoo et al. konstatieren hingegen, dass Midkine sich nicht für eine solche Therapie eignet, da sich in deren Studie keine erhöhte Promotoraktivität in Endometrioseherden nachweisen ließ (Paupoo et al. 2010).

Die Studienlage sowie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf einen Einfluss von Midkine in der Pathogenese sowohl der Endometriose als auch des Endometriumkarzinoms hin. Ob Midkine ein geeigneter Kandidat für eine zielgerichtete Therapie ist, lässt sich auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig sagen. Es sollten Studien, in denen das Gewebe differenzierter auf die Aktivität von Midkine untersucht wird, folgen.

4.3. Heparanase

Die Endo-β-D-Glucoronidase Heparanase degradiert Proteoglykane in der extrazellulären Matrix und der Basalmembran (Zhang et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass viele maligne Tumoren Heparanase exprimieren. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von Heparanase mit der Transformation, der Angiogenese sowie der Metastasierung von malignen Zellen korreliert (Jingting et al. 2008). In gesunden, adulten Gewebe zeigt Heparanase, mit Ausnahme von lymphatischen Organen, Thrombozyten und Plazentagewebe, eine geringe Aktivität. Eine weitere Ausnahme zeigt sich im gesunden Endometrium. Es konnten zyklus- und östrogenabhängig erhöhte Expressionen von Heparanase nachgewiesen werden (Hasengaowa et al. 2006; Xu et al. 2007b).

Für das Endometriumkarzinom konnte gezeigt werden, dass die Expression von Heparanase eng mit dem Tumorstadium verknüpft ist. Je tiefer die myometriale Invasion, je stärker die Lymphknotenbeteiligung und die Metastasierung, desto höher die Heparanase-Expression (Hasengaowa et al. 2006; Inamine et al. 2008; Watanabe et al. 2003). Die Beteiligung von Heparanase an der Tumorprogression wird so deutlich.

Die vorliegende Arbeit zeigt im Gewebe von Endometriumkarzinom die niedrigste Expression von Heparanase im Vergleich zu den anderen Geweben. Die Expression im normalen Endometrium war etwas höher. Dass sich dieses Ergebnis nicht mit der aktuellen Studienlage deckt, könnte folgende Ursachen haben. Zum einen wurden nicht ausschließlich weit fortgeschrittene Tumorproben untersucht. Wie bereits erwähnt wurde eine erhöhte Expression von Heparanase in fortgeschrittenen Karzinomproben gefunden. Des Weiteren wurde die Zyklusphase bei den Endometriumproben nicht berücksichtigt. Retrospektiv ist eine solche Zuordnung nicht mehr möglich.

In der vorliegenden Arbeit konnte die höchste Expression von Heparanase im Endometriosegewebe detektiert werden. Jedoch ließ sich im statistischen Testverfahren keine Signifikanz im Vergleich zur Expression in den anderen Geweben nachweisen. Der Expressionsunterschied, insbesondere zum Endometrium, könnte jedoch darauf hindeuten, dass die Ausbreitung der Endometriose, in Bezug auf die Degradierung der extrazellulären Matrix mit der Expression von Heparanase im Zusammenhang steht. Eine Degradierung der extrazellulären Matrix ist wichtig um eine Invasion von Endometriumherden zu gewährleisten (Jingting et al. 2008). Eventuell würde ein Vergleich zwischen Endometriose und ausschließ-

lich höhergradigen Karzinomproben ein ähnliche Expression aufweisen, was zeigen würde, das die Ausbreitung der Endometriose pathogenetisch der Tumorausbreitung ähnelt. Diese These wird durch eine Studie gestützt, die zeigte dass Heparanase in eutopen und ektopen Endometriosegewebe signifikant höher exprimiert wird als in gesunden Endometrium. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Expression von Heparanase mit dem Schweregrad der Endometriose korreliert. Im Gegensatz zum Endometriumgewebe ist die Expression im Endometriosegewebe nicht zyklusabhängig (Jingting et al. 2008). Immunhistochemisch konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass im ektopen Endometriosegewebe ein starke Heparanase-Aktivität vorliegt. Der Nachweis in gesunden Endometriumgewebe ist ebenfalls zyklusabhängig (Xu et al. 2007a). In der vorliegenden Arbeit konnte immunhistochemisch kein signifikanter Unterschied in der Heparanaseexpression im Vergleich Endometriose zu Endometrium festgestellt werden. In beiden Geweben zeigte sich ein ähnliches Reaktionsmuster. Bei den Endometrioseproben lag der Median des IRS bei 5,62 aller positiv getesteten Proben, bei den Endometriumproben bei 6,25. Demnach liegt eine mäßig starke Expression vor. Ein hoher IRS konnte in beiden Gewebearten nicht nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich ein Vorkommen des Proteins in beiden Gewebearten. Dies könnte darauf hindeuten, dass Heparanase an der Pathogenese der Endometriose beteiligt ist. Ob ein Einsatz von Heparanase als Promotor in einer *Target*-Therapie möglich ist, ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig zu bewerten.

Jedoch konnten Rein et al. (2008) zeigen, dass die Heparanase-Expression in Endometriosezelllinien, Endometriose- und Endometriumkarzinomgewebe signifikant höher ist als in Kontrollgewebe. Weiterführend wurde mittels Reportergenanalysen nachgewiesen, dass die Promotoraktivität von Heparanase in Endometriosegewebe höher ist als im Kontrollgewebe. Somit scheint sich der Promotor des Heparanase-Gens zur Steuerung einer zielgerichteten Gentherapie zu eignen (Breidenbach et al. 2007; Rein et al. 2008).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine weitere Studie, die zeigte, dass ein, mit dem Heparanase-Promotor, ausgestatteter Adenovirus ein vielversprechender Vektor für eine zeilgerichtete Gentherapie ist (Othman et al. 2008). Paupoo et al. konnten diese These nicht stützen. In ihrer Arbeit zeigte sich keine erhöhte Promotoraktivität in Endometriosezelllinien (Paupoo et al. 2010). Weitere Studien müssen demnach zeigen, in wie weit ein Einsatz von Heparanase bezüglich gentherapeutischer Optionen bei der Behandlung der Endometriose möglich ist.

4.4. CXCR4

Der Chemokin-Rezeptor 4 interagiert mit dem SDF-1, auch bekannt als CXCL12. Neben seinen Funktionen bei Entzündungsreaktionen, der Hämotopoese sowie der Embryonalzeit, ist der CXCR4/CXCL12-Komplex auch in vielen Tumorentitäten nachzuweisen (Cacina et al. 2012). Hierbei scheint CXCR4 sowohl im Tumorwachstum als auch in der Metastasierung involviert zu sein (Domanska et al. 2012). In den meisten Tumorentitäten ist der Rezeptor CXCR4 im Vergleich zu gesunden Gewebe hoch exprimiert. Sein Ligand CXCL12 zeigt jedoch eine erhöhte Expression im gesunden Gewebe. Es wird davon ausgegangen, dass es durch die erhöhte CXCR4-Expression im Tumorgewebe zur Aktivierung der Zellmigration

entlang des CXCL12-Gradienten kommt (Balkwill 2004). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von CXCL12 im Primärtumor mit einer verbesserten Prognose verknüpft ist. Man geht davon aus, dass durch die hohe Konzentration von CXCL12 CXCR4 gebunden ist und eine Migration der malignen Zellen inhibiert wird (Felix et al. 2012). Die Expression von CXCR4 in humanen Karzinomen scheint zudem mir einer schlechten Prognose verbunden zu sein (Gelmini et al. 2009).

In Bezug auf das Endometriumkarzinom konnten verschiedenste Studien eine Expression von CXCR4/CXCL12 in malignen Zellen nachweisen.

Die Expressionsrate des CXCR4/CXCL12-Komplexes korrelierte mit der Invasionstiefe des Tumors und somit mit der Prognose der Erkrankung (Tsukamoto et al. 2007). Allerdings zeigte eine weitere Studie, dass die Expression von CXCR4/SDF-1 in histologisch fortgeschrittenen Karzinomen signifikant niedriger ist (Kodama et al. 2007). Zum gleichen Ergebnis kam auch Mizokami et al. (2004).

Gelmini et al. konnten mittels Genexpressionsanalyse nachweisen, dass CXCR4 in Gewebe von Endometriumkarzinomproben hochexprimiert ist; sein Ligand CXCL12 zeigt hingegen eine geringere Expressionsrate. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses wird die Vermutung gestellt, dass die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand die Tumorprogression sowie das Metastasierungspozenzial des Endometriumkarzinoms fördert (Gelmini et al. 2009). Zudem konnte eine weitere Untersuchung zeigen, dass auch beim Endometriumkarzinom eine niedrige CXCL12-Expression mit einem besseren Outcome der Patienten korreliert (Felix et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, entgegen der oben beschriebenen Studienlage, in den Endometriumkarzinomproben eine im Vergleich zum Endometrium niedrige Expressionsrate. Augenscheinlich ist die Expression in den Karzinomproben ähnlich zu der in den Endometrioseproben. In den Endometriumproben erscheint die Expression deutlich höher. Im Mann-Whitney-U-Test konnte hier jedoch keine Signifikanz nachgewisen werden. Es ist wiederum zu berücksichtigen, das zum einen nur 27 Karzinomproben untersucht, sodass eine repräsentative Aussage nicht möglich ist. Zum anderen wurden Krankheitsstadien auch hier nicht berücksichtigt. Obwohl die Detektionsraten niedrig waren, konnte CXCR4 dennoch nachgewiesen werden. Ein Einfluss auf den Krankheitsverlauf ist denkbar. Weiterführend sollte jedoch in einer größeren Stichprobe untersucht werden, ob das Tumorstadium mit der CXCR4-Expression korreliert und ob sich dann eine signifikanter Unterschied zum Endometrium ergibt. Hierbei gilt zu beachten, dass Studien nachgewiesen haben, dass CXCR4 vor allem in der proliferativen Phase des Zyklus exprimiert wird (Laird et al. 2011). Auch dieses wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Da sich keine signifikanten Ergebnisse ermitteln ließen, wurde auf eine immunhistochemische Untersuchung verzichtet.

Vorangegangene Studien deuten an, dass CXCR4 den Verlauf der Endometriose beeinflusst, in dem die Ausbreitung sowie die Zellinvasion gefördert wird (Ruiz et al. 2010). Mehrere Studien konnten belegen, dass CXCR4 sowohl in eutopen als auch in ektopen Endometrioseherde höher exprimiert wird als im Kontrollgewebe (Furuya et al. 2007; Konno et al. 2003; Ruiz et al. 2010). Zudem konnten Konno et al. nachweisen, dass CXCR4 zusammen mit anderen Chemokinen eine entzündliche Immunreaktion hervorruft, die das Auftreten von Adhäsionen und fibrotischen Veränderungen in Endometrioseherden

begünstigt. Nach der derzeitigen Datenlage scheint der CXCR4/CXCL12-Komplex also sowohl an der Ausbreitung sowie der Invasion von endometriotischen Läsionen beteiligt zu sein.

Ob CXCR4 ein geeigneter Kandidat für eine zielgerichtete Therapie zur Behandlung der Endometriose oder des Endometriumkarzinoms ist, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht sagen. Für das Mammakarzinom scheint CXCR4 ein geeigneter Promotor für eine Adenovirus-basierte Gentherapie zu sein (Stoff-Khalili et al. 2005). Auch in Zelllinien und Gewebe vom Zervixkarzinom konnte eine erhöhte CXCR4-Promotoraktivität nachgewiesen werden (Rein et al. 2004). Dies zeigt, dass weitere Untersuchungen lohnenswert wären.

4.5. Survivin

Das Apoptose-hemmende Protein (IAP) Survivin, auch bekannt als BIRC 5, nimmt, neben seiner in der Einleitung erwähnten Funktion in der Embryonalperiode, auch bedeutenden Einfluss auf die Tumorgenese. Es schützt, durch Bindung der Apoptose-Proteine Caspase-3 und -7, die Zellen vor dem programmierten Zelltod, interagiert mit Fas/FasL sowie mit einigen Krebstherapeutika (Tamm et al. 1998). In verschiedensten humanen Tumoren konnte eine Überexpression von Survivin nachgewiesen werden (Altieri et al. 1999). In differenzierten, adulten Gewebe jedoch ist Survivin kaum nachweisbar (Ambrosini et al. 1997). Eine Ausnahme bildet das Endometriumgewebe, hier konnte Survivin in der sekretorischen Phase nachgewiesen werden (Konno et al. 2000).

Im Endometrium gesunder Frauen unterliegen die Zellen zyklus- und somit hormonabhängig der Apoptose, wodurch die Zellhomöostase aufrechterhalten wird. So konnte eine hohe Apoptoseaktivität in der späten sekretorischen Phase sowie während der Mens nachgewiesen werden, wobei die proliferative und frühe sekretorische Phase eine reduzierte Apoptoseaktivität aufzeigt (Harada et al. 2004). Dies würde das zyklusabhängige Vorkommen von Survivin im Endometrium erklären. In der vorliegenden Arbeit konnte nur eine niedrige Expressionsrate von Survivin nachgewiesen werden, jedoch wurde der Zyklus nicht berücksichtigt.

In Endometriumkarzinomgewebe sowie Zelllinien ließ sich, wie auch in anderen humanen Karzinomen, ebenfalls eine erhöhte Survivin-Expression detektieren. Diese war im Vergleich zum Endometrium signifikant höher. Zudem konnte die Zellproliferation und DNA-Synthese nach Ausschalten von Survivin gehemmt werden. Auch kam es nach Knock-out von Survivin zum Zellzyklusarrest. Wurde Survivin gehemmt, stieg in den Karzinomzellen die Apoptoserate (Ai et al. 2006). In Typ II sowie höhergradigen Karzinomen konnte eine Überexpression von Survivin gemessen werden. Die Expression von Survivin ist mit einer schlechteren Prognose für die Patienten verknüpft (Brunner et al. 2012).

Auch in der vorliegenden Arbeit ließ sich, im Vergleich zu den anderen Geweben, die höchste Expression von Survivin in den Karzinomproben nachweisen. Der Vergleich der Expressionrate zum Endometriumgewebe erwies sich im statistischen Test ein signifikanter Unterschied ($p = 0{,}000\,5$). Der Unterschied in der Expression zum Endometiosegewebe ist ebenfalls zu Gunsten der Karzinomproben signifikant ($p = 0{,}023\,0$). Unter Berücksichtigung

der aktuellen Studienlage, kann man davon ausgehen, dass Survivin den Krankheitsverlauf des Endometriumkarzinoms beeinflusst. Die Tatsache, dass Survivin in differenzierten, adulten Gewebe kaum vorkommt, macht das Gen für eine zielgerichtete Gentherapie attraktiv.

Paupoo et al. konnten belegen, dass die Survivin-Promotoraktivität in epithelialen und stromalen Endometriose-Zelllinien hoch ist. Daher scheint sich der Survivin-Promotor für eine Adenovirus-basierte Gentherapie zu eignen (Paupoo et al. 2010). Weitere Studien stützen diese These. Ueda et al. wiesen sowohl mittels qPCR als auch immunhistochemisch eine hohe Expression von Survivin in ektopen Endometriosegewebe nach. Dabei scheint die Expression von Survivin mit einer geringeren Apoptoserate sowie dem besonders invasiven Auftreten der Endometrioseherde assoziiert zu sein (Ueda et al. 2002). Zwei weitere Studien wiesen eine erhöhte Survivin-Expression in ektopen Endometrioseherden nach (Fujino et al. 2006; Goteri et al. 2005). Letztere fand Hinweise, dass eine hohe Expression von Survivin in ovariellen Endometrioseherden den Progress der Erkrankung fördert.

Auch in den vorliegenden Versuchen ließ sich eine Survivin-Expression im Endometriosegewebe nachweisen. Rein deskriptiv ist diese auch höher als im gesunden Gewebe. Eine statistische Signifikanz lässt sich jedoch nicht errechnen. Immunhistochemisch ließ sich eine mäßig starke Expression des Proteins in den Endometriosegewebe nachweisen. Der Median des IRS lag bei 5,12 aller postiven Proben. Jedoch zeigten auch 9 von 19 Proben ein negatives Ergebnis. Ähnlich gestalte es sich bei der Expression im Endometrium. Hier waren 7 von 13 Proben negativ, sonst zeigt sich auch eine mäßige Reaktion. Dies deckt sich zumindestens mit dem Ergebnis der Genexpressionsanalyse. Der Unterschied, in den hier untersuchten Endometriose- und Endometriumproben, in Bezug auf die Survivinexpression ist, nach den vorliegenden Ergebnissen, als gering einzustufen. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Survivin-Expression in roten Endometrioseherden höher ist, als in schwarzen Läsionen (Fujino et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass die histologische Ausprägung der Endometriose mit der Survivin-Expression zusammenhängt. In weiteren Untersuchungen könnte also eine genaue histologische Differenzierung weiterhelfen. Survivin scheint, nach aktueller Datenlage, in der Pathogenese der Endometriose, ähnlich zum Endometriumkarzinom, eine zentrale Rolle zu spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern dies, wenn auch einige Punkte, wie zum Beispiel Krankheitsstadium und Zyklusabhängigkeit nicht berücksichtigt wurden. Dennoch ist besonders die Expression in den Karzinomproben besonders zu erwähnen. Wie oben beschrieben, konnte Survivin eine Eignung als Promotor für eine zielgerichtete Therapie zugesprochen werden. Eine genauere Untersuchung dahingehend scheint erfolgversprechend zu sein.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

Im folgenden Abschnitt soll die Methodik der vorliegenden Arbeit diskutiert sowie die Ergebnisse nochmals zusammengefasst werden.

In der Auswertung der qPCR zeigte sich eine sehr hohe Streubreite. Dies könnte gegebenfalls auf inhomogenes Probenmaterial zurückgeführt werden. Letzteres wird dadurch deutlich, dass der Standardfehler in den Zelllinien niedriger ist. Es könnte fraglich auch eine zyklusabhängige Expression der betreffenden Marker vorliegen. Jedoch ist eine solche Frage schwer zu beantworten, denn eine Expressionsanalyse unter Berücksichtigung des Zykluszeitraums, sprich Entnahme von Gewebeproben und deren Analyse im Zusammenhang mit dem Zyklusstadium, ist kaum zu realisieren.

Ziel der Arbeit war es, mögliche Promotoren für eine zielgerichtete Therapie zur Behandlung der Endometriose sowie des Endometriumkarzinoms zu identifizieren.

VEGF zeigte die höchste Expressionsrate in den Karzinomproben, diese erwies sich im Vergleich zu den Endometrioseproben als signifikant höher ($p = 0{,}030\,1$), im Vergleich zum Endometrium konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. Immunhistochemisch ließ sich sowohl im Endometriose- als auch im Endometriumgewebe eine mäßige Expression nachweisen.

Die Ergebnisse der Midkineexpression zeigten eine sehr hohe Streubreite. Die höchste Expressionsrate zeigt sich im Endometriosegewebe. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich Endometriose zu Endometriumkarzinom ($p = 0{,}010$). In den Endometriumkarzinomproben war die Expression am geringsten. Immunhistochemisch konnte nur eine geringe Midkineexpression in den Endometrioseproben nachgewiesen werden. Die Expression im Endometrium war mäßig stark.

Die Heparanase-Expression ergab in den Karzinomproben den niedrigsten Wert. Die Expression im Endometriosegewebe war am höchsten, jedoch ergibt sich keine Signifikanz. Verglichen mit dem Endometrium war das Gen in den Endometrioseproben höher exprimiert. Immunhistochemisch zeigte sich in beiden Geweben, Endometriose und Endometrium, eine mäßige Expression.

Für CXCR4 konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Geweben nachgewiesen werden. Hier zeigte sich im Endometrium die höchste und in den restlichen Geweben eine vergleichsweise niedrige Expressionsrate.

Die Survivin-Expression in den Karzinomproben war verglichen mit den anderen Geweben am höchsten. Der Vergleich zum Endometrium erwies sich als signifikant ($p = 0{,}000\,5$), ebenfalls zu den Endometrioseproben ($p = 0{,}023\,0$). Insgesamt zeigten die Endometriumproben die niedrigste Expression. Immunhistochemisch konnte in den Endometrioseproben nur eine mäßige Expression gezeigt werden, ebenso in den Endometriumproben.

Zielgerichtete Therapien sind ein erfolgsversprechender Ansatz zur Behandlung vor allem fortgeschrittener Tumorleiden und in der modernen Medizin weit verbreitet. Eine Entwicklung einer zielgerichteten Therapie im Bereich der Endometriose und des Endometriumkarzinoms ist denkbar. Wie oben beschrieben, zeigen die Proben eine hohe Streubreite. Eine zyklusabhängige Expression der Zielgene wurde diskutiert. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen scheint eine zielgerichtete Therapie zur Behandlung der

Endometriose schwierig zu sein. Trotz der, laut ausführlicher Literaturecherche, vielversprechenden Kandidaten, konnte hier kein geeigneter Promotor für eine solche Therapie sicher identifiziert werden.

Für das Endometriumkarzinom jedoch konnte Survivin als möglicher Promotor zur Entwicklung einer zielgerichteten Therapie herausgearbeitet werden. Denn hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl im Vergleich zum Endometrium als auch im Vergleich zur Endometriose.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erste Hinweise zur Selektion geeigneter Promotoren für eine zielgerichtete Therapie erarbeitet werden konnten, zukünftig erfolgsversprechende Kandidaten in größeren Studien validiert werden müssen.

Literaturverzeichnis

[**Bio 2004**] *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.* Applied Biosystems, 2004

[**Qia 2006**] *QuantiTect® Primer Assay Handbook.* Qiagen, 2006

[**Ai et al. 2006**] Ai, Zhihong ; Yin, Lianhua ; Zhou, Xianrong ; Zhu, Ying ; Zhu, Dongmei ; Yu, Yinhua ; Feng, Youji: Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer. In: *Cancer* 107 (2006), Aug, Nr. 4, S. 746–56. http://dx.doi.org/10.1002/cncr.22044. – DOI 10.1002/cncr.22044

[**Akhmedkhanov et al. 2001**] Akhmedkhanov, A ; Zeleniuch-Jacquotte, A ; Toniolo, P: Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. In: *Ann N Y Acad Sci* 943 (2001), Sep, S. 296–315

[**Altieri et al. 1999**] Altieri, D C. ; Marchisio, P C. ; Marchisio, C: Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. In: *Lab Invest* 79 (1999), Nov, Nr. 11, S. 1327–33

[**Ambrosini et al. 1997**] Ambrosini, G ; Adida, C ; Altieri, D C.: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. In: *Nat Med* 3 (1997), Aug, Nr. 8, S. 917–21

[**AWMF 2002**] AWMF: *Leitlinie Onkologie/Gynäkologie: Endometriumkarzinom.* Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2002

[**Balkwill 2004**] Balkwill, Fran: The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. In: *Semin Cancer Biol* 14 (2004), Jun, Nr. 3, S. 171–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2003.10.003. – DOI 10.1016/j.semcancer.2003.10.003

[**Ballestrero et al. 2008**] Ballestrero, Alberto ; Boy, Davide ; Moran, Eva ; Cirmena, Gabriella ; Brossart, Peter ; Nencioni, Alessio: Immunotherapy with dendritic cells for cancer. In: *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2008), Jan, Nr. 2, S. 173–83. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.026. – DOI 10.1016/j.addr.2007.08.026

[**Bauerschmitz et al. 2002**] Bauerschmitz, Gerd J. ; Barker, Shannon D. ; Hemminki, Akseli: Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review). In: *Int J Oncol* 21 (2002), Dec, Nr. 6, S. 1161–74

[**Bauerschmitz u. Dall 2004**] Bauerschmitz, Gerd J. ; Dall, Peter: CRAd-Viren: Selektive intratumorale Replikation und Onkolyse. In: *Gynäkologe* 37 (2004), Nr. 237–243

[**Bauerschmitz et al. 2004**] Bauerschmitz, Gerd J. ; Kanerva, Anna ; Wang, Minghui ; Herrmann, Isabell ; Shaw, Denise R. ; Strong, Theresa V. ; Desmond, Renee ; Rein, Daniel T. ; Dall, Peter ; Curiel, David T. ; Hemminki, Akseli: Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer. In: *Int J Cancer* 111 (2004), Aug, Nr. 2, S. 303–9. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20217. – DOI 10.1002/ijc.20217

[**Bloski u. Pierson 2008**] Bloski, T ; Pierson, R: Endometriosis and Chronic Pelvic Pain. In: *Nurs Womens Health* 12 (2008), Oct, Nr. 5, S. 382–395

[**Bokhman 1983**] Bokhman, J V.: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. In: *Gynecol Oncol* 15 (1983), Feb, Nr. 1, S. 10–7

[**Bourlev et al. 2006**] Bourlev, V ; Volkov, N ; Pavlovitch, S ; Lets, N ; Larsson, A ; Olovsson, M: The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. In: *Reproduction* 132 (2006), Sep, Nr. 3, S. 501–9. http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.01110. – DOI 10.1530/rep.1.01110

[**Breidenbach et al. 2007**] Breidenbach, M ; Schmidt, T ; Grewe, H ; Blum, R ; Rath, W ; Rein, D: Untersuchung der Midkine-, Heparanase- und VEGF-Expression zur Entwicklung einer Gentherapie der Endometriose. In: *Geburtsh Frauenheilk* 67 (2007)

[**Breidenbach et al. 2006**] Breidenbach, Martina ; Rein, Daniel T. ; Schöndorf, Thomas ; Khan, Kiran N. ; Herrmann, Isabell ; Schmidt, Torsten ; Reynolds, Paul N. ; Vlodavsky, Israel ; Haviv, Yosef S. ; Curiel, David T.: A new targeting approach for breast cancer gene therapy using the Heparanase promoter. In: *Cancer Lett* 240 (2006), Aug, Nr. 1, S. 114–22. http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2005.09.007. – DOI 10.1016/j.canlet.2005.09.007

[**Brinton et al. 1992**] Brinton, L A. ; Berman, M L. ; Mortel, R ; Twiggs, L B. ; Barrett, R J. ; Wilbanks, G D. ; Lannom, L ; Hoover, R N.: Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. In: *Am J Obstet Gynecol* 167 (1992), Nov, Nr. 5, S. 1317–25

[**Brunner et al. 2012**] Brunner, A ; Riss, P ; Heinze, G ; Brustmann, H: pHH3 and survivin are co-expressed in high-risk endometrial cancer and are prognostic relevant. In: *Br J Cancer* 107 (2012), Jun, Nr. 1, S. 84–90. http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.198. – DOI 10.1038/bjc.2012.198

[**Burney u. Giudice 2012**] Burney, Richard O. ; Giudice, Linda C.: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. In: *Fertil Steril* (2012), Jul. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029. – DOI 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029

[**Cacina et al. 2012**] Cacina, Canan ; Bulgurcuoglu-Kuran, Sibel ; Iyibozkurt, Ahmet C. ; Yaylim-Eraltan, Ilhan ; Cakmakoglu, Bedia: Genetic variants of SDF-1 and CXCR4 genes in endometrial carcinoma. In: *Mol Biol Rep* 39 (2012), Feb, Nr. 2, S. 1225–9. http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-0852-9. – DOI 10.1007/s11033–011–0852–9

[**Canis et al. 1997**] Canis, Michel ; Donnez, Jacques G. ; Guzick, David S. ; Halme, Jouko K. ; Rock, John A. ; Schenken, Robert S. ; Vernon, Michael W.: Revised

American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. In: *Fertil Steril* 67 (1997), May, Nr. 5, S. 817–21

[**Chang et al. 2010**] Chang, Da-Young ; Yoo, Seung-Wan ; Hong, Youngtae ; Kim, Sujeong ; Kim, Se J. ; Yoon, Sung-Hwa ; Cho, Kyung-Gi ; Paek, Sun H. ; Lee, Young-Don ; Kim, Sung-Soo ; Suh-Kim, Haeyoung: The growth of brain tumors can be suppressed by multiple transplantation of mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase. In: *Int J Cancer* 127 (2010), Oct, Nr. 8, S. 1975–83. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25383. – DOI 10.1002/ijc.25383

[**Chomczynski u. Sacchi 1987**] Chomczynski, P ; Sacchi, N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Anal Biochem* 162 (1987), Apr, Nr. 1, S. 156–9. http://dx.doi.org/10.1006/abio.1987.9999. – DOI 10.1006/abio.1987.9999

[**Choudhuri et al. 1997**] Choudhuri, R ; Zhang, H T. ; Donnini, S ; Ziche, M ; Bicknell, R: An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. In: *Cancer Res* 57 (1997), May, Nr. 9, S. 1814–9

[**Chung et al. 2002**] Chung, Hye W. ; Wen, Yan ; Choi, Eun A. ; Hao-Li ; Moon, Hye S. ; Yu, Han-Ki ; Polan, Mary L.: Pleiotrophin (PTN) and midkine (MK) mRNA expression in eutopic and ectopic endometrium in advanced stage endometriosis. In: *Mol Hum Reprod* 8 (2002), Apr, Nr. 4, S. 350–5

[**DGGG 2011**] DGGG: *Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms*. Kommission Uterus der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e. V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e. V., 2011

[**Diedrich et al. 2007**] Diedrich, Klaus ; Holzgreve, Wolfgang ; Jonat, W ; Schulte-Moskau ; Schneider, K ; Weiss, Jürgen D: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer, 2007

[**Dohi et al. 2004**] Dohi, Takehiko ; Beltrami, Elena ; Wall, Nathan R. ; Plescia, Janet ; Altieri, Dario C.: Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. In: *J Clin Invest* 114 (2004), Oct, Nr. 8, S. 1117–27. http://dx.doi.org/10.1172/JCI22222. – DOI 10.1172/JCI22222

[**Domanska et al. 2012**] Domanska, Urszula M. ; Kruizinga, Roeliene C. ; Nagengast, Wouter B. ; Timmer-Bosscha, Hetty ; Huls, Gerwin ; Vries, Elisabeth G E. ; Walenkamp, Annemiek M E.: A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. In: *Eur J Cancer* (2012), Jun. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.005. – DOI 10.1016/j.ejca.2012.05.005

[**Donnez et al. 1998**] Donnez, J ; Smoes, P ; Gillerot, S ; Casanas-Roux, F ; Nisolle, M: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. In: *Hum Reprod* 13 (1998), Jun, Nr. 6, S. 1686–90

[**DuBeshter et al. 2003**] DuBeshter, Brent ; Deuel, Colleen ; Gillis, Shaun ; Glantz, Christopher ; Angel, Cynthia ; Guzick, David: Endometrial cancer: the potential role of cervical cytology in current surgical staging. In: *Obstet Gynecol* 101 (2003), Mar, Nr. 3, S. 445–50

[**Elit 2000**] Elit, L: Endometrial cancer. Prevention, detection, management, and follow up. In: *Can Fam Physician* 46 (2000), Apr, S. 887–92

[**Farquhar 2007**] Farquhar, Cynthia: Endometriosis. In: *British Medical Journal* 334 (2007), Feb, Nr. 7587, S. 249–53. http://dx.doi.org/10.1136/bmj.39073.736829.BE. – DOI 10.1136/bmj.39073.736829.BE

[**Felix et al. 2012**] Felix, Ashley S. ; Stone, Roslyn A. ; Chivukula, Mamatha ; Bowser, Robert ; Parwani, Anil V. ; Linkov, Faina ; Edwards, Robert P. ; Weissfeld, Joel L.: Survival outcomes in endometrial cancer patients are associated with CXCL12 and estrogen receptor expression. In: *Int J Cancer* 131 (2012), Jul, Nr. 2, S. E114–21. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27317. – DOI 10.1002/ijc.27317

[**Felix et al. 2010**] Felix, Ashley S. ; Weissfeld, Joel L. ; Stone, Roslyn A. ; Bowser, Robert ; Chivukula, Mamatha ; Edwards, Robert P. ; Linkov, Faina: Factors associated with Type I and Type II endometrial cancer. In: *Cancer Causes Control* 21 (2010), Nov, Nr. 11, S. 1851–6. http://dx.doi.org/10.1007/s10552-010-9612-8. – DOI 10.1007/s10552–010–9612–8

[**Feng et al. 1996**] Feng, Y ; Broder, C C. ; Kennedy, P E. ; Berger, E A.: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. In: *Science* 272 (1996), May, Nr. 5263, S. 872–7

[**Ferrara u. Davis-Smyth 1997**] Ferrara, N ; Davis-Smyth, T: The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. In: *Endocr Rev* 18 (1997), Feb, Nr. 1, S. 4–25

[**Ferrero et al. 2006**] Ferrero, S ; Ragni, N ; Remorgida, V: Antiangiogenic therapies in endometriosis. In: *Br J Pharmacol* 149 (2006), Sep, Nr. 2, S. 133–5. http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706860. – DOI 10.1038/sj.bjp.0706860

[**Fujino et al. 2006**] Fujino, Kuniko ; Ueda, Masatsugu ; Takehara, Mikio ; Futakuchi, Hikari ; Kanda, Koji ; Yamashita, Yoshiki ; Terai, Yoshito ; Ueki, Minoru: Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis. In: *Mol Hum Reprod* 12 (2006), Jun, Nr. 6, S. 383–8. http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gal042. – DOI 10.1093/molehr/gal042

[**Furuya et al. 2007**] Furuya, Mitsuko ; Suyama, Takahito ; Usui, Hirokazu ; Kasuya, Yoshitoshi ; Nishiyama, Mariko ; Tanaka, Naotake ; Ishiwata, Isamu ; Nagai, Yuichiro ; Shozu, Makio ; Kimura, Sadao: Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. In: *Hum Pathol* 38 (2007), Nov, Nr. 11, S. 1676–87. http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2007.03.023. – DOI 10.1016/j.humpath.2007.03.023

[**García-Manero et al. 2008**] García-Manero, Manuel ; Santana, Gemma T. ; Alcázar, Juan L.: Relationship between Microvascular Density and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Ovarian Endometriosis. In: *J Womens Health (Larchmt)* 17 (2008), Jun, Nr. 5, S. 777–82. http://dx.doi.org/10.1089/jwh.2007.0695. – DOI 10.1089/jwh.2007.0695

[**Gazvani u. Templeton 2002**] Gazvani, Rafet ; Templeton, Allan: Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. In: *Reproduction* 123 (2002), Feb, Nr. 2, S. 217–26

[**Gebel et al. 1998**] Gebel, H M. ; Braun, D P. ; Tambur, A ; Frame, D ; Rana, N ; Dmowski, W P.: Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. In: *Fertil Steril* 69 (1998), Jun, Nr. 6, S. 1042–7

[**Gelmini et al. 2009**] Gelmini, Stefania ; Mangoni, Monica ; Castiglione, Francesca ; Beltrami, Cristina ; Pieralli, Annalisa ; Andersson, Karin L. ; Fambrini, Massimiliano ; Taddei, Gian L. ; Serio, Mario ; Orlando, Claudio: The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. In: *Clin Exp Metastasis* 26 (2009), Nr. 3, S. 261–8. http://dx.doi.org/10.1007/s10585-009-9240-4. – DOI 10.1007/s10585–009–9240–4

[**Giudice 2003**] Giudice, Linda C.: Genomics' role in understanding the pathogenesis of endometriosis. In: *Semin Reprod Med* 21 (2003), May, Nr. 2, S. 119–24. http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-41318. – DOI 10.1055/s–2003–41318

[**Giudice 2010**] Giudice, Linda C.: Clinical practice. Endometriosis. In: *N Engl J Med* 362 (2010), Jun, Nr. 25, S. 2389–98. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcp1000274. – DOI 10.1056/NEJMcp1000274

[**Giudice u. Kao 2004**] Giudice, Linda C. ; Kao, Lee C.: Endometriosis. In: *Lancet* 364 (2004), Nr. 9447, S. 1789–99. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17403-5. – DOI 10.1016/S0140–6736(04)17403–5

[**Goldshmidt et al. 2002**] Goldshmidt, Orit ; Zcharia, Eyal ; Abramovitch, Rinat ; Metzger, Shula ; Aingorn, Helena ; Friedmann, Yael ; Schirrmacher, Volker ; Mitrani, Eduardo ; Vlodavsky, Israel: Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Jul, Nr. 15, S. 10031–6. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.152070599. – DOI 10.1073/pnas.152070599

[**Goteri et al. 2005**] Goteri, Gaia ; Lucarini, Guendalina ; Pieramici, Tiziana ; Filosa, Alessandra ; Pugnaloni, Armanda ; Montik, Nina ; Biagini, Graziella ; Tranquilli, Andrea L. ; Fabris, Guidalberto ; Ciavattini, Andrea ; Lo Muzio, Lorenzo: Endothelial cell survivin is involved in the growth of ovarian endometriotic cysts. In: *Anticancer Res* 25 (2005), Nr. 6B, S. 4313–8

[**Graubert et al. 2001**] Graubert, M D. ; Ortega, M A. ; Kessel, B ; Mortola, J F. ; Iruela-Arispe, M L.: Vascular repair after menstruation involves regulation of vascular endothelial growth factor-receptor phosphorylation by sFLT-1. In: *Am J Pathol* 158 (2001), Apr, Nr. 4, S. 1399–410

[**Grossman et al. 2001**] Grossman, D ; Kim, P J. ; Schechner, J S. ; Altieri, D C.: Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), Jan, Nr. 2, S. 635–40. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.230450097. – DOI 10.1073/pnas.230450097

[**Gupta et al. 2002**] Gupta, Janesh K. ; Chien, Patrick F W. ; Voit, Doris ; Clark, T J. ; Khan, Khalid S.: Ultrasonographic endometrial thickness for diagnosing endometrial pathology in women with postmenopausal bleeding: a meta-analysis. In: *Acta Obstet Gynecol Scand* 81 (2002), Sep, Nr. 9, S. 799–816

[**Haas et al. 2011**] Haas, Dietmar ; Chvatal, Radek ; Habelsberger, Alwin ; Wurm, Peter ; Schimetta, Wolfgang ; Oppelt, Peter: Comparison of revised American Fertility Society and ENZIAN staging: a critical evaluation of classifications of endometriosis on the basis of our patient population. In: *Fertil Steril* 95 (2011), Apr, Nr. 5, S. 1574–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.01.135. – DOI 10.1016/j.fertnstert.2011.01.135

[**Hadfield et al. 1996**] Hadfield, R ; Mardon, H ; Barlow, D ; Kennedy, S: Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. In: *Hum Reprod* 11 (1996), Apr, Nr. 4, S. 878–80

[**Halme et al. 1984**] Halme, J ; Hammond, M G. ; Hulka, J F. ; Raj, S G. ; Talbert, L M.: Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. In: *Obstet Gynecol* 64 (1984), Aug, Nr. 2, S. 151–4

[**Harada et al. 2004**] Harada, T ; Kaponis, A ; Iwabe, T ; Taniguchi, F ; Makrydimas, G ; Sofikitis, N ; Paschopoulos, M ; Paraskevaidis, E ; Terakawa, N: Apoptosis in human endometrium and endometriosis. In: *Hum Reprod Update* 10 (2004), Nr. 1, S. 29–38

[**Hardy 1999**] Hardy, K: Apoptosis in the human embryo. In: *Rev Reprod* 4 (1999), Sep, Nr. 3, S. 125–34

[**Hasengaowa et al. 2006**] Hasengaowa ; Kodama, J ; Kusumoto, T ; Seki, N ; Matsuo, T ; Ojima, Y ; Nakamura, K ; Hongo, A ; Hiramatsu, Y: Heparanase expression in both normal endometrium and endometrial cancer. In: *Int J Gynecol Cancer* 16 (2006), Nr. 3, S. 1401–6. http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00614.x. – DOI 10.1111/j.1525–1438.2006.00614.x

[**Hassan et al. 2011**] Hassan, Saima ; Buchanan, Marguerite ; Jahan, Kaushar ; Aguilar-Mahecha, Adriana ; Gaboury, Louis ; Muller, William J. ; Alsawafi, Yaqoob ; Mourskaia, Anna A. ; Siegel, Peter M. ; Salvucci, Ombretta ; Basik, Mark: CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model. In: *Int J Cancer* 129 (2011), Jul, Nr. 1, S. 225–32. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25665. – DOI 10.1002/ijc.25665

[**Hinkula et al. 2002**] Hinkula, Marianne ; Pukkala, Eero ; Kyyrönen, Pentti ; Kauppila, Antti: Grand multiparity and incidence of endometrial cancer: a population-based study in Finland. In: *Int J Cancer* 98 (2002), Apr, Nr. 6, S. 912–5

[**Hirota et al. 2005**] Hirota, Yasushi ; Osuga, Yutaka ; Koga, Kaori ; Yoshino, Osamu ; Hirata, Tetsuya ; Harada, Miyuki ; Morimoto, Chieko ; Yano, Tetsu ; Tsutsumi, Osamu ; Sakuma, Sadatoshi ; Muramatsu, Takashi ; Taketani, Yuji: Possible implication of midkine in the development of endometriosis. In: *Hum Reprod* 20 (2005), Apr, Nr. 4, S. 1084–9. http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh720. – DOI 10.1093/humrep/deh720

[**van der Horst et al. 2008**] Horst, Edward H. d. ; Frank, Brendon T. ; Chinn, Lawrence ; Coxon, Angela ; Li, Shyun ; Polesso, Fanny ; Slavin, Anthony ; Ruefli-Brasse, Astrid ; Wesche, Holger: The growth factor Midkine antagonizes VEGF signaling in vitro and in vivo. In: *Neoplasia* 10 (2008), Apr, Nr. 4, S. 340–7

[**Hulett et al. 1999**] Hulett, M D. ; Freeman, C ; Hamdorf, B J. ; Baker, R T. ; Harris, M J. ; Parish, C R.: Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. In: *Nat Med* 5 (1999), Jul, Nr. 7, S. 803–9. http://dx.doi.org/10.1038/10525. – DOI 10.1038/10525

[**Hull et al. 2003**] Hull, M L. ; Charnock-Jones, D S. ; Chan, Clement L K. ; Bruner-Tran, Kaylon L. ; Osteen, Kevin G. ; Tom, Brian D M. ; Fan, Tai-Ping D. ; Smith, Stephen K.: Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. In: *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003), Jun, Nr. 6, S. 2889–99

[**Inamine et al. 2008**] Inamine, M ; Nagai, Y ; Hirakawa, M ; Mekaru, K ; Yagi, C ; Masamoto, H ; Aoki, Y: Heparanase expression in endometrial cancer: analysis of immunohistochemistry. In: *J Obstet Gynaecol* 28 (2008), Aug, Nr. 6, S. 634–7. http://dx.doi.org/10.1080/01443610802323542. – DOI 10.1080/01443610802323542

[**Inoh et al. 2004**] Inoh, Kazuhiko ; Muramatsu, Hisako ; Ochiai, Keiko ; Torii, Shuhei ; Muramatsu, Takashi: Midkine, a heparin-binding cytokine, plays key roles in intraperitoneal adhesions. In: *Biochem Biophys Res Commun* 317 (2004), Apr, Nr. 1, S. 108–13. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.015. – DOI 10.1016/j.bbrc.2004.03.015

[**Iwasaki et al. 1997**] Iwasaki, W ; Nagata, K ; Hatanaka, H ; Inui, T ; Kimura, T ; Muramatsu, T ; Yoshida, K ; Tasumi, M ; Inagaki, F: Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor. In: *EMBO J* 16 (1997), Dec, Nr. 23, S. 6936–46. http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.23.6936. – DOI 10.1093/emboj/16.23.6936

[**Jingting et al. 2008**] Jingting, Cai ; Yangde, Zhang ; Yi, Zhang ; Mengxiong, Li ; Rong, Yu ; Yu, Zhang ; Guoqing, Peng ; Lixiu, Peng: Expression of heparanase and angiopoietin-2 in patients with endometriosis. In: *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 136 (2008), Feb, Nr. 2, S. 199–209. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.09.018. – DOI 10.1016/j.ejogrb.2006.09.018

[**Johanna et al. 2010**] Johanna, Silke ; Santia, Alessandro ; Güntherta, Andreas ; Lösslb, Kristina ; Aebia, Stefan ; Muellera, Michael D.: Das Endometriumkarzinom – Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In: *Schweiz Med Forum* 10 (2010), Nr. 7, S. 129–133

[**Kamat et al. 2007**] Kamat, Aparna A. ; Merritt, William M. ; Coffey, Donna ; Lin, Yvonne G. ; Patel, Pooja R. ; Broaddus, Russell ; Nugent, Elizabeth ; Han, Liz Y. ; Landen, Charles N. Jr ; Spannuth, Whitney A. ; Lu, Chunhua ; Coleman, Robert L. ; Gershenson, David M. ; Sood, Anil K.: Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. In: *Clin Cancer Res* 13 (2007), Dec, Nr. 24, S. 7487–95. http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1017. – DOI 10.1158/1078–0432.CCR–07–1017

[**Kawamura et al. 2003**] Kawamura, Kazuhiro ; Sato, Naoki ; Fukuda, Jun ; Kodama, Hideya ; Kumagai, Jin ; Tanikawa, Hideo ; Shimizu, Yasushi ; Tanaka, Toshinobu: Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. In: *Dev Biol* 256 (2003), Apr, Nr. 2, S. 331–41

[**Kodama et al. 2007**] Kodama, J ; Hasengaowa ; Seki, N ; Kusumoto, T ; Hiramatsu, Y: Expression of the CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in human endometrial cancer. In: *Eur J Gynaecol Oncol* 28 (2007), Nr. 5, S. 370–5

[**Konno et al. 2000**] Konno, R ; Yamakawa, H ; Utsunomiya, H ; Ito, K ; Sato, S ; Yajima, A: Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. In: *Mol Hum Reprod* 6 (2000), Jun, Nr. 6, S. 529–34

[**Konno et al. 2003**] Konno, Ryo ; Yamada-Okabe, Hisafumi ; Fujiwara, Hiroyuki ; Uchiide, Ichiro ; Shibahara, Hiroaki ; Ohwada, Michitaka ; Ihara, Tomomi ; Sugamata, Masao ; Suzuki, Mitsuaki: Role of immunoreactions and mast cells in pathogenesis of human endometriosis–morphologic study and gene expression analysis–morphologic study and gene expression analysis. In: *Hum Cell* 16 (2003), Sep, Nr. 3, S. 141–9

[**Kruitwagen et al. 1991**] Kruitwagen, R F. ; Poels, L G. ; Willemsen, W N. ; Ronde, I J. ; Jap, P H. ; Rolland, R: Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. In: *Fertil Steril* 55 (1991), Feb, Nr. 2, S. 297–303

[**Kuil et al. 2012**] Kuil, Joeri ; Buckle, Tessa ; Leeuwen, Fijs W B.: Imaging agents for the chemokine receptor 4 (CXCR4). In: *Chem Soc Rev* 41 (2012), Aug, Nr. 15, S. 5239–61. http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35085h. – DOI 10.1039/c2cs35085h

[**Kurtz et al. 1995**] Kurtz, A ; Schulte, A M. ; Wellstein, A: Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. In: *Crit Rev Oncog* 6 (1995), Nr. 2, S. 151–77

[**Kyama et al. 2003**] Kyama, Cleophas M. ; Debrock, Sophie ; Mwenda, Jason M. ; D'Hooghe, Thomas M.: Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. In: *Reprod Biol Endocrinol* 1 (2003), Dec, S. 123. http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-1-123. – DOI 10.1186/1477–7827–1–123

[**Laird et al. 2011**] Laird, S M. ; Widdowson, R ; El-Sheikhi, M ; Hall, A J. ; Li, T C.: Expression of CXCL12 and CXCR4 in human endometrium; effects of CXCL12 on MMP production by human endometrial cells. In: *Hum Reprod* 26 (2011), May, Nr. 5, S. 1144–52. http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der043. – DOI 10.1093/humrep/der043

[**Li u. Brattain 2006**] Li, Fengzhi ; Brattain, Michael G.: Role of the Survivin Gene in Pathophysiology. In: *Am J Pathol* 169 (2006), Jul, Nr. 1, S. 1–11. http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.060121. – DOI 10.2353/ajpath.2006.060121

[**Liang et al. 2007**] Liang, Zhongxing ; Brooks, Joann ; Willard, Margaret ; Liang, Ke ; Yoon, Younghyoun ; Kang, Seunghee ; Shim, Hyunsuk: CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. In: *Biochem Biophys Res Commun* 359 (2007), Aug, Nr. 3, S. 716–22. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.182. – DOI 10.1016/j.bbrc.2007.05.182

[**Madison et al. 2004**] Madison, Terri ; Schottenfeld, David ; James, Sherman A. ; Schwartz, Ann G. ; Gruber, Stephen B.: Endometrial cancer: socioeconomic status and racial/ethnic differences in stage at diagnosis, treatment, and survival. In: *Am J Public Health* 94 (2004), Dec, Nr. 12, S. 2104–11

[**McLaren 2000**] McLaren, J: Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. In: *Hum Reprod Update* 6 (2000), Nr. 1, S. 45–55

[**McLaren et al. 1996**] McLaren, J ; Prentice, A ; Charnock-Jones, D S. ; Millican, S A. ; Müller, K H. ; Sharkey, A M. ; Smith, S K.: Vascular Endothelial Growth Factor is Produced by Peritoneal Fluid Macrophages in Endometriosis and is Regulated by Ovarian Steroids. In: *J Clin Invest* 98 (1996), Jul, Nr. 2, S. 482–9. http://dx.doi.org/10.1172/JCI118815. – DOI 10.1172/JCI118815

[**Meyer 1919**] Meyer, R.: Über den Stand der Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sacromatosa. In: *Zentralbla Gynäkol* 36 (1919), S. 745–750

[**Mizokami et al. 2004**] Mizokami, Yayoi ; Kajiyama, Hiroaki ; Shibata, Kiyosumi ; Ino, Kazuhiko ; Kikkawa, Fumitaka ; Mizutani, Shigehiko: Stromal cell-derived factor-1alpha-induced cell proliferation and its possible regulation by CD26/dipeptidyl peptidase IV in endometrial adenocarcinoma. In: *Int J Cancer* 110 (2004), Jul, Nr. 5, S. 652–9. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20183. – DOI 10.1002/ijc.20183

[**Mueller et al. 2000**] Mueller, M D. ; Vigne, J L. ; Minchenko, A ; Lebovic, D I. ; Leitman, D C. ; Taylor, R N.: Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Sep, Nr. 20, S. 10972–7. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.200377097. – DOI 10.1073/pnas.200377097

[**Münstedt et al. 2004**] Münstedt, Karsten ; Grant, Phillip ; Woenckhaus, Joachim ; Roth, Gabriele ; Tinneberg, Hans-Rudolf: Cancer of the endometrium: current aspects of diagnostics and treatment. In: *World J Surg Oncol* 2 (2004), S. 24. http://dx.doi.org/10.1186/1477-7819-2-24. – DOI 10.1186/1477–7819–2–24

[**Neunhoeffer u. Lawrenz 2011**] Neunhoeffer, Eva ; Lawrenz, Barbara: Therapieoptionen der Endometriose. In: *Arzneimitteltherapie* 29 (2011), S. 35–41

[**Nezhat et al. 2008**] Nezhat, Farr ; Datta, M S. ; Hanson, Veneta ; Pejovic, Tanja ; Nezhat, Ceana ; Nezhat, Camran: The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. In: *Fertil Steril* 90 (2008), Nov, Nr. 5, S. 1559–70. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.007. – DOI 10.1016/j.fertnstert.2008.08.007

[**Nimeiri et al. 2010**] Nimeiri, Halla S. ; Oza, Amit M. ; Morgan, Robert J. ; Huo, Dezheng ; Elit, Laurie ; Knost, James A. ; Wade, James L. 3rd ; Agamah, Edem ; Vokes, Everett E. ; Fleming, Gini F.: A phase II study of sorafenib in advanced uterine carcinoma/carcinosarcoma: a trial of the Chicago, PMH, and California Phase II Consortia. In: *Gynecol Oncol* 117 (2010), Apr, Nr. 1, S. 37–40. http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.013. – DOI 10.1016/j.ygyno.2010.01.013

[**Obermair et al. 1999**] Obermair, A ; Tempfer, C ; Wasicky, R ; Kaider, A ; Hefler, L ; Kainz, C: Prognostic significance of tumor angiogenesis in endometrial cancer. In: *Obstet Gynecol* 93 (1999), Mar, Nr. 3, S. 367–71

[**O'Brien et al. 1996**] O'Brien, T ; Cranston, D ; Fuggle, S ; Bicknell, R ; Harris, A L.: The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. In: *Cancer Res* 56 (1996), Jun, Nr. 11, S. 2515–8

[**Olie et al. 2000**] Olie, R A. ; Simões-Wüst, A P. ; Baumann, B ; Leech, S H. ; Fabbro, D ; Stahel, R A. ; Zangemeister-Wittke, U: A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. In: *Cancer Res* 60 (2000), Jun, Nr. 11, S. 2805–9

[**Olive u. Schwartz 1993**] Olive, D L. ; Schwartz, L B.: Endometriosis. In: *N Engl J Med* 328 (1993), Jun, Nr. 24, S. 1759–69. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199306173282407. – DOI 10.1056/NEJM199306173282407

[**Othman et al. 2008**] Othman, Essam-Eldin R. ; Zhu, Zeng B. ; Curiel, David T. ; Khatoon, Nilufar ; Salem, Hosam T. ; Khalifa, Essam Al-Din M. ; Al-Hendy, Ayman: Toward gene therapy of endometriosis: transductional and transcriptional targeting of adenoviral vectors to endometriosis cells. In: *Am J Obstet Gynecol* 199 (2008), Aug, Nr. 2, S. 117.e1–6. http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2008.01.059. – DOI 10.1016/j.ajog.2008.01.059

[**Paupoo et al. 2010**] Paupoo, A A V. ; Zhu, Z B. ; Wang, M ; Rein, D T. ; Starzinski-Powitz, A ; Curiel, D T.: A conditionally replicative adenovirus, CRAd-S-pK7, can target endometriosis with a cell-killing effect. In: *Hum Reprod* 25 (2010), Aug, Nr. 8, S. 2068–83. http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq137. – DOI 10.1093/humrep/deq137

[**Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2006**] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine: Endometriosis and infertility. In: *Fertil Steril* 86 (2006), Nov, Nr. 5 Suppl 1, S. S156–60. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.014. – DOI 10.1016/j.fertnstert.2006.08.014

[**Prat 2004**] Prat, Jaime: Prognostic parameters of endometrial carcinoma. In: *Hum Pathol* 35 (2004), Jun, Nr. 6, S. 649–62

[**Qi et al. 2001**] Qi, M ; Ikematsu, S ; Maeda, N ; Ichihara-Tanaka, K ; Sakuma, S ; Noda, M ; Muramatsu, T ; Kadomatsu, K: Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. In: *J Biol Chem* 276 (2001), May, Nr. 19, S. 15868–75

[**R Development Core Team 2011**] R Development Core Team: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011. http://www.R-project.org. – ISBN 3-900051-07-0

[**von Recklinghausen 1896**] von Recklinghausen, F: Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the wolffian body. In: *Wien Klin Wochenschrift* 5 (1896), S. 530

[**Rein et al. 2006**] Rein, Daniel T. ; Breidenbach, M ; Curiel, David T.: Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. In: *Future Oncol* 2 (2006), Feb, Nr. 1, S. 137–43. http://dx.doi.org/10.2217/14796694.2.1.137. – DOI 10.2217/14796694.2.1.137

[**Rein et al. 2008**] Rein, Daniel T. ; Breidenbach, Martina ; Bauerschmitz, Gerd J. ; Schmidt, Torsten: Targeted Therapy der Endometriose – ein möglicher Behandlungsansatz? In: *Geburtsh Frauenheilk* 68 (2008)

[**Rein et al. 2004**] Rein, Daniel T. ; Breidenbach, Martina ; Nettelbeck, Dirk M. ; Kawakami, Yosuke ; Siegal, Gene P. ; Huh, Warner K. ; Wang, Minghui ; Hemminki, Akseli ; Bauerschmitz, Gerd J. ; Yamamoto, Masato ; Adachi, Yasuo ; Takayama, Koichi ; Dall, Peter ; Curiel, David T.: Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. In: *J Gene Med* 6 (2004), Nov, Nr. 11, S. 1281–9. http://dx.doi.org/10.1002/jgm.606. – DOI 10.1002/jgm.606

[**Rein et al. 2010a**] Rein, Daniel T. ; Schmidt, Torsten ; Bauerschmitz, Gerd ; Hampl, Monika ; Beyer, Ines M. ; Paupoo, Arasen A V. ; Curiel, David T. ; Breidenbach, Martina: Treatment of endometriosis with a VEGF-targeted conditionally replicative adenovirus. In: *Fertil Steril* 93 (2010), May, Nr. 8, S. 2687–94. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.042. – DOI 10.1016/j.fertnstert.2009.04.042

[**Rein et al. 2010b**] Rein, Daniel T. ; Schmidt, Torsten ; Bauerschmitz, Gerd ; Hampl, Monika ; Beyer, Ines M. ; Paupoo, Arasen A V. ; Curiel, David T. ; Breidenbach, Martina: Treatment of endometriosis with a VEGF-targeted conditionally replicative adenovirus. In: *Fertil Steril* 93 (2010), May, Nr. 8, S. 2687–94. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.042. – DOI 10.1016/j.fertnstert.2009.04.042

[**Remmele u. Stegner 1987**] Remmele, W ; Stegner, H E.: [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. In: *Pathologe* 8 (1987), May, Nr. 3, S. 138–40

[**Rokitansky 1860**] Rokitansky, C: Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus und Ovarialcarcinom. In: *ZKK Gesellschaft d Arzte zu Wien* 37 (1860), S. 577–584

[**Roth 2006**] Roth, Jack A.: Adenovirus p53 gene therapy. In: *Expert Opin Biol Ther* 6 (2006), Jan, Nr. 1, S. 55–61. http://dx.doi.org/10.1517/14712598.6.1.55. – DOI 10.1517/14712598.6.1.55

[**Ruiz et al. 2010**] Ruiz, Abigail ; Salvo, Virgilio A. ; Ruiz, Lynnette A. ; Báez, Perla ; García, Miosotis ; Flores, Idhaliz: Basal and steroid hormone-regulated expression of CXCR4 in human endometrium and endometriosis. In: *Reprod Sci* 17 (2010), Oct, Nr. 10, S. 894–903. http://dx.doi.org/10.1177/1933719110379920. – DOI 10.1177/1933719110379920

[**Russell 1899**] Russell, W.W.: Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: ovarian cysts of müllerian origin. In: *Bull Johns Hopkins Hospital* 10 (1899), S. 8–10

[**Salamanca u. Beltrán 1995**] Salamanca, A ; Beltrán, E: Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis. In: *Fertil Steril* 64 (1995), Jul, Nr. 1, S. 193–5

[**Sampson 1927a**] Sampson, J A.: Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. In: *Am J Pathol* 3 (1927), Mar, Nr. 2, S. 93–110.43

[**Sampson 1927b**] Sampson, J A.: Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. In: *Am J Obstet Gynecol* 14 (1927), Nr. 422

[**Sanseverino et al. 2006**] Sanseverino, Francesca ; Santopietro, Rosa ; Torricelli, Michela ; D'Andrilli, Giuseppina ; Russo, Giuseppe ; Cevenini, Gabriele ; Bovicelli, Alessandro ; Leoncini, Lorenzo ; Scambia, Giovanni ; Petraglia, Felice ; Claudio, Pier P. ; Giordano, Antonio: pRb2/p130 and VEGF expression in endometrial carcinoma in relation to angiogenesis and histopathologic tumor grade. In: *Cancer Biol Ther* 5 (2006), Jan, Nr. 1, S. 84–8

[**Sato et al. 2017**] Sato, Emi ; Nakayama, Kentaro ; Nakamura, Kohei ; Ishibashi, Tomoka ; Katagiri, Hiroshi ; Ishikawa, Masako ; Kyo, Satoru: Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond progression in patients with type II endometrial cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: A case report. In: *Molecular and Clinical Oncology* (2017), Jul. http://dx.doi.org/10.3892/mco.2017.1316. – DOI 10.3892/mco.2017.1316. – ISSN 2049–9469

[**Schreinemacher et al. 2012**] Schreinemacher, Marc H. ; Backes, Walter H. ; Slenter, Jos M. ; Xanthoulea, Sofia ; Delvoux, Bert ; Winden, Larissa van ; Beets-Tan, Regina G. ; Evers, Johannes L H. ; Dunselman, Gerard A J. ; Romano, Andrea: Towards Endometriosis Diagnosis by Gadofosveset-Trisodium Enhanced Magnetic Resonance Imaging. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 3, S. e33241. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033241. – DOI 10.1371/journal.pone.0033241

[**Semm 1983**] Semm, K: [Endoscopic intraabdominal surgery in gynecology]. In: *Wien Klin Wochenschr* 95 (1983), May, Nr. 11, S. 353–67

[**Sharkey et al. 2000**] Sharkey, A M. ; Day, K ; McPherson, A ; Malik, S ; Licence, D ; Smith, S K. ; Charnock-Jones, D S.: Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. In: *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000), Jan, Nr. 1, S. 402–9

[**Sharpe-Timms 2001**] Sharpe-Timms, K L.: Endometrial anomalies in women with endometriosis. In: *Ann N Y Acad Sci* 943 (2001), Sep, S. 131–47

[**Shifren et al. 1996**] Shifren, J L. ; Tseng, J F. ; Zaloudek, C J. ; Ryan, I P. ; Meng, Y G. ; Ferrara, N ; Jaffe, R B. ; Taylor, R N.: Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. In: *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996), Aug, Nr. 8, S. 3112–8

[**Simpson et al. 1980**] Simpson, J L. ; Elias, S ; Malinak, L R. ; Buttram, V C. Jr: Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. In: *Am J Obstet Gynecol* 137 (1980), Jun, Nr. 3, S. 327–31

[**Sivridis et al. 2002**] Sivridis, Efthimios ; Giatromanolaki, Alexandra ; Anastasiadis, Panagiotis ; Georgiou, Loukas ; Gatter, Kevin C. ; Harris, Adrian L. ; Bicknell, Roy ; Koukourakis, Michael I. ; Tumour and Angiogenesis Research Group: Angiogenic co-operation of VEGF and stromal cell TP in endometrial carcinomas. In: *J Pathol* 196 (2002), Apr, Nr. 4, S. 416–22. http://dx.doi.org/10.1002/path.1060. – DOI 10.1002/path.1060

[**Sobin et al. 2011**] Sobin, Leslie H. ; Gospodarowicz, Mary K. ; Wittekind, Christian: *TNM Classification of Malignant Tumours*. John Wiley & Sons, 2011

[**Stauber u. Weyerstrahl 2005**] Stauber, M ; Weyerstrahl, T: *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. Thieme, 2005 (2. Auflage)

[**Stoff-Khalili et al. 2005**] Stoff-Khalili, Mariam A. ; Stoff, Alexander ; Rivera, Angel A. ; Banerjee, Nilam S. ; Everts, Maaike ; Young, Scott ; Siegal, Gene P. ; Richter, Dirk F. ; Wang, Minghui ; Dall, Peter ; Mathis, J M. ; Zhu, Zeng B. ; Curiel, David T.: Preclinical evaluation of transcriptional targeting strategies for carcinoma of the breast in a tissue slice model system. In: *Breast Cancer Res* 7 (2005), Nr. 6, S. R1141–52. http://dx.doi.org/10.1186/bcr1353. – DOI 10.1186/bcr1353

[**Tamm et al. 1998**] Tamm, I ; Wang, Y ; Sausville, E ; Scudiero, D A. ; Vigna, N ; Oltersdorf, T ; Reed, J C.: IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. In: *Cancer Res* 58 (1998), Dec, Nr. 23, S. 5315–20

[**Tanabe et al. 2008**] Tanabe, Kojiro ; Matsumoto, Mitsuyo ; Ikematsu, Shinya ; Nagase, Satoru ; Hatakeyama, Atsushi ; Takano, Tadao ; Niikura, Hitoshi ; Ito, Kiyoshi ; Kadomatsu, Kenji ; Hayashi, Shin-ichi ; Yaegashi, Nobuo: Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. In: *Cancer Sci* 99 (2008), Jun, Nr. 6, S. 1125–30. http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00796.x. – DOI 10.1111/j.1349–7006.2008.00796.x

[**Tanaka et al. 2000**] Tanaka, K ; Iwamoto, S ; Gon, G ; Nohara, T ; Iwamoto, M ; Tanigawa, N: Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. In: *Clin Cancer Res* 6 (2000), Jan, Nr. 1, S. 127–34

[**Taylor u. Gomel 1995**] Taylor, P J. ; Gomel, V: Endometrial ablation: indications and preliminary diagnostic hysteroscopy. In: *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 9 (1995), Jun, Nr. 2, S. 251–60

[**Tsukamoto et al. 2007**] Tsukamoto, Hirohisa ; Shibata, Kiyosumi ; Kajiyama, Hiroaki ; Terauchi, Mikio ; Nawa, Akihiro ; Kikkawa, Fumitaka: Uterine smooth muscle cells increase invasive ability of endometrial carcinoma cells through tumor-stromal interaction. In: *Clin Exp Metastasis* 24 (2007), Nr. 6, S. 423–9. http://dx.doi.org/10.1007/s10585-007-9079-5. – DOI 10.1007/s10585–007–9079–5

[**Ueda et al. 2002**] Ueda, Masatsugu ; Yamashita, Yoshiki ; Takehara, Mikio ; Terai, Yoshito ; Kumagai, Koji ; Ueki, Ken ; Kanda, Koji ; Yamaguchi, Hiroyuki ; Akise, Daisuke ; Hung, Yao-Ching ; Ueki, Minoru: Survivin Gene Expression in Endometriosis. In: *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002), Jul, Nr. 7, S. 3452–9

[**Vinatier et al. 1996**] Vinatier, D ; Dufour, P ; Oosterlynck, D: Immunological aspects of endometriosis. In: *Hum Reprod Update* 2 (1996), Nr. 5, S. 371–84

[**Vlodavsky et al. 1999**] Vlodavsky, I ; Friedmann, Y ; Elkin, M ; Aingorn, H ; Atzmon, R ; Ishai-Michaeli, R ; Bitan, M ; Pappo, O ; Peretz, T ; Michal, I ; Spector, L ; Pecker, I: Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. In: *Nat Med* 5 (1999), Jul, Nr. 7, S. 793–802. http://dx.doi.org/10.1038/10518. – DOI 10.1038/10518

[**Vlodavsky et al. 2003**] Vlodavsky, I ; Zcharia, E ; Goldshmidt, O ; Eshel, R ; Katz, B-Z ; Minucci, S ; Kovalchuk, O ; Penco, S ; Pisano, C ; Naggi, A ; Casu, B: Involvement of heparanase in tumor progression and normal differentiation. In: *Pathophysiol Haemost Thromb* 33 Suppl 1 (2003), S. 59–61. http://dx.doi.org/10.1159/000073296. – DOI 10.1159/000073296

[**Watanabe et al. 2003**] Watanabe, Minoru ; Aoki, Yoichi ; Kase, Hiroaki ; Tanaka, Kenichi: Heparanase expression and angiogenesis in endometrial cancer. In: *Gynecol Obstet Invest* 56 (2003), Nr. 2, S. 77–82. http://dx.doi.org/10.1159/000072821. – DOI 10.1159/000072821

[**Weckbach et al. 2011**] Weckbach, Ludwig T. ; Muramatsu, Takashi ; Walzog, Barbara: Midkine in inflammation. In: *ScientificWorldJournal* 11 (2011), S. 2491–505. http://dx.doi.org/10.1100/2011/517152. – DOI 10.1100/2011/517152

[**Wilczynski et al. 2016**] Wilczynski, Milosz ; Danielska, Justyna ; Dzieniecka, Monika ; Szymanska, Bozena ; Wojciechowski, Michal ; Malinowski, Andrzej: Prognostic and Clinical Significance of miRNA-205 in Endometrioid Endometrial Cancer. In: *PLOS ONE* 11 (2016), Oct, Nr. 10, e0164687. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0164687. – DOI 10.1371/journal.pone.0164687. – ISSN 1932–6203

[**Wilson et al. 1994**] Wilson, T J. ; Hertzog, P J. ; Angus, D ; Munnery, L ; Wood, E C. ; Kola, I: Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. In: *Fertil Steril* 62 (1994), Nov, Nr. 5, S. 1086–8

[**Witz 1999**] Witz, C A.: Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. In: *Clin Obstet Gynecol* 42 (1999), Sep, Nr. 3, S. 566–85

[**Xu et al. 2007a**] Xu, Xiulong ; Ding, Jianchi ; Ding, Helen ; Shen, Jikun ; Gattuso, Paolo ; Prinz, Richard A. ; Rana, Nasir ; Dmowski, W P.: Immunohistochemical detection of heparanase-1 expression in eutopic and ectopic endometrium from women with endometriosis. In: *Fertil Steril* 88 (2007), Nov, Nr. 5, S. 1304–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.12.081. – DOI 10.1016/j.fertnstert.2006.12.081

[**Xu et al. 2007b**] Xu, Xiulong ; Ding, Jianchi ; Rao, Geetha ; Shen, Jikun ; Prinz, Richard A. ; Rana, Nasir ; Dmowski, W P.: Estradiol induces heparanase-1 expression and heparan sulphate proteoglycan degradation in human endometrium. In: *Hum Reprod* 22 (2007), Apr, Nr. 4, S. 927–37. http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del483. – DOI 10.1093/humrep/del483

[**Zhang et al. 1995**] Zhang, L ; Rees, M C. ; Bicknell, R: The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. In: *J Cell Sci* 108 (Pt 1) (1995), Jan, S. 323–31

[**Zhang et al. 2011**] Zhang, Ya-Fei ; Tang, Xu-Dong ; Gao, Jin-Hua ; Fang, Dian-Chun ; Yang, Shi-Ming: Heparanase: a universal immunotherapeutic target in human cancers. In: *Drug Discov Today* 16 (2011), May, Nr. 9-10, S. 412–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.015. – DOI 10.1016/j.drudis.2011.02.015

[**Zhu et al. 2006**] Zhu, Li-ming ; Zhang, Tong-hua ; Dai, Li-cheng ; Ping, Jin-liang ; Huang, Xiao-hong ; Yuan, Hui-qin: [Expression of midkine in eutopic and ectopic endometrium of patients with severe endometriosis and its clinical significance]. In: *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 41 (2006), May, Nr. 5, S. 299–301

ANHANG A

Rohwerttabellen der RNA-Isolation

Tabelle A.1.: Gewonnene RNA-Mengen aus Endometrium

Probe	RNA-Gehalt [µl]	Quotient 280/260
EM1	672,00	1,76
EM2	24,00	1,90
EM3	12,75	1,80
EM4	170,00	1,90
EM5	76,00	2,27
EM6	104,00	1,78
EM7	1 224,00	1,72
EM8	1 366,00	1,70
EM9	1 216,00	1,85
EM10	66,00	1,93
EM11	310,00	1,86
EM12	98,00	1,54
EM13	324,00	1,73
EM14	24,00	1,03
EM15	22,00	1,26
EM16	52,00	1,36
EM17	848,00	1,74

Tabelle A.2.: Gewonnene RNA-Mengen aus Endometriose

Probe	RNA-Gehalt [µl]	Quotient 280/260
E1	132,00	2,20
E2	460,00	2,04
E3	88,00	1,65
E4	1506,00	2,00
E5	298,00	1,83
E6	406,00	1,73
E7	152,00	1,79
E8	378,00	1,61
E9	248,00	1,83
E10	432,00	1,70
E11	176,00	1,64
E12	1280,00	1,81
E13	880,00	1,74
E14	100,00	2,20
E15	62,00	2,90
E16	208,00	2,02
E17	268,00	2,20
E18	34,00	1,72
E19	32,00	3,78
E20	92,00	1,54
E21	14,00	1,24
E22	16,00	2,08
E23	236,00	1,67
E24	192,00	1,61
E25	16,00	1,52
E26	30,60	1,36
E27	168,90	1,70
E28	382,00	1,74
E29	125,00	1,70
E30	172,00	1,72
E31	254,00	1,87
E32	266,00	1,82
E33	286,00	1,62
E34	1908,00	1,71
E35	394,00	1,91
E36	336,00	1,94
E37	394,00	1,89
E38	512,00	1,86
E39	4,40	1,97
E40	5,28	1,92
E41	1540,00	1,92
E42	5,80	1,56
E43	640,00	1,85
E44	104,70	2,33
E45	2870,00	1,87

Tabelle A.3.: Gewonnene RNA-Mengen aus Endometrium-Karzinom

Probe	RNA-Gehalt [µl]	Quotient 280/260
EC1	1 888,00	1,87
EC2	550,00	1,98
EC3	644,00	1,92
EC4	1 414,00	1,98
EC5	1 572,10	2,08
EC6	686,00	1,94
EC7	922,00	1,92
EC8	992,00	1,90
EC9	326,00	2,05
EC10	666,00	1,91
EC11	1 370,00	1,86
EC12	1 004,00	1,96
EC13	886,00	1,93
EC14	1 742,00	1,80
EC15	1 362,00	1,83
EC16	1 610,00	1,78
EC17	500,00	1,75
EC18	510,00	1,86
EC19	122,00	1,97
EC20	2 350,00	1,89
EC21	306,00	1,95
EC22	488,00	1,70
EC23	860,00	1,86
EC24	272,00	1,80
EC25	1 454,00	1,89
EC26	574,00	1,82
EC27	3 090,00	1,91

ANHANG B

Rohwerttabellen der Genexpressionsanalyse

Tabelle B.1.: Kalibrierung Zelllinie mit VEGF

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
HeLA	14,92	20,69	5,77	0,00	1,00
HeLA	15,71	24,81	9,11	0,00	1,00
HeLA	15,71	25,46	9,76	0,00	1,00
HeLA	15,28	24,15	8,88	0,00	1,00
HeLA	15,72	23,25	7,54	0,00	1,00

Tabelle B.2.: VEGF-Expression in Endometriose

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
E1	20,93	24,81	3,88	−1,89	3,69
E2	24,66	30,48	5,83	−4,36	20,53
E3	18,84	25,34	6,50	−3,69	12,95
E4	18,25	24,87	6,62	−3,57	11,88
E5	17,73	20,11	2,38	−3,40	10,52
E6	17,22	20,39	3,17	−2,60	6,08
E7	21,23	22,83	1,60	−4,17	18,00
E8	20,55	22,56	2,01	−3,76	13,55
E9	24,84	27,60	2,76	−3,01	8,06
E10	18,91	26,54	7,62	−0,82	1,77
E11	21,18	25,64	4,46	−4,63	24,85
E12	21,98	29,75	7,76	−1,34	2,53
E13	22,49	29,47	6,98	−2,12	4,35
E14	18,48	23,71	5,24	−3,87	14,57
E15	17,93	25,20	7,26	−1,83	3,57
E16	19,03	27,98	8,95	−0,15	1,11
E17	19,50	25,80	6,30	−2,15	4,42
E18	24,27	31,66	7,38	−1,06	2,08
E19	20,73	28,32	7,58	−0,86	1,82
E20	17,01	21,47	4,46	−3,98	15,83
E21	17,16	24,53	7,37	−1,07	2,11
E22	21,01	26,91	5,90	−2,54	5,84
E23	25,38	31,08	5,71	−2,74	6,68
E24	23,38	29,12	5,75	−2,70	6,50
E25	20,57	26,19	5,62	−2,82	7,06
E27	18,21	23,60	5,39	−2,15	4,42
E28	20,72	25,18	4,46	−3,08	8,46
E29	18,70	23,50	4,79	−2,74	6,68
E30	21,06	24,86	3,79	−3,74	13,36
E31	25,70	29,74	4,04	−3,50	11,27
E32	20,64	24,30	3,66	−3,88	14,67
E33	18,20	21,79	3,58	−3,96	15,51
E34	19,09	22,61	3,52	−4,01	16,17
E35	18,24	20,73	2,50	−5,04	32,90
E36	17,30	21,10	3,79	−3,74	13,36
E37	18,25	22,45	4,20	−3,34	10,13
E38	19,12	24,59	5,46	−2,07	4,20
E39	19,17	21,65	2,48	−5,05	33,24
E40	19,73	22,78	3,05	−4,49	22,39
E41	19,25	24,55	5,30	−2,23	4,69

Tabelle B.3.: VEGF-Expression in Endometrium

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EM1	26,89	34,63	7,74	−2,46	5,48
EM2	28,80	34,84	6,04	−4,15	17,75
EM3	22,70	28,89	6,19	−4,00	16,00
EM4	18,84	23,27	4,43	−1,33	2,52
EM5	21,16	22,16	0,99	−4,78	27,47
EM6	21,36	23,55	2,19	−3,58	11,92
EM7	22,98	24,37	1,40	−4,38	20,75
EM9	26,02	27,43	1,41	−4,36	20,53
EM10	25,70	29,11	3,40	−5,70	51,80
EM11	22,25	30,36	8,12	−0,98	1,98
EM12	23,68	32,92	9,24	0,14	0,90
EM13	28,93	36,75	7,82	−1,28	2,44
EM14	21,07	31,95	10,88	1,77	0,29
EM15	22,02	28,70	6,69	−2,41	5,31
EM16	17,08	22,20	5,12	−3,32	9,99

Tabelle B.4.: VEGF-Expression in Endometriumkarzinom

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EC1	20,04	24,06	4,03	−6,17	71,75
EC2	16,85	23,02	6,17	−4,03	16,28
EC4	19,79	21,61	1,83	−3,94	15,35
EC5	21,16	22,54	1,38	−4,39	20,97
EC6	17,20	19,27	2,06	−3,71	13,09
EC7	17,47	20,05	2,58	−3,19	9,09
EC8	19,25	21,79	2,54	−3,23	9,42
EC9	19,39	19,39	0,01	−5,76	54,38
EC10	19,41	25,64	6,24	−2,86	7,26
EC12	19,94	24,61	4,67	−4,43	21,56
EC13	22,61	27,66	5,05	−4,04	16,51
EC14	17,02	23,09	6,08	−3,02	8,14
EC16	21,07	23,34	2,27	−6,18	72,50
EC18	19,10	24,14	5,04	−3,41	10,63
EC19	17,10	25,07	7,97	−0,47	1,39
EC20	17,80	22,96	5,17	−3,27	9,68
EC21	21,57	27,32	5,75	−2,70	6,50
EC22	17,68	22,23	4,54	−3,90	14,93

Tabelle B.5.: Kalibrierung Zelllinie mit Survivin

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
HeLA	14,92	23,36	8,44	0,00	1,00
HeLA	15,71	22,93	7,22	0,00	1,00
HeLA	15,71	21,09	5,38	0,00	1,00
HeLA	15,28	22,86	7,58	0,00	1,00
HeLA	15,72	27,80	12,09	0,00	1,00

Tabelle B.6.: Survivin-Expression in Endometriose

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
E1	20,93	33,19	12,26	3,82	0,07
E3	18,84	24,42	5,58	−0,24	1,19
E4	18,25	29,85	11,60	10,86	0,00
E5	17,73	26,36	8,62	0,18	0,88
E6	17,22	26,45	9,23	0,79	0,58
E7	21,23	27,54	6,31	−2,13	4,38
E8	20,55	34,09	13,54	5,11	0,03
E9	24,84	33,19	8,35	−0,09	1,06
E10	18,91	29,02	10,10	2,94	0,13
E12	21,98	33,70	11,72	4,50	0,04
E13	22,49	32,16	9,68	2,46	0,18
E14	18,48	29,38	10,90	3,68	0,08
E15	17,93	27,84	9,90	2,69	0,16
E16	19,03	25,04	6,01	−1,21	2,31
E17	19,50	25,25	5,76	−1,40	2,63
E18	24,27	32,28	8,01	0,85	0,55
E19	20,73	25,39	4,66	−2,50	5,66
E20	17,01	22,85	5,84	−1,31	2,49
E21	17,16	25,60	8,44	1,28	0,41
E22	21,01	30,62	9,61	2,46	0,18
E25	20,57	31,05	10,48	2,31	0,20
E27	18,21	33,07	14,86	2,65	0,16
E28	20,72	31,04	10,32	−1,89	3,69
E30	21,06	33,76	12,70	0,49	0,71
E32	20,64	29,96	9,32	−2,88	7,36
E33	18,20	27,61	9,41	−2,79	6,94
E34	19,09	29,09	10,01	−2,20	4,59
E35	18,24	30,68	12,44	0,23	0,85
E36	17,30	27,59	10,29	−1,92	3,78
E38	19,12	28,94	9,81	−2,39	5,24
E39	19,17	29,93	10,76	−1,45	2,72
E40	19,73	32,30	12,57	0,36	0,78

Tabelle B.7.: Survivin-Expression in Endometrium

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EM3	22,70	32,26	9,55	4,97	0,03
EM4	18,84	29,41	10,57	−0,19	1,14
EM5	21,16	33,80	12,63	4,00	0,06
EM6	21,36	32,98	11,62	1,56	0,34
EM7	22,98	29,30	6,33	−0,94	1,93
EM10	25,70	34,77	9,06	1,84	0,28
EM11	22,25	34,65	12,40	5,18	0,03
EM12	23,68	30,80	7,12	−0,10	1,08
EM13	28,93	32,52	3,58	0,10	0,93
EM14	21,07	31,71	10,64	7,57	0,01
EM15	22,02	32,93	10,91	3,69	0,08
EM16	17,08	23,79	6,71	−0,45	1,36

Tabelle B.8.: Survivin-Expression in Endometriumkarzinom

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EC1	20,04	26,66	6,62	0,81	0,57
EC2	16,85	24,25	7,39	1,57	0,34
EC3	21,43	23,93	2,49	−3,33	10,06
EC4	19,79	27,38	7,59	−0,85	1,80
EC5	21,16	28,20	7,04	−1,40	2,63
EC6	17,20	23,20	5,99	−2,45	5,46
EC7	17,47	24,89	7,42	−1,02	2,03
EC8	19,25	25,52	6,27	−2,17	4,50
EC9	19,39	26,18	6,79	−1,65	3,14
EC10	19,41	24,82	5,41	−1,81	3,51
EC12	19,94	25,25	5,30	−1,92	3,77
EC13	22,61	32,15	9,54	2,31	0,20
EC14	17,02	25,47	8,46	1,24	0,42
EC15	18,43	24,73	6,30	−0,92	1,89
EC16	21,07	25,29	4,21	−2,94	7,70
EC17	22,18	27,89	5,71	−1,45	2,73
EC18	19,10	24,62	5,52	−1,64	3,11
EC19	17,10	24,12	7,02	−0,14	1,10
EC20	17,80	26,34	8,54	1,39	0,38
EC21	21,57	25,23	3,67	−3,49	11,24
EC22	17,68	22,06	4,38	−2,77	6,84

Tabelle B.9.: Kalibrierung Zelllinie mit Midkine

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
HeLA	14,92	23,45	8,54	0,00	1,00
HeLA	15,71	25,86	10,16	0,00	1,00
HeLA	15,71	26,30	10,59	0,00	1,00
HeLA	15,28	28,36	13,09	0,00	1,00
HeLA	15,72	0,00	0,00	0,00	1,00

Tabelle B.10.: Midkine-Expression in Endometriose

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
E1	20,93	21,25	0,33	−8,21	295,09
E2	24,66	30,66	6,00	−7,08	135,77
E3	18,84	21,38	2,54	−10,55	1 504,43
E4	18,25	21,34	3,08	−10,01	1 027,56
E5	17,73	19,30	1,57	−6,96	124,93
E6	17,22	18,92	1,70	−6,83	114,17
E7	21,23	19,82	−1,41	−9,95	985,70
E8	20,55	20,31	−0,24	−8,78	438,06
E9	24,84	25,61	0,78	−7,76	216,77
E10	18,91	24,30	5,39	−8,79	444,18
E11	21,18	20,52	−0,65	−10,80	1 789,08
E12	21,98	23,34	1,35	−8,80	447,27
E13	22,49	22,86	0,36	−9,79	885,29
E14	18,48	19,74	1,26	−8,89	474,41
E15	17,93	20,59	2,65	−7,50	181,02
E16	19,03	20,96	1,94	−8,22	298,17
E17	19,50	23,70	4,21	−9,98	1 009,90
E18	24,27	28,20	3,94	−10,25	1 217,75
E19	20,73	24,43	3,69	−10,49	1 443,14
E21	17,16	22,93	5,77	−8,41	341,32
E22	21,01	27,91	6,89	−7,29	156,50
E24	23,38	27,03	3,65	−10,54	1 483,72
E25	20,57	24,52	3,96	−10,22	1196,83
E27	18,21	21,40	3,19	−7,39	167,73
E28	20,72	21,30	0,58	−10,00	1 024,00
E29	18,70	18,98	0,27	−10,31	1 269,46
E30	21,06	22,31	1,25	−9,33	643,59
E32	20,64	20,88	0,23	−10,35	1 300,63
E33	18,20	18,27	0,07	−10,52	1 463,29
E35	18,24	17,92	−0,32	−10,90	1 910,85
E37	18,25	17,89	−0,36	−10,95	1 971,39
E38	19,12	19,27	0,14	−10,44	1 384,36
E39	19,17	19,18	0,01	−10,57	1 525,43
E40	19,73	23,15	3,42	−7,16	143,01
E41	19,25	19,86	0,61	−9,97	1 002,93

Tabelle B.11.: Midkine-Expression in Endometrium

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EM1	26,89	31,18	4,28	−8,81	448,82
EM4	18,84	19,39	0,55	−7,99	254,23
EM5	21,16	20,91	−0,25	−8,79	441,11
EM6	21,36	22,41	1,05	−7,48	178,53
EM7	22,98	21,28	−1,70	−10,23	1 200,98
EM8	21,81	20,16	−1,66	−10,19	1168,14
EM9	26,02	24,94	−1,08	−9,62	784,16
EM10	25,70	27,82	2,12	−8,04	263,20
EM11	22,25	26,11	3,87	−6,29	78,25
EM12	23,68	25,61	1,93	−8,22	299,21
EM13	28,93	29,99	1,05	−9,10	548,75
EM14	21,07	22,70	1,62	−8,53	369,65
EM15	22,02	24,41	2,39	−7,76	217,52
EM16	17,08	23,34	6,25	−7,93	243,88

Tabelle B.12.: Midkine-Expression in Endometriumkarzinom

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EC2	16,85	25,67	8,82	−4,27	19,29
EC4	19,79	20,05	0,27	−8,27	308,69
EC5	21,16	22,14	0,98	−7,55	188,05
EC6	17,20	17,01	−0,20	−8,73	424,61
EC9	19,39	18,75	−0,64	−9,17	576,03
EC13	22,61	22,89	0,28	−9,88	939,01
EC14	17,02	18,51	1,50	−8,66	404,50
EC19	17,10	25,11	8,02	−6,17	72,00
EC20	17,80	25,17	7,38	−6,81	112,21
EC21	21,57	26,70	5,13	−9,05	531,90
EC22	17,68	23,71	6,03	−8,15	285,04

Tabelle B.13.: Kalibrierung Zelllinie mit Heparanase

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
MDA-MB 231	15,135	23,19	8,055	0	1,00
MDA-MB 231	15,085	23,675	8,59	0	1,00
MDA-MB 231	15,285	23,565	8,28	0	1,00
MDA-MB 231	15,535	24,725	9,19	0	1,00
MDA-MB 231	15,77	26,65	10,88	0	1,00
MDA-MB 231	15,685	25,925	10,24	0	1,00
MDA-MB 231	15,33	24,645	9,315	0	1,00
MDA-MB 231	14,905	24,645	9,74	0	1,00
MDA-MB 231	14,795	24,645	9,85	0	1,00
MDA-MB 231	22,865	32,09	9,225	0	1,00

Tabelle B.14.: Heparanase-Expression in Endometriose

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
E1	20,93	29,41	8,48	0,21	0,86
E2	24,66	33,55	8,89	−1,99	3,97
E3	18,84	32,67	13,82	2,94	0,13
E4	18,25	28,92	10,67	−0,21	1,16
E5	17,73	22,80	5,08	−3,19	9,16
E6	17,22	20,75	3,53	−4,74	26,72
E7	21,23	28,24	7,01	−1,26	2,39
E8	20,55	26,68	6,13	−2,14	4,41
E10	18,91	29,21	10,30	0,98	0,51
E11	21,18	26,50	5,32	−2,96	7,78
E12	21,98	29,14	7,15	−1,13	2,19
E13	22,49	27,58	5,09	−3,19	9,13
E14	18,48	23,00	4,52	−3,76	13,55
E15	17,93	27,56	9,63	1,35	0,39
E16	19,03	28,14	9,11	0,82	0,56
E17	19,50	27,75	8,26	−1,06	2,08
E18	24,27	30,98	6,71	−2,60	6,08
E19	20,73	30,05	9,31	−0,01	1,00
E20	17,01	28,88	11,87	2,55	0,17
E21	17,16	29,20	12,04	2,73	0,15
E22	21,01	33,81	12,80	3,49	0,09
E23	25,38	34,16	8,79	−0,53	1,44
E24	23,38	29,30	5,92	−3,39	10,48
E27	18,21	27,14	8,93	−0,93	1,90
E28	20,72	28,05	7,33	−2,52	5,74
E29	18,70	27,59	8,88	−0,97	1,96
E30	21,06	27,30	6,25	−3,60	12,17
E31	25,70	34,48	8,78	1,69	0,31
E32	20,64	25,68	5,04	−4,81	28,05
E33	18,20	25,16	6,95	−2,90	7,46
E34	19,09	24,73	5,64	−4,21	18,51
E36	17,30	25,51	8,21	−1,65	3,13
E37	18,25	26,82	8,56	−1,29	2,45
E38	19,12	28,09	8,96	−0,89	1,85
E39	19,17	27,20	8,04	−1,81	3,52
E40	19,73	30,91	11,18	1,32	0,40
E41	19,25	28,66	9,42	−0,43	1,35

Tabelle B.15.: Heparanase-Expression in Endometrium

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EM1	26,89	35,45	8,56	−2,32	4,99
EM2	28,80	36,00	7,21	−3,67	12,77
EM3	22,70	33,83	11,13	0,25	0,84
EM4	18,84	26,77	7,93	−0,34	1,27
EM5	21,16	26,74	5,58	−2,69	6,48
EM6	21,36	29,43	8,07	−0,20	1,15
EM7	22,98	29,08	6,11	−2,17	4,48
EM8	21,81	29,11	7,30	−0,96	1,95
EM9	26,02	30,79	4,77	1,10	0,46
EM10	25,70	30,60	4,89	−3,38	10,45
EM11	22,25	32,45	10,20	1,92	0,27
EM12	23,68	31,73	8,05	−0,23	1,17
EM14	21,07	29,89	8,81	0,54	0,69
EM15	22,02	29,04	7,02	−1,26	2,39
EM16	17,08	28,62	11,54	2,23	0,21

Tabelle B.16.: Heparanase-Expression in Endometriumkarzinom

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EC1	20,04	30,86	10,83	−0,05	1,04
EC2	16,85	27,99	11,14	0,26	0,84
EC3	21,43	29,56	8,12	−2,75	6,75
EC4	19,79	29,41	9,63	1,36	0,39
EC5	21,16	28,02	6,86	−1,42	2,67
EC6	17,20	26,81	9,61	1,33	0,40
EC7	17,47	26,40	8,93	0,66	0,63
EC8	19,25	29,02	9,77	1,50	0,35
EC9	19,39	28,91	9,52	1,25	0,42
EC10	19,41	27,09	7,68	−0,59	1,51
EC11	22,32	29,68	7,37	−0,92	1,89
EC12	19,94	26,02	6,08	−2,21	4,61
EC13	22,61	29,47	6,86	−1,42	2,68
EC14	17,02	26,70	9,69	1,41	0,38
EC15	18,43	28,49	10,06	1,78	0,29
EC16	21,07	30,86	9,79	0,47	0,72
EC17	22,18	28,67	6,49	−2,83	7,09
EC19	17,10	25,75	8,64	−0,67	1,59
EC20	17,80	29,19	11,39	2,08	0,24
EC21	21,57	28,62	7,05	−2,27	4,81
EC22	17,68	27,68	9,99	0,68	0,62

Tabelle B.17.: Kalibrierung Zelllinie mit CXCR4

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
MDA-MB 231	15,135	19,635	4,5	0	1,00
MDA-MB 231	15,085	21,57	6,485	0	1,00
MDA-MB 231	15,285	23,335	8,05	0	1,00
MDA-MB 231	15,535	23,53	7,995	0	1,00
MDA-MB 231	15,77	23,83	8,06	0	1,00
MDA-MB 231	15,685	22,925	7,24	0	1,00
MDA-MB 231	15,33	21,985	6,655	0	1,00
MDA-MB 231	14,905	20,585	5,68	0	1,00
MDA-MB 231	14,795	19,63	4,835	0	1,00
MDA-MB 231	22,865	29,965	7,1	0	1,00

Tabelle B.18.: CXCR4-Expression in Endometriose

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
E1	20,93	24,33	3,40	−1,09	2,14
E2	24,66	30,48	5,83	−2,23	4,69
E3	18,84	27,69	8,85	0,79	0,58
E4	18,25	25,45	7,20	−0,86	1,82
E5	17,73	21,34	3,62	−0,89	1,85
E6	17,22	20,64	3,42	−1,07	2,11
E7	21,23	22,21	0,98	−3,52	11,47
E8	20,55	23,81	3,26	−1,24	2,36
E9	24,84	24,79	−0,06	−4,55	23,51
E10	18,91	26,13	7,21	0,56	0,68
E11	21,18	28,21	7,04	−1,01	2,02
E12	21,98	30,30	8,31	0,26	0,84
E13	22,49	27,91	5,42	−2,63	6,21
E14	18,48	24,14	5,66	−2,39	5,24
E15	17,93	25,70	7,78	−0,28	1,21
E16	19,03	24,83	5,80	−2,25	4,76
E17	19,50	24,86	5,37	−1,28	2,44
E18	24,27	32,41	8,13	1,48	0,36
E19	20,73	27,71	6,97	0,32	0,80
E20	17,01	22,55	5,54	−1,12	2,17
E21	17,16	24,42	7,26	0,60	0,66
E22	21,01	26,18	5,17	−1,49	2,81
E23	25,38	28,74	3,37	−3,29	9,78
E24	23,38	24,71	1,33	−5,32	39,95
E25	20,57	26,25	5,68	−0,97	1,97
E27	18,21	21,43	3,21	−1,62	3,07
E28	20,72	24,39	3,67	−1,17	2,25
E29	18,70	24,23	5,53	0,69	0,62
E30	21,06	24,83	3,77	−1,06	2,09
E31	25,70	29,93	4,22	−0,61	1,53
E32	20,64	22,70	2,06	−2,78	6,87
E33	18,20	22,60	4,39	−0,44	1,36
E34	19,09	21,61	2,52	−2,31	4,96
E35	18,24	21,24	3,00	−1,83	3,57
E36	17,30	22,26	4,96	0,12	0,92
E37	18,25	23,71	5,46	0,62	0,65
E38	19,12	24,31	5,18	0,35	0,78
E39	19,17	23,36	4,20	−0,64	1,56
E40	19,73	24,31	4,58	−0,26	1,19
E41	19,25	22,14	2,89	−1,95	3,85

Tabelle B.19.: CXCR4-Expression in Endometrium

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EM1	26,89	29,88	2,98	−5,08	33,71
EM2	28,80	30,77	1,98	−6,08	67,65
EM3	22,70	30,56	7,86	−0,20	1,15
EM4	18,84	23,57	4,73	0,23	0,85
EM5	21,16	21,36	0,20	−4,30	19,77
EM6	21,36	22,89	1,53	−2,96	7,81
EM7	22,98	22,81	−0,17	−4,67	25,37
EM8	21,81	21,16	−0,65	−5,14	35,38
EM9	26,02	26,70	0,68	−3,82	14,12
EM10	25,70	31,98	6,28	−1,77	3,41
EM11	22,25	32,88	10,62	2,58	0,17
EM12	23,68	31,23	7,54	−0,51	1,42
EM13	28,93	33,14	4,21	−3,85	14,37
EM14	21,07	32,18	11,11	3,06	0,12
EM15	22,02	28,71	6,70	−1,35	2,55
EM16	17,08	25,05	7,96	1,31	0,40

Tabelle B.20.: CXCR4-Expression in Endometriumkarzinom

Probe	CT GAPDH	CT	DCT	DDCT	n-fache Expression
EC1	20,04	26,94	6,91	−1,16	2,23
EC2	16,85	26,72	9,87	1,81	0,29
EC3	21,43	26,67	5,24	−2,83	7,09
EC4	19,79	24,05	4,26	−0,23	1,18
EC5	21,16	23,65	2,49	−2,01	4,03
EC6	17,20	20,77	3,56	−0,94	1,91
EC7	17,47	20,91	3,44	−1,06	2,09
EC8	19,25	21,46	2,21	−2,29	4,87
EC9	19,39	22,06	2,67	−1,83	3,56
EC10	19,41	28,20	8,79	0,74	0,60
EC11	22,32	28,23	5,92	−2,13	4,38
EC12	19,94	26,29	6,35	−1,70	3,25
EC13	22,61	31,64	9,03	0,98	0,51
EC14	17,02	25,02	8,01	−0,04	1,03
EC15	18,43	25,45	7,02	−1,03	2,04
EC16	21,07	23,20	2,12	−4,54	23,18
EC17	22,18	23,80	1,62	−3,21	9,25
EC18	19,10	23,34	4,24	−2,42	5,33
EC19	17,10	22,73	5,63	−1,02	2,03
EC20	17,80	23,55	5,76	−0,90	1,86
EC21	21,57	26,22	4,65	−2,00	4,01
EC22	17,68	22,89	5,21	−1,44	2,71

ANHANG C

Rohwerttabellen der Immunhistochemie

Tabelle C.1.: IRS-Werte für Progesteronrezeptor-Antikörper in Endometriose

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
E1	0,50	0,00	0,00
E2	3,50	3,00	10,50
E3	4,00	3,00	12,00
E4	4,00	2,50	10,00
E5	4,00	2,00	8,00
E6	4,00	3,00	12,00
E7	3,00	2,00	6,00
E8	3,00	1,00	3,00
E9	4,00	2,50	10,00
E10	4,00	1,50	6,00
E11	4,00	1,50	6,00
E12	2,50	1,50	3,75
E13	2,50	1,00	2,50
E14	3,50	1,50	5,25
E15	3,50	1,00	3,50
E16	4,00	2,50	10,00
E17	3,00	1,50	4,50
E18	2,00	1,00	2,00
E19	3,50	1,00	3,50

Tabelle C.2.: IRS-Werte für Progesteronrezeptor-Antikörper in Endometrium

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
EM1	4,00	2,00	8,00
EM2	3,50	1,50	5,25
EM3	3,50	1,50	5,25
EM4	2,00	1,00	2,00
EM5	4,00	2,50	10,00
EM6	3,50	1,50	5,25
EM7	2,00	1,00	2,00
EM8	1,00	0,50	0,50
EM9	4,00	2,50	10,00
EM10	1,50	0,50	0,75
EM11	3,00	1,00	3,00
EM12	3,00	2,00	6,00
EM13	4,00	2,00	8,00

Tabelle C.3.: IRS-Werte für Östrogenrezeptor-Antikörper in Endometriose

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
E1	1,00	0,50	0,50
E2	4,00	2,50	10,00
E3	4,00	2,50	10,00
E4	4,00	2,00	8,00
E5	3,00	2,00	6,00
E6	3,50	2,50	8,75
E7	1,00	1,00	1,00
E8	2,00	1,00	2,00
E9	2,00	1,00	2,00
E10	4,00	1,50	6,00
E11	4,00	1,00	4,00
E12	4,00	2,00	8,00
E13	1,50	1,00	1,50
E14	4,00	2,00	8,00
E15	2,00	0,50	1,00
E16	4,00	2,50	10,00
E17	1,00	0,00	0,00
E18	2,00	0,50	1,00
E19	3,50	2,00	7,00

Tabelle C.4.: IRS-Werte für Östrogenrezeptor-Antikörper in Endometrium

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
EM1	3,00	2,00	6,00
EM2	1,00	0,00	0,00
EM3	3,50	2,00	7,00
EM4	1,50	0,50	0,75
EM5	4,00	3,00	12,00
EM6	2,50	0,50	1,25
EM7	2,50	1,50	3,75
EM8	4,00	1,00	4,00
EM9	3,50	2,00	7,00
EM10	1,50	0,50	0,75
EM11	2,00	1,00	2,00
EM12	4,00	3,00	12,00
EM13	4,00	2,50	10,00

Tabelle C.5.: IRS-Werte für VEGF-Antikörper in Endometriose

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
E1	1,00	0,50	0,50
E2	3,50	2,00	7,00
E3	3,00	1,50	4,50
E4	0,50	0,00	0,00
E5	1,00	0,50	0,50
E6	2,00	1,50	3,00
E7	2,50	2,50	6,25
E8	2,00	1,00	2,00
E9	2,50	1,50	3,75
E10	4,00	2,00	8,00
E11	3,00	2,00	6,00
E12	1,50	0,50	0,75
E13	1,00	1,00	1,00
E14	3,00	1,50	4,50
E15	2,00	0,50	1,00
E16	2,00	1,50	3,00
E17	4,00	2,00	8,00
E18	1,50	1,00	1,50
E19	2,00	1,50	3,00

Tabelle C.6.: IRS-Werte für VEGF-Antikörper in Endometrium

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
EM1	4,00	2,00	8,00
EM2	2,50	2,00	5,00
EM3	3,00	2,00	6,00
EM4	2,00	1,50	3,00
EM5	4,00	2,50	10,00
EM6	4,00	3,00	12,00
EM7	0,50	0,50	0,25
EM8	2,00	0,50	1,00
EM9	3,00	1,00	3,00
EM10	1,50	0,50	0,75
EM11	4,00	2,00	8,00
EM12	2,00	2,00	4,00
EM13	2,50	3,00	7,50

Tabelle C.7.: IRS-Werte für Survivin-Antikörper in Endometriose

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
E1	0,50	0,00	0,00
E2	2,50	3,00	7,50
E3	3,00	2,50	7,50
E4	4,00	2,50	10,00
E5	2,00	2,00	4,00
E6	2,00	2,50	5,00
E7	2,00	2,00	4,00
E8	0,50	0,00	0,00
E9	3,50	1,50	5,25
E10	4,00	2,00	8,00
E11	2,50	1,50	3,75
E12	1,50	0,50	0,75
E13	0,50	0,00	0,00
E14	2,00	2,00	4,00
E15	1,00	0,00	0,00
E16	2,00	1,00	2,00
E17	1,00	0,00	0,00
E18	1,50	0,50	0,75
E19	2,00	1,00	2,00

Tabelle C.8.: IRS-Werte für Survivin-Antikörper in Endometrium

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
EM1	2,00	1,00	2,00
EM2	3,00	1,00	3,00
EM3	2,00	1,00	2,00
EM4	1,00	0,00	0,00
EM5	4,00	2,50	10,00
EM6	4,00	2,50	10,00
EM7	2,50	1,00	2,50
EM8	1,50	1,00	1,50
EM9	4,00	2,00	8,00
EM10	1,50	1,00	1,50
EM11	3,00	1,00	3,00
EM12	1,00	0,50	0,50
EM13	2,50	3,00	7,50

Tabelle C.9.: IRS-Werte für Midkine-Antikörper in Endometriose

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
E1	1,00	0,50	0,50
E2	3,50	2,00	7,00
E3	3,00	1,50	4,50
E4	0,50	0,00	0,00
E5	1,00	0,50	0,50
E6	2,00	1,50	3,00
E7	2,50	2,50	6,25
E8	2,00	1,00	2,00
E9	2,50	1,50	3,75
E10	4,00	2,00	8,00
E11	3,00	2,00	6,00
E12	1,50	0,50	0,75
E13	1,00	1,00	1,00
E14	3,00	1,50	4,50
E15	2,00	0,50	1,00
E16	2,00	1,50	3,00
E17	4,00	2,00	8,00
E18	1,50	1,00	1,50
E19	2,00	1,50	3,00

Tabelle C.10.: IRS-Werte für Midkine-Antikörper in Endometrium

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
EM1	4,00	2,00	8,00
EM2	2,50	2,00	5,00
EM3	3,00	2,00	6,00
EM4	2,00	1,50	3,00
EM5	4,00	2,50	10,00
EM6	4,00	3,00	12,00
EM7	0,50	0,50	0,25
EM8	2,00	0,50	1,00
EM9	3,00	1,00	3,00
EM10	1,50	0,50	0,75
EM11	4,00	2,00	8,00
EM12	2,00	2,00	4,00
EM13	2,50	3,00	7,50

Tabelle C.11.: IRS-Werte für Heparanase-Antikörper in Endometriose

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
E1	1,00	0,50	0,50
E2	4,00	2,50	10,00
E3	4,00	2,50	10,00
E4	4,00	2,00	8,00
E5	3,00	2,00	6,00
E6	3,50	2,50	8,75
E7	1,00	1,00	1,00
E8	2,00	1,00	2,00
E9	2,00	1,00	2,00
E10	4,00	1,50	6,00
E11	4,00	1,00	4,00
E12	4,00	2,00	8,00
E13	1,50	1,00	1,50
E14	4,00	2,00	8,00
E15	2,00	0,50	1,00
E16	4,00	2,50	10,00
E17	1,00	0,00	0,00
E18	2,00	0,50	1,00
E19	3,50	2,00	7,00

Tabelle C.12.: IRS-Werte für Heparanase-Antikörper in Endometrium

Probe	PP-Wert	SI-Wert	IRS
EM1	3,00	2,00	6,00
EM2	1,00	0,00	0,00
EM3	3,50	2,00	7,00
EM4	1,50	0,50	0,75
EM5	4,00	3,00	12,00
EM6	2,50	0,50	1,25
EM7	2,50	1,50	3,75
EM8	4,00	1,00	4,00
EM9	3,50	2,00	7,00
EM10	1,50	0,50	0,75
EM11	2,00	1,00	2,00
EM12	4,00	3,00	12,00
EM13	4,00	2,50	10,00

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Rein für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die kompetente Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke Professor Dr. med. Krieg für die guten Anregung und die Unterstützung.

Vielen Dank auch an Professorin Dr. med. Fehm, dass ich die Möglichkeit hatte die Arbeit in ihrer Klinik zu beenden.

Weitherhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Niederacher für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und zu lernen, die vielen Hilfestellungen und die ausführlichen Korrekturen meiner Arbeit.

Ein Dank an Professor Curiel für die, zur Verfügung gestellten, Proben.

Ein besonderer Dank gilt Ellen, Nicole und Nora aus dem molekulargenetischen Labor der Frauenklinik für die tolle Anleitung zum experimentellen Arbeiten, die Geduld und die guten Gespräche.

Ebenfalls möchte ich Frau Löhrmann und Frau Grolik für die Hilfe bei den immunhistochemischen Untersuchungen und der netten Atmosphäre in ihrem Labor danken.

Ich danke meiner Mutter für die bedingungslose Unterstützung und das stetige Ermutigen.

Besonders danke ich dem liebsten Menschen, meinem Mann Michael, ohne den ich die Arbeit überhaupt nicht beendet hätte – Danke!

Pia, Nina und Franz – Danke, dass es euch gibt! Denkt immer daran: Ihr könnt alles schaffen, was ihr wollt!