

Aus der Universität zu Lübeck
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Klaus Diedrich

**Expression des Adhäsionsmoleküls L1 in
Endometrioseläsionen und Endometrium von
Endometriosepatientinnen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck
aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von
Deborah Zeeden
aus Dinslaken

Lübeck 2008

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Daniela Hornung

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.11.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät –

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	5
2.1. Immunhistochemie.....	5
2.2. Patientenkollektiv.....	5
2.3. Gefrierschnitte herstellen	8
2.4. Färbung mit Toluidinblau.....	8
2.5. Mikrodissektion	8
2.6. RNA Isolation.....	10
2.7. RNA Einengung.....	12
2.8. Umschreibung von RNA in cDNA (copy DNA).....	13
2.9. Real time PCR.....	13
2.10. Auswertung.....	14
Ergebnisse.....	15
3.1. L1 Nachweis mittels Immunhistochemie.....	15
3.1.1. Immunhistochemischer L1-Nachweis in Endometrioseläsionen.....	15
3.1.2. Immunhistochemischer L1-Nachweis in Endometrium.....	15
3.2. L1 Nachweis mittels RT-PCR.....	16
3.2.1 L1 Nachweis in Endometrium.....	18
3.2.2 L1 Nachweis in Endometriose.....	20
4.Diskussion.....	22
5. Zusammenfassung.....	33
6. Literaturverzeichnis.....	34
7. Abkürzungsverzeichnis.....	47
8. Danksagung.....	49
9. Lebenslauf.....	50

1. Einleitung

Endometriose ist eine gutartige Erkrankung, die durch endometriumartige Zellverbände außerhalb des Uterus charakterisiert ist. Es handelt sich um eine proliferative Erkrankung. Die meisten Endometrioseherde reagieren ähnlich wie Endometrium auf die zyklischen hormonellen Veränderungen der Frau. Endometriose ist charakterisiert durch Symptome wie Sterilität, Dysmenorrhoe (Schmerzen bei der Menstruation), Dyspareunie (Schmerzen beim Geschlechtsverkehr) und chronische Unterbauchschmerzen. Morphologisch unterscheidet sich Endometrium von Endometriosepatientinnen von dem von Kontrollpatientinnen (Yu et al., 2006). Auch in dieser Arbeit ist ein Unterschied zwischen Endometrium und Endometriose festzustellen. In Endometriosegewebe und Endometrium von Patientinnen mit Endometriose ist eine hohe Dichte an Nervenzellen nachgewiesen worden, was zu einer erhöhten Schmerzwahrnehmung führt (Tokushige et al., 2006 a, Tokushige et al., 2006 b). Es gibt jedoch auch symptomlose Patientinnen (Hucke und Distler, 1989). 8-10% aller Frauen im gebärfähigen Alter leiden an dieser Erkrankung. Diese Aussage muss allerdings hinterfragt werden, da die Prävalenz ungewiss bleibt, solange die diagnostische Laparoskopie nicht bei einer randomisierten großen Population durchgeführt werden kann (Barbieri, 1990). Bei Frauen mit chronischen Bauchschmerzen ergeben elf ähnlich aufgebaute Studien Prävalenzen zwischen zwei und vierundsiebzig Prozent (Guo und Wang, 2006). Das Erscheinungsjahr der Studien korreliert positiv mit der Höhe der Prävalenz. Demnach ist die Endometrioseprävalenz gestiegen, oder die Diagnose wurde öfter gestellt (Guo und Wang, 2006). Bei Frauen mit Infertilität liegt die Endometrioseprävalenz bei 34,5% (Preciado Ruiz et al., 2005). Insgesamt ist Endometriose durch ihre hohe Prävalenz und die chronischen Symptome eine bedeutende Erkrankung und nimmt einen großen Einfluss auf die Lebensqualität der Patientinnen. Die Einteilung der Endometriose in vier Krankheitsstadien erfolgt durch die 1985 revidierte American Fertility Association. Dabei werden Anzahl der Läsionen, Ausdehnung, Lokalisation und Adhäsionen berücksichtigt. Das Endometriosestadium nach dieser Klassifikation und die subjektive Symptomatik korrelieren allerdings nicht (Vercellini et al., 2007).

Nach dem heutigen Wissenstand ist die Laparoskopie Mittel der Wahl für Diagnose und Therapie, wobei je nach Symptomen und Wünschen der Patientin

eine individuell angepasste Therapie gefunden werden sollte (Mounsey et al., 2006, Lu und Ory, 1995). Die Endometriose lässt sich durch operative Entfernung der Herde behandeln, wobei es jedoch häufig zu Rezidiven kommt. Die Rezidivrate liegt bei 16-31% (Busacca et al., 2006, Kikuchi et al., 2006). Einige Forscher vermuten einen Zusammenhang zwischen Endometriose und einer veränderten Immunitätslage der Patientinnen (Mathur et al., 1982). Unter anderem soll über die Inflammation bei der Endometriose auch das Risiko für andere Tumoren steigen (Ness und Modugno, 2006). Das in dieser Arbeit untersuchte Protein könnte in Zukunft möglicherweise als Target einer Antikörpertherapie dienen. Dies müsste allerdings noch durch weitere Studien geprüft werden.

Endometriose ist charakterisiert durch Adhäsion, Migration, Invasion und Angiogenese. Diese Eigenschaften treten auch bei malignen Erkrankungen auf. Endometriosepatientinnen haben ein 1,3 bis 1,9 faches erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung. Bei Patientinnen mit einer langjährigen Infertilität und Ovarialendometriose liegt sogar ein 2,0-7,7 faches Entartungsrisiko vor (Brinton et al., 1997). Andererseits haben 28% der Frauen mit Ovarialkarzinomen vom endometrioiden Typ auch Endometriose (De Priest et al., 1992). Das Protein L1, welches in dieser Arbeit in Endometriose und Endometrium nachgewiesen wurde, ist ebenso in malignen Tumoren gefunden worden.

In dieser Arbeit wird die Expression des Glycoproteins L1 in Endometriose und Endometrium untersucht. L1 ist ein transmembranäres Glycoprotein, welches der Immunglobulin-Superfamilie angehört. Es wiegt 200-220 kDa und besitzt sechs Ig-ähnliche Untereinheiten. L1 ist ein Adhäsionsmolekül und ist an Funktionen wie Zellmigration und –adhäsion beteiligt. Es interagiert mit seiner extrazellulären Domäne mit weiteren Adhäsionsmolekülen, Molekülen der extrazellulären Matrix und Rezeptoren der Zelloberfläche (Oleszewski et al., 1999). Das Protein ist nicht nur in Zellmembranen, sondern auch in löslicher Form in der Peritonealflüssigkeit und in dem Serum gefunden worden. Dort wird es durch die Metalloproteinase ADAM10 freigesetzt (Maretzky et al., 2005). Lösliches L1 bindet homophil an weiteres L1 und an verschiedene Integrinbestandteile. So kann Migration durch L1 vermittelt werden. Migration ist nicht mehr möglich, wenn man die sechste Immunglobulin-ähnliche-Domäne von L1 mutiert (Duczmal et al., 1997). Die Immunglobulin-ähnliche-Domäne sechs bindet direkt an Integrine und unterstützt damit die integrinabhängige Zellmigration (Kadmon et al., 1998).

L1 kommt allerdings nicht nur in Karzinomen vor, sondern ist ein wesentliches Protein in der Entwicklung des Nervensystems, indem es das Auswachsen von Nervenzellen, deren Überleben und Myelinisierung bewirkt (Itoh et al., 2005). Mutationen im L1 Gen führen zu einer schweren neurologischen Krankheit, die CRASH genannt wird (Bearer, 2001, Demyanenko et al., 1999). Das CRASH-Syndrom ist durch Corpus callosum Aplasie, mentale Retardierung, adduzierte Daumen, spastische Paraplegie und Hydrocephalus definiert. L1-Mutationen sind bei verschiedenen Syndromen mit neurologischer Beteiligung anzutreffen, z.B. bei X-chromosomal vererbtem Hydrocephalus und dem MASA Syndrom (mentale Retardierung, Aphasie, schlurfender Gang, adduzierte Daumen) (Uyemura et al., 1994). L1 ist in Neuronen und Schwannzellen zu finden und wichtig für die Entwicklung des Nervensystems. L1 ist wesentlich an der Auswanderung der Neurone beteiligt und trägt zur regelrechten Myelinisierung durch Schwannzellen bei (Thelen et al., 2002, Fransen et al., 1997, Dahme et al., 1997). Damit ist L1 essentiell für unsere Gehirnentwicklung (Wong et al., 1995).

L1 ist zudem in mehreren malignen Tumoren gefunden worden. Dazu zählen Uteruskarzinome, Ovarialkarzinome, Gliome, rezidivierende Neuroblastome, maligne Melanome, Lungenkarzinome, Nierenzellkarzinome und Kolonkarzinome (Gavert et al., 2005, Fogel et al., 2004, Fogel et al., 2003, Evan-Rahm et al., 2001, Dale et al., 1989). Hierbei ist eine hohe L1-Expression assoziiert mit einem fortschreitenden Wachstum und einer Metastasierung. Lösliches L1 verursacht die Adhäsion und Migration von Tumorzellen (Gast et al., 2005). L1 ist beteiligt an der Differenzierung, Proliferation, Migration und Invasion von Zellen, bei Karzinomen ebenso wie bei Endometriose (Meier et al., 2006, Altevogt und Fogel, 2004, Mechttersheimer et al., 2001). Zellen von Ovarialkarzinomen setzen mehr L1 frei, wenn apoptotische Bedingungen herrschen. L1 ist dann in größerer Menge in Serum und Aszites der Patientinnen zu finden (Gutwein et al., 2005). Zudem dient L1 in Ovarialkarzinomen einem gewissen Apoptoseschutz (Stoeck et al., 2006). In diesem Zusammenhang wird L1 als Marker für Tumoraggressivität angeführt (Fogel et al., 2004). Endometriose und maligne Tumoren zeigen ein ähnliches Verhalten wie Ausbreitung, Infiltration, Expansion, verstärkte Angiogenese und Rezidivrate. Ausbreitung und Adhäsion von Endometriose hängen von verschiedenen Faktoren ab. Veränderungen in der Expression verschiedener Moleküle könnten hier eine Rolle spielen. Eines dieser Moleküle ist möglicherweise das in dieser Arbeit untersuchte Adhäsionsmolekül L1.

Mit anti-L1-Antikörpern ist im Tiermodell eine erfolgreiche Therapie des Ovarialkarzinoms gelungen. Hier hilft der L1-Antikörper gegen Tumorstreuung und Aszitesbildung (Matthias et al., 2006). Möglicherweise stellt solch ein anti-L1-Antikörper in Zukunft auch eine Therapieoption für Endometriose dar. Die Fragestellung in dieser Arbeit ist die Verteilung von L1 in Stroma und Epithel in Endometriose, in Endometrium von Endometriosepatientinnen und in Endometrium von Frauen ohne Endometriose. Dabei ist zu erwarten, dass in Endometriose eine hohe L1-Expression vorhanden ist, da sie die Eigenschaften mit den L1-exprimierenden Tumoren teilt. Die Unterscheidung in Epithel und Stroma ist insofern interessant, da Endometriose aus diesen zwei Zelltypen besteht. Um diese Zellen separat zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Technik der Mikrodissektion und quantitativen real time PCR verwendet.

2. Material und Methoden

2.1. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erfolgte mit in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe von Endometrioseläsionen und Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose. Aus den Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf SuperFrost Plus Slides (Menzel-Glaeser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht.

Periphere Nerven dienten als Positiv-Kontrolle, da diese Zellen viel L1 enthalten. Zur Verbesserung der Adhäsion des Gewebes auf dem Objektträger wurden diese über Nacht bei 38°C getrocknet. Danach erfolgte die Paraffinisierung und Rehydratation durch Xylen und einen Alkoholgradienten. Als Vorbehandlung für die Antigenaufnahme wurden die Proben für 15 Minuten bei 92°C in die Mikrowelle gestellt. Die Inaktivierung endogener Peroxydasen erfolgte durch Zugabe einer 0.3%igen H₂O₂-Lösung für 20 Minuten, die Blockierung von unspezifischen Bindungen mit Ziegenerum für weitere 20 Minuten. Danach wurden die Proben mit dem primären spezifischen monoklonalen L1 Mausantikörper mAb L1-14.10 bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgte die 30-minütige Inkubation mit verdünntem biotinisierendem Ziegen-anti-Maus IgG (Vectastain Elite, Vecta Lab, Burlingame, Kalifornien (CA), USA), gefolgt von weiteren 30 Minuten mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite, Vector Lab, Burlingame, Kalifornien (CA), USA). Anschließend wurden die Proben noch mit Peroxydasesubstrat-Lösung (AEC, Zymed Lab, San Francisco, Kalifornien (CA), USA) inkubiert. Nach dem Abwaschen mit Wasser folgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland), eine Dehydratation und dann die Abdeckung mit Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die gefärbten Gewebeproben wurden von drei Untersuchern unabhängig voneinander ausgewertet, ohne dass sie Kenntnisse über Patientinnendaten hatten.

2.2. Patientinnenkollektiv

Proben wurden von Probandinnen rekrutiert, die eine Einwilligungserklärung zur „Entnahme und Aufbewahrung von Blut, Peritonealflüssigkeit, Endometrium und Endometriosegewebe im Rahmen ergänzender wissenschaftlicher Untersuchungen (Ethikantrag 03-068, 11.11.05) unterschrieben haben.

Die Proben wurden von Patientinnen im Alter zwischen 18 und 45 Jahren entnommen. Die Endometriosepatientinnen wurden von einem erfahrenen Operateur nach dem rAFS-(revised American Fertility Society) System in die Stadien eins bis vier eingeteilt. Der Grad der Endometriose wurde anhand der

laparoskopisch sichtbaren Adhäsionen und der Größe und Infiltrationstiefe der Endometrioseimplantate bestimmt (Tab. 1). Zusätzlich wurde die Diagnose histologisch gesichert. Als Kontrollen dienten Patientinnen mit subserösen Myomen und Wunsch nach Sterilisation sowie Patientinnen mit benignen Ovarialzysten. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft und Karzinome. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Untersuchung bei -197°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Revidierte AFS-Klassifikation der Endometriose

Stadium I (gering)	1-5	Punkte
Stadium II (mäßig)	6-15	Punkte
Stadium III (schwer)	16-40	Punkte
Stadium IV (ausgedehnt)	> 40	Punkte

	Endometriose	< 1cm	1-3cm	> 3cm
Peritoneum	Oberflächlich	1	2	3
	Tief	2	4	6
Ovar (rechts)	Oberflächlich	1	2	4
	Tief	4	16	20
Ovar (links)	Oberflächlich	1	2	4
	Tief	4	16	20
Douglas-Obliteration		Partiell 4		Komplett 40
	Verwachsungen	< 1/3 bedeckt	1/3-2/3 bedeckt	> 2/3 bedeckt
Ovar (rechts)	Schleierartig	1	2	4
	Dicht	4	8	16
Ovar (links)	Schleierartig	1	2	4
	Dicht	4	8	16
Tube (rechts)	Schleierartig	1	2	4
	Dicht	4*	8*	16
Tube (links)	Schleierartig	1	2	4
	Dicht	4*	8*	16

* Falls die Fimbrien komplett verschlossen sind: 16 Punkte

Tab. 1: rAFS-Klassifikation zur Stadieneinteilung der Endometriose.

2.3. Gefrierschnitte

Die Endometriumproben wurde aufgetaut, in Kryotek Einbettmedium (Einbettmedium für Gefrierschnitte, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) gelegt und darin wieder gefroren. Am Kryostat wurden die Schnitte bei -20°C auf PALM MembranSlides (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried) aufgebracht, die vorher 30 Minuten mit UV Licht bestrahlt wurden, um RNase frei zu sein. Die Dicke der Schnitte wurde auf 5µm eingestellt. Nach kurzem Trocknen standen die Schnitte auf Trockeneis.

Um die Qualität der Schnitte zu kontrollieren, wurde ca. jeder 10. Schnitt auf einen normalen Objektträger gebracht und mittels HE-(Hämatoxylin Eosin) Färbung sofort gefärbt und unter dem Mikroskop begutachtet.

2.4. Färbung mit Toluidinblau

Die hierfür benutzte Glasware wurde vor dem Gebrauch 4 Stunden bei 180°C erhitzt und war damit RNase frei.

Als erstes erfolgte ein 30 sec langes Eintauchen in 75% Ethanol (EtOH), es folgten 30 sec in DEPC-Wasser. Mit einer Spritze und einem Filter wurde 0,1%iges Toluidinblau auf die Schnitte gegeben und diese für drei Minuten inkubiert. Dann wurden die Objektträger mit DEPC-Wasser abgewaschen und die Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. War das Gewebe genügend gefärbt, folgten ein weiterer Waschgang mit DEPC-Wasser und zwei Waschgänge mit 100% EtOH. War das Gewebe nicht genügend gefärbt, folgte eine zweite einminütige Inkubation mit Toluidinblau. Die Objektträger wurden stehend getrocknet und dann auf -80°C eingefroren.

2.5. Mikrodissektion

Für die Mikrodissektion wurden je ein Objektträger mit Endometrium aufgetaut und ein RNase freies Eppendorfgefäß vorbereitet. In den Deckel des Gefäßes wurde ein Tropfen Mineralöl (Sigma diagnostics, St. Louis, USA) gegeben und dann soweit wieder entfernt, so dass der Deckel innen von Öl benetzt war. Hier wurde das Probenmaterial der Mikrodissektion aufgefangen.

Mit Hilfe eines Mikrodissektionsgerätes (MicroBeam mit PALM Robo Software, Palm Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) wurde Epithel und Stroma von Endometrium getrennt. Der Objektträger lag unter dem Mikroskop, ein Eppendorfgefäß war auf dem Kopf stehend so platziert, dass der Deckel wenige

Millimeter über dem einzusehenden Bereich des Objektträgers war. Das Gewebe war sowohl durch das Mikroskop selbst, als auch auf einem Bildschirm daneben sichtbar. Mit dem Programm [Palm@Robs](#) (Palm Robo Software, Palm Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) wurde bei einer 10fachen Vergrößerung Drüsenepithel ausgeschnitten und in den Deckel des Eppendorfgefäßes gelasert (Abb.1-3). Es wurden je 5 bis 12 Millionen μm^2 gesammelt. Dann wurde der Probe 350 μl RLT-Puffer, der vorher frisch mit Mercaptoethanol versetzt wurde, zugegeben. So wurden die RNAsen vollständig inaktiviert und das Probenmaterial aufgeschlossen. Das Eppendorfgefäß wurde eine halbe Stunde auf den Kopf gestellt und stark geschüttelt, um das Probenmaterial im Puffer zu lösen. Anschließend wurde es auf dem Kopf stehend auf -20°C eingefroren.

Das Stroma wurde mit der gleichen Vorgehensweise gesammelt (Abb.4, 5).

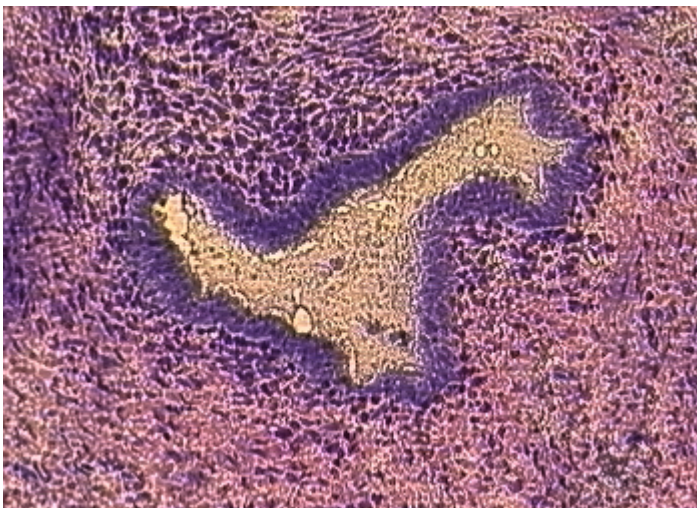


Abb. 1: Endometriumdrüse mit Epithel, umgeben von Stroma vor Lasermikrodissektion. 10fache Vergrößerung

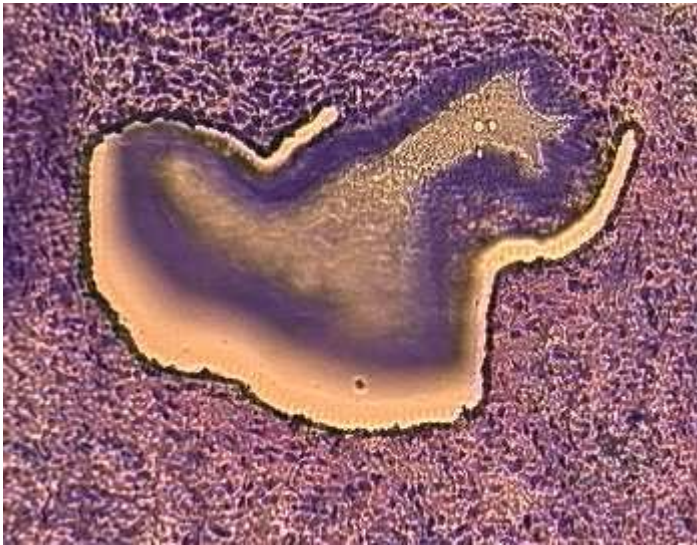


Abb. 2: Endometriumdrüse mit Epithel während Lasermikrodissektion. 10fache Vergrößerung

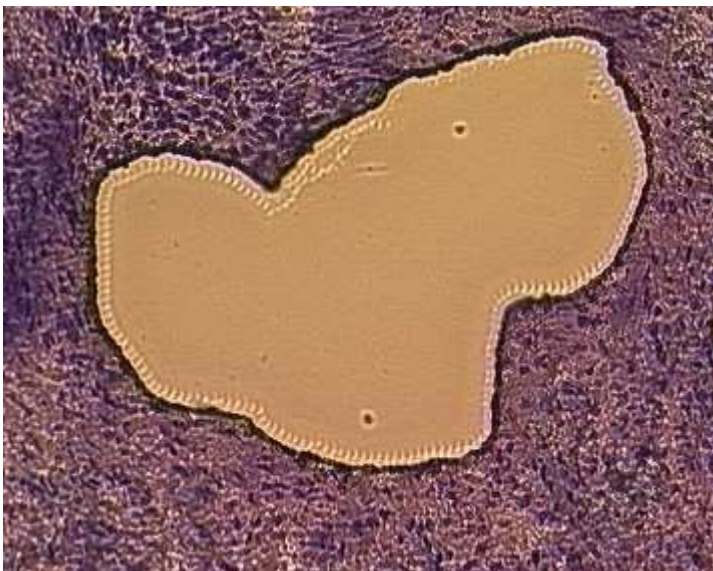


Abb. 3: Endometriumstroma nach Entfernung der Drüse durch Lasermikrodissektion. 10fache Vergrößerung

2.6. RNA Isolation

Die RNA Isolation und die weiteren Schritte wurden unter einem Abzug bzw. einer sterilen Bank durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde mit RNA und DNA an unterschiedlichen sterilen Bänken gearbeitet.

RNA wurde mit dem RNeasy Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) isoliert (Abb. 4). Probenmaterial waren die aus der Mikrodissektion gewonnenen Epithel- oder Stromazellen. Nach dem Auftauen wurden die durch den RLT-Puffer aufgeschlossenen Proben durch Pipettieren mit Kanülen von 24mm Durchmesser homogenisiert. Dann wurde eine gleiche Menge an Ethanol zur Probe zugegeben, um das Bindungsvermögen der Probe an die Säule zu optimieren. Eine RNeasy Mini-Säule (Quiagen, Hilden, Deutschland) wurde in einer 2-ml-Sammelsäule

platziert. Hierauf wurde die Probe 700µl-weise aufgetragen und je 30 sec lang bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dies erfolgte, bis kein Probenmaterial mehr vorhanden war. Zum Waschen wurde 350µl RW1-Puffer auf die Säule aufgetragen und 30 sec bei 10000 rpm zentrifugiert.

Als nächstes wurde ein DNase Verdau an der Säule durchgeführt. Es wurde das RNase-freie DNase Set (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dabei wurden 10µl DNase stock solution mit 70µl RDD-Puffer gemischt und direkt auf die RNeasy silica-Gel Membran der Säule gegeben. Diese Lösung wirkte für 15 min bei 20-30°C auf die noch in der Säule enthaltene DN A ein. Als nächster Schritt wurde erneut 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und 30 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues 2ml Eppendorfgefäss gestellt. Dort wurde die Säule mit 500 µl RPE-Puffer einmal für 30 sec und dann noch einmal für zwei min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde je verworfen und das Auffanggefäß auf Zellulose trocken geklopft. Nun wurde die Säule bei 13000 rpm eine min lang trocken zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Eppendorfgefäss mit Deckel gestellt. Es wurde 30 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und eine Minute lang inkubiert. Dann wurde die RNA in diesem Wasser eluiert, in dem die Säule eine min lang bei 10000 rpm zentrifugiert wurde. Der Elutionsschritt wurde in dem gleichen Auffanggefäss ein weiteres Mal durchgeführt.

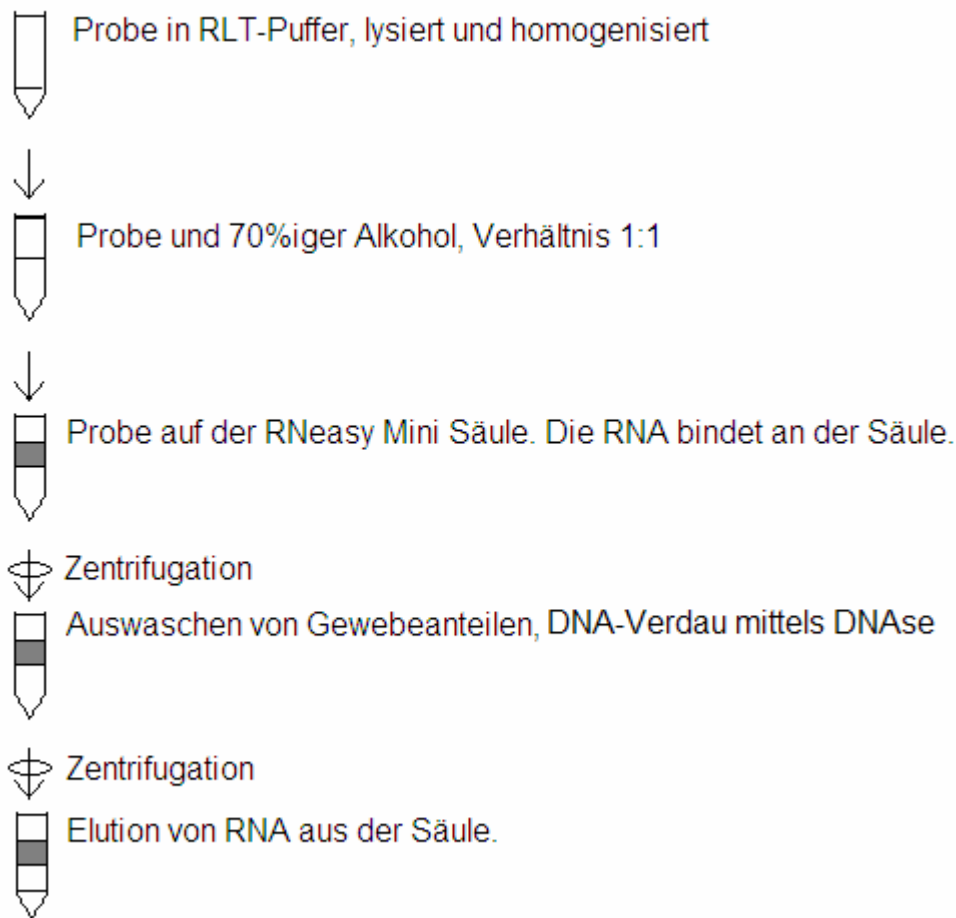


Abb. 4 : Skizze zur RNA-Isolierung.

2.7. RNA Einengung

In einer Vakuumkonzentrationszentrifuge (Eppendorf concentrator 5301, Eppendorf Ag, Hamburg, Deutschland) wurde die RNA auf ca. 8µl eingengt, um sie vollständig für die Umschreibung in cDNA einsetzen zu können. In der Zentrifuge herrschten 60°C und Unterdruck. Die Deckel der Eppendorfgefäße wurden mit einer 0,45mm Kanüle 11-mal durchstoßen, so dass Wasser verdampfen konnte. Ein Teil des Wassers verdampfte, während RNA durch das Zentrifugieren zurückgehalten wurde.

Primer:

Für die Umschreibung von RNA in cDNA wurden Random Primer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) benutzt.

Primer sowohl für das L1-Gen als auch für das HPRT-Gen waren von Metabion (Martinsried, Deutschland). Die Sequenz des L1 Gens ist 23 bzw. 22 Basenpaare lang. Die Primer für das HPRT Gen ist 21 bzw. 23 Basenpaare lang (Tab. 1).

Primer	Sequenz	Nukleotidsequenz
L1 vorwärts	5'-3'	GCA GCA AGG GCG GCA AAT ACT CA
L1 rückwärts	5'-3'	CTT GAT GTC CCC GTT GAG CGA T
HPRT vorwärts	5'-3'	CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT
HPRT rückwärts	5'-3'	CCA GCA GGT CAG CAA AGA ATT TA

Tab. 1: Die hier aufgeführten Primer für L1 und HPRT wurden für die quantitative real time PCR eingesetzt.

2.8. Umschreibung von RNA in cDNA (copy DNA)

Aus RNA kann durch reverse Transcriptase cDNA hergestellt werden. Als reverse Transcriptase wurde SuperSkript 2 Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) benutzt. Als erstes wurden die Proben mit HPLC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mit 1 µl Random Primer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 10 min bei 70°C inkubiert. Dadurch sollte eine Anlagerung der Primer an die RNA erreicht werden.

In einer zweiten Phase erfolgte die Zugabe von einem Mix aus 4 µl 5x First Strand Buffer (20mM Tris-HCL, pH 7.5, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 2 µl DTT (0.1M, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1µl dNTPs in DEPC-Wasser (10mM, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1µl RNase Out (40 units/µ, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1 µl des Enzyms Reverse Transcriptase (SuperSkript 2, 200 units/µl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Dies wurde in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, USA) 30 min bei 50°C inkubiert. Dabei synthetisiert die RNA-abhängige Reverse Transcriptase an der einzelsträngigen RNA in 5'-3' Richtung eine komplementäre DNA, die cDNA. Die cDNA wurde im Anschluss bei -80°C gelagert.

2.9. Real time PCR

Die Polymerase Ketten Reaktion dient dem Nachweis von bestimmten DNA-Fragmenten durch Vervielfältigung. Bei der real time PCR weist man die entsprechende DNA nach, indem man zum Reaktionsprodukt einen Fluoreszenzfarbstoff hinzu gibt, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert. Am Ende jedes Vermehrungszyklus der DNA wird entsprechend das Fluoreszenzsignal gemessen.

Die PCR wurde mit dem DNA Engine OPTICON 2 Continuous Fluorescence Detector der Firma Biorad (München, Deutschland) durchgeführt und mit OPTICON 2 Software (Biorad, München, Deutschland) und Excel (Microsoft

Technologies, Seattle, USA) ausgewertet.

Die PCR Platte (Hard Shell Thin Wall 96-Well Microplate, MJ Research, Waltham, USA) wurde je mit Patientenproben von Epithel und Stroma und Standards für L1 und HPRT belegt. In jedes Gefäß wurden 23µl eines Mixes und anschließend 2 µl der Standards und Kontrollen bzw. 19 µl eines entsprechenden Mixes und anschließend 6 µl der Patientenprobe pipettiert, so dass jeweils 25 µl vorhanden waren. Der Mix wurde vorher aus 12,5 µl Platinum SYBR Green (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 µl L1- oder HPRT-Primer und 8 µl HPLC-Wasser hergestellt. Die Platte wurde mit einem Microseal B Adhesive Seal (Biozym, Oldendorf, Deutschland) verschlossen und in einer Plattenzentrifuge (Universal 32 Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert, so dass in der Flüssigkeit keine Luftblasen mehr eingeschlossen waren.

Der DNA Engine OPTICON 2 Continuous Fluorescence Detector wurde für L1 und HPRT optimiert eingestellt:

1. 2 min 50°C
2. 2 min 95°C
3. 15 sec 95°C
4. 15 sec 56°C
5. 15sec 72°C
6. Fluoreszenzmessung

Die Schritte 3. bis 6. wurden insgesamt 50-mal wiederholt.

2.10. Auswertung

Die Auswertung geschah mit Hilfe von OPTICON 2 Software (Biorad, München, Deutschland), Microsoft Excel (Microsoft Technologies, Seattle, USA) und Graph Pad Prism 4 für Windows (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA). Die PCR-Ergebnisse wurden mittels T-Test ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. L1 Nachweis mittels Immunhistochemie

3.1.1. Immunhistochemischer L1-Nachweis in Endometrioseläsionen

Mit Hilfe von Immunhistochemie kann das Glycoprotein L1 in Endometrioseläsionen von Endometriosepatientinnen nachgewiesen werden. Im Epithel ist die L1-Färbung deutlich stärker ausgeprägt als im Stroma. Daran erkennt man eine höhere Expression von L1 in Epithel (Abb. 5).

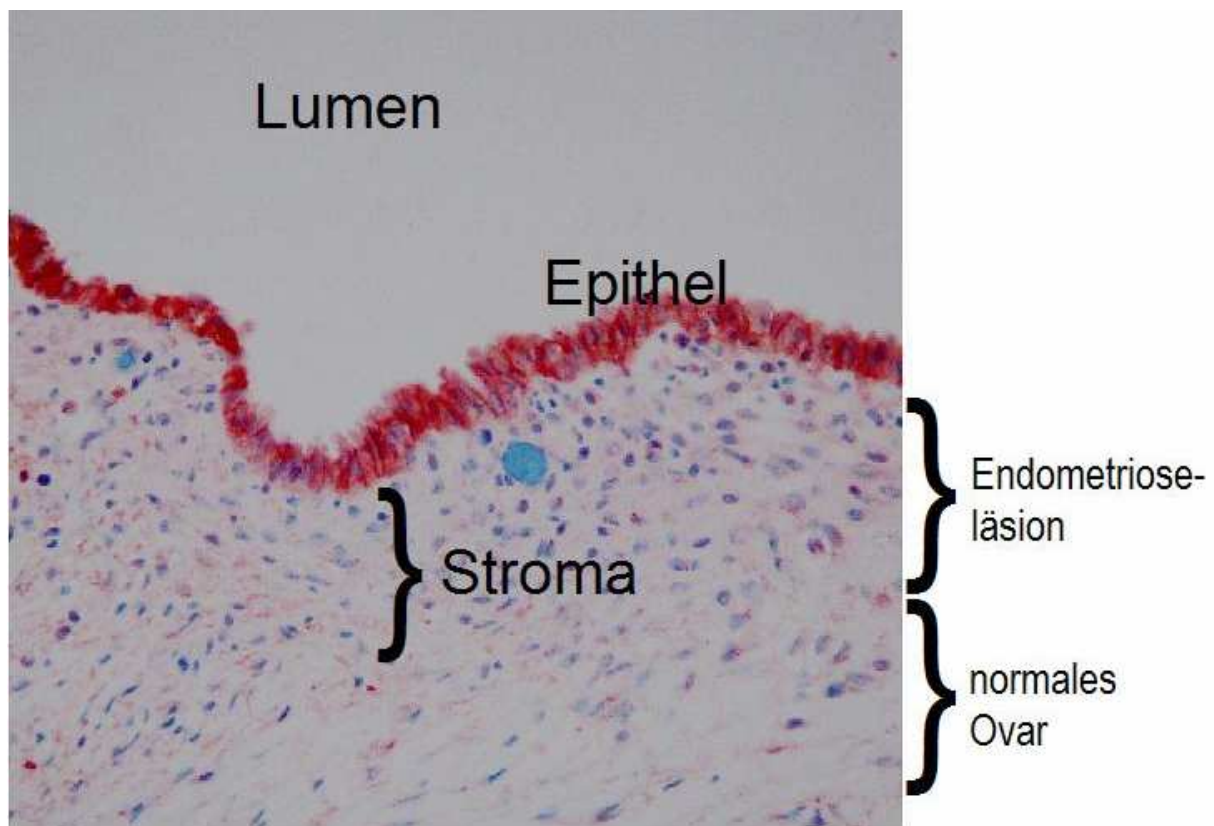


Abb. 5: L1-Immunhistochemie einer Endometriosezyste des Ovars, Vergrößerung x 20.

Die immunhistochemische L1 Färbung (rot-braun) von Endometriosegewebe zeigt eine stark positive L1-Anfärbung im Epithel und eine sehr schwach positive L1-Färbung im Stroma.

3.1.2. Immunhistochemischer L1-Nachweis in Endometrium

Das immunhistochemische Bild einer normalen Endometriose zeigt eine geringe L1-Expression. Sehr stark angefärbt ist ein peripherer Nerv. Er dient als interne Färbungs-Kontrolle, denn er enthält viel L1-Protein (Abb. 6).

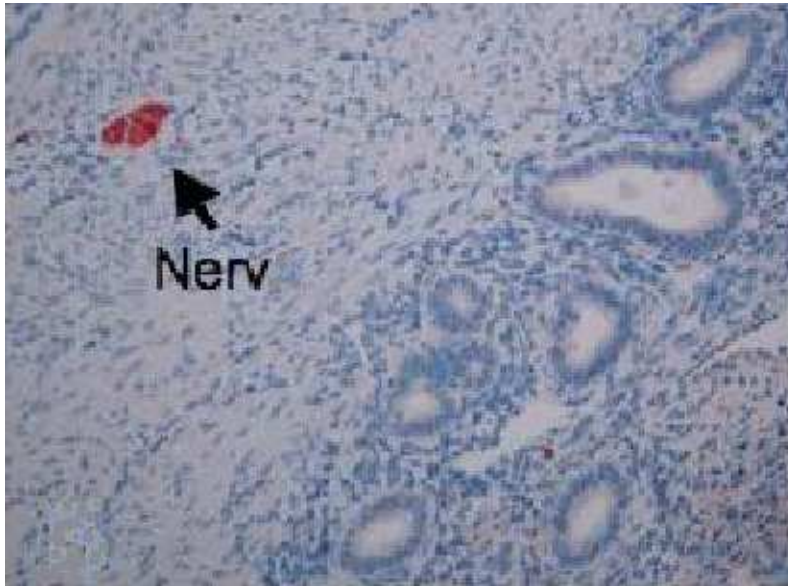


Abb. 6: L1-Immunhistochemie von normalem Endometrium. Die immunhistochemische L1 Färbung (rot-braun) zeigt sich hier nur im Bereich eines Nervens positiv.

3.2. L1 Nachweis mittels RT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von L1-mRNA im Endometrium von an Endometriose erkrankten und gesunden Frauen gemessen.

In der quantitativen RT-PCR ist wesentlich, nach wie vielen Zyklen die PCR-Produkte exponentiell ansteigen. Man vergleicht das Zielgen mit dem Housekeeping-Gen und den Standards. In den Standards ist jeweils eine bestimmte Anzahl an Molekülen vorhanden. Die quantitative real time PCR zeichnet sich dadurch aus, dass man die Molekülzahl während der PCR nach jedem Amplifikationszyklus misst. Die Standardkurven sind regelrecht angestiegen (Abb. 7). Der Unterschied des SYBR-Green Anstiegs von HPRT und L1 zeigt, dass unterschiedlich viel mRNA in den Zellen vorhanden ist. L1 ist in geringeren Mengen vorhanden als HPRT (Abb. 8).

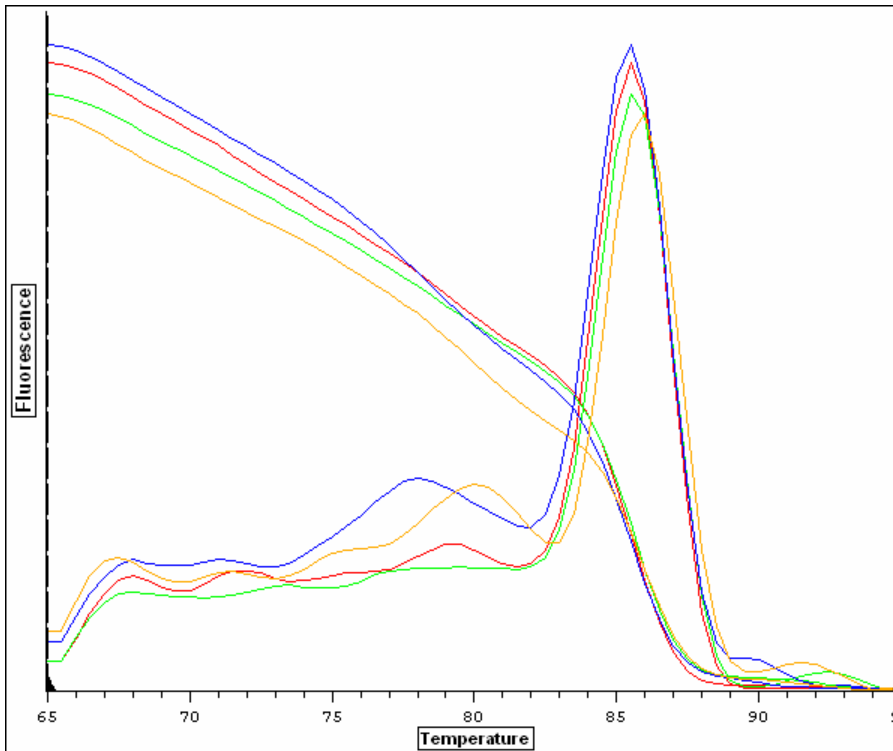


Abb. 7: Die Schmelzanalyse der DNA-Produkte von vier Standards nach Beenden der PCR. Die Schmelzkurven weisen ein Maximum bei 85,5°C auf, hier hat die DNA von L1 seinen Schmelzpunkt. Die absteigenden Kurven zeigen das insgesamt weniger werdende Fluoreszenzsignal.

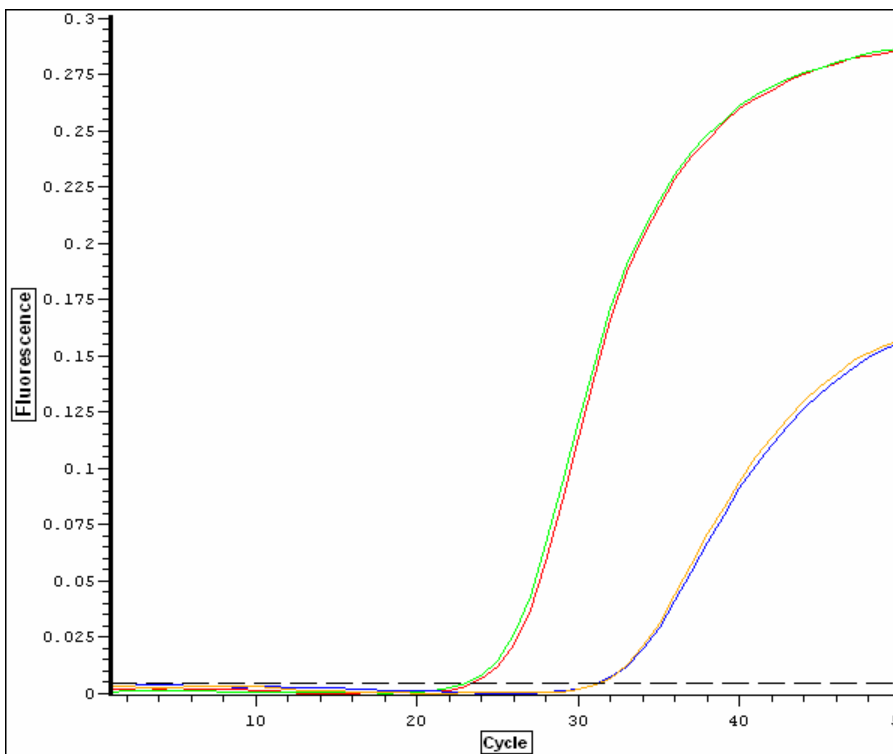


Abb. 8: Vergleich des SYBR-Green Anstieges von HPRT und L1. Abgebildet ist der DNA-Anstieg von HPRT einer Epithel-Probe: linke Kurven, Anstieg bei Zyklus 23. Der L1-DNA-Anstieg der gleichen Probe liegt bei Zyklus 31. Aufgrund der üblichen Doppelbestimmungen sind je zwei Kurven abgebildet.

3.2.1 L1 Nachweis in Endometrium

Endometriumproben von Endometriosepatientinnen (Eo) und von Kontrollpatientinnen (Co) werden auf ihren Gehalt an L1-mRNA untersucht. Nach cDNA-Amplifikation ist dies in der quantitativen RT-PCR möglich. Es wird die Ratio aus den L1-Molekülzahlen und den HPRT-Molekülzahlen berechnet, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Mit Hilfe von Kryoschnitten und Mikrodissektion ist es gelungen, Epithel und Stroma einer Probe getrennt zu untersuchen.

In Endometrium von Endometriosepatientinnen wird zwar keine höhere L1-Expression festgestellt als bei Kontrollpatientinnen. Eine Tendenz dahingehend ist erkennbar, denn das Signifikanzniveau von $P < 0,05$ ist fast erreicht ($P = 0,0695$) (Abb. 9).

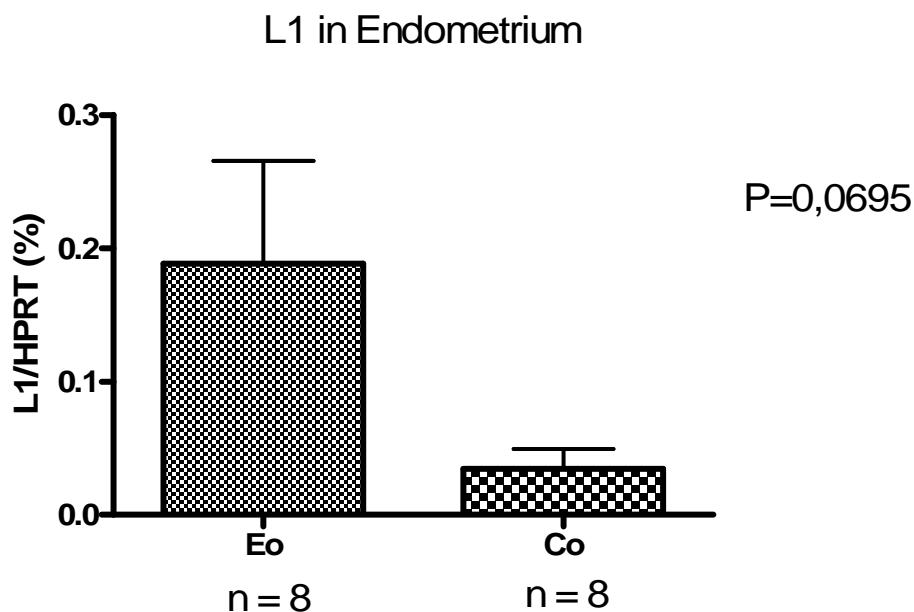


Abb.9: Ratio aus L1 zu HPRT (housekeeping Gen). Vergleich des Gesamtendometriums von Endometriosepatientinnen und Kontrollen. Endometriosepatientinnen haben im Gesamtendometrium tendenziell mehr L1-RNA als Kontrollpatientinnen. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Untersucht wurden Proben von jeweils acht Frauen.

Es wurde ein Vergleich der L1-Expression in Endometrium von Endometriosepatientinnen zwischen deren Epithel und Stroma vorgenommen (Abb.10). Außerdem wurde ein Vergleich der L1-Expression in Endometrium von Kontrollen zwischen deren Epithel und Stroma vorgenommen (Abb.11).

Der Vergleich zwischen Epithel und Stroma des Endometriums erbrachte, dass bei Endometriosepatientinnen und bei Kontrollen in Epithel und Stroma gleich viel L1 anzufinden ist. Der leicht höhere Wert im Stroma ist statistisch nicht signifikant (Abb.10, 11).

Die mRNA-Mengen sowohl von L1 als auch von HPRT sind minimal.

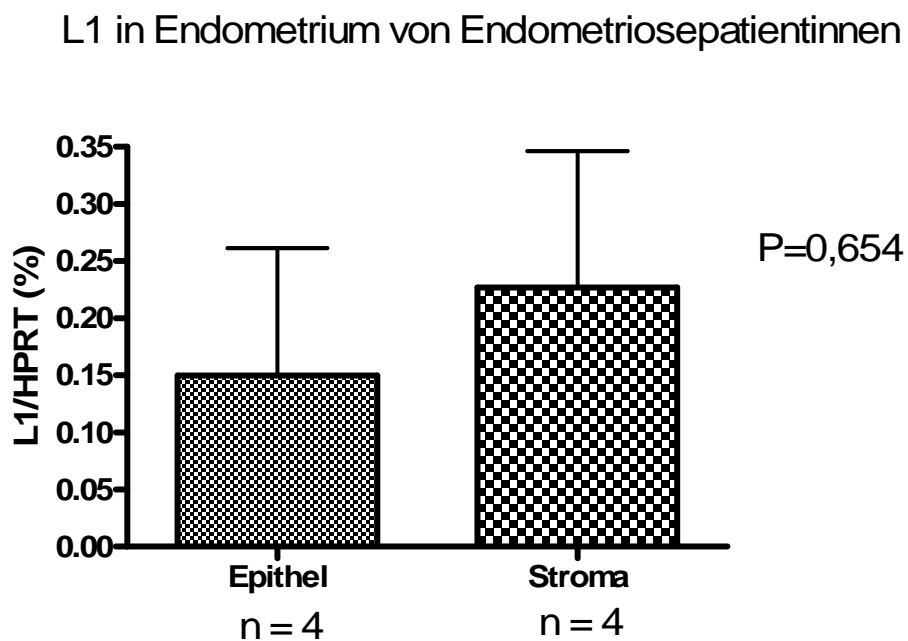


Abb. 10: In Endometrium von Frauen mit Endometriose kann man keinen Unterschied der L1-Verteilung zwischen Epithel und Stroma ausmachen. Untersucht wurden Proben von jeweils vier Frauen.

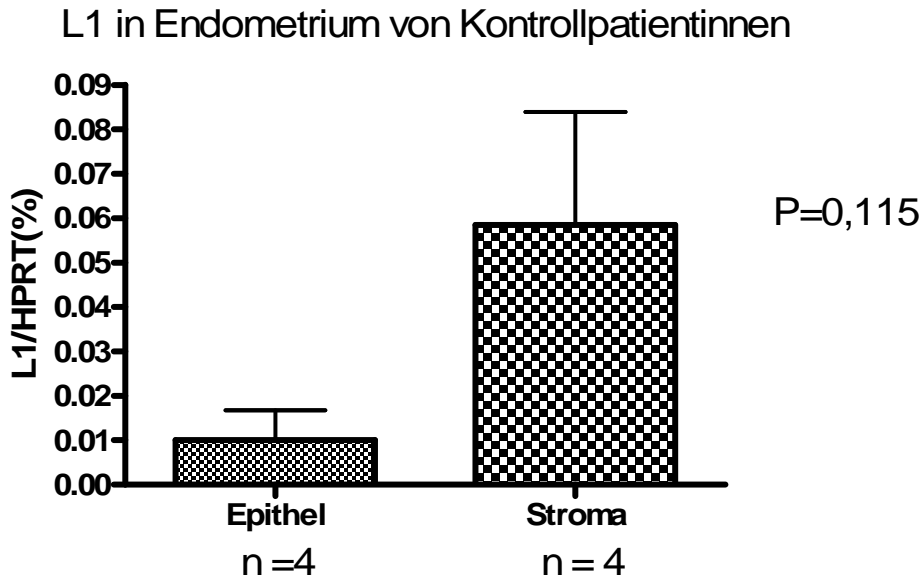


Abb. 11: In Endometrium von Kontrollpatientinnen kann man keinen Unterschied der L1-Verteilung zwischen Epithel und Stroma ausmachen. Untersucht wurden Proben von jeweils vier Frauen.

3.2.2 L1 Nachweis in Endometriose

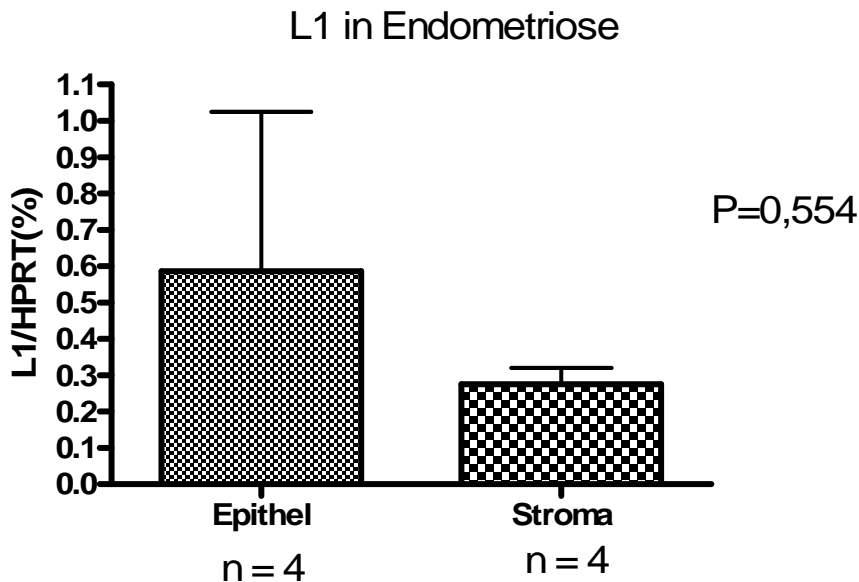


Abb. 12: Die L1-mRNA Menge in Endometriose ist in Epithel tendenziell höher als in Stroma. Diese Aussage ist jedoch nicht statistisch signifikant. Untersucht wurden Proben von jeweils vier Frauen.

Die Ergebnisse der PCR zeigen, dass im Endometrium von Endometriosepatientinnen eine tendenziell höhere Expression von L1 vorhanden ist als bei Kontrollpatientinnen. Zwischen Epithel und Stroma des Endometriums ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 12). In Endometrium ist L1 insgesamt in sehr niedrigen Mengen vorhanden.

In Endometriose ist L1 auch nachzuweisen. Der Unterschied zwischen Epithel und Stroma ist ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Bei einer größeren Stichprobenzahl wären einige der Ergebnisse möglicherweise signifikant geworden.

4. Diskussion

Für einige der gemeinsamen Eigenschaften von Endometriose und Karzinomen könnte das durch diese Arbeit in Endometriose nachgewiesene Adhäsions- und Migrationsprotein L1 mitverantwortlich sein. Aus Endometriose können maligne Tumoren entstehen. Brinton et al. haben ein erhöhtes Entartungsrisiko bei Endometriosepatientinnen nachgewiesen (Brinton et al., 1997). Endometriose ist jedoch nicht mit einem generell erhöhten Krebsrisiko assoziiert (Somigliana et al., 2006). Endometriosepatientinnen haben ein höheres Risiko für Melanome und Non-Hodgkin-Lymphome. Auch Somigliana et al. (Somigliana et al., 2006) berichtet über ein ca 1,6-fach erhöhtes Risiko für Ovarialkarzinome. Ulrich et al. postulieren ein 1%ig erhöhtes Malignomrisiko bei Endometriosepatientinnen. Davon sind 80% Ovarialkarzinome, 20% extragonadale Tumore wie rektosigmoidale und rektovaginale Tumore (Ulrich et al., 2003). Die hohe Inzidenz von Ovarialkarzinomen bei Endometriosepatientinnen wird darauf zurückgeführt, dass die Endometriose eine Vorstufe von endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen sein könnte. Von Prowse et al. wurde mittels 82 Mikrosatelliten-Markern der Verlust von einem von zwei heterozygoten Genen untersucht. Alle zweiundzwanzig in Endometriose nachgewiesenen Mutationen waren auch in dem Ovarialkarzinom der gleichen Patientin vorhanden. In Karzinomzellen waren allerdings nicht nur genau diese zweiundzwanzig Mutationen nachzuweisen, sondern insgesamt 63 der 82 untersuchten Mikrosatelliten-Marker. Interessanterweise zeigte Endometriose keine Mutationen, die nicht auch in dem entsprechenden Karzinom vorhanden waren (Prowse et al., 2006). In der Literatur finden sich weitere Fälle von Karzinomen innerhalb von Endometrioseherden. Zum Beispiel wurde in einem rezidivierenden Endometrioseherd einer 46jährigen Frau Anteile eines klarzelligen und endometrioiden Karzinoms festgestellt (Razzouk et al., 2006). Das Vorkommen von Endometriose in Ovarialkarzinomen liegt in Japan bei 14,5%. In der entsprechenden Studie wurden 172 Ovarialtumore untersucht. Die höchste Endometrioseinzidenz wurde bei dem klarzelligen Ovarialkarzinom (40,6%) und bei dem endometrioiden Ovarialkarzinom (23,1%) nachgewiesen (Jimbo et al., 1997). In einer weiteren Studie entwickelten drei von vier Patientinnen mit atypischer Endometriose einen malignen Tumor (Chalas et al., 1991). Interessanterweise ist in atypischer Endometriose mehr Adhäsionsmolekül L1 nachweisbar als in typischer Endometriose (Finas et al., 2008).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass Endometriose maligne entarten kann, ist die Tatsache, dass in einigen Fällen von Endometriose assoziierten Ovarialkarzinomen eine Übergangszone von benignem zu malignem Epithel auszumachen war (De Priest et al., 1992). Es gibt eine Form der kutanen Endometriose, die als pseudomaligne bezeichnet wird (Pellgrini, 1982).

Ness et al. sprechen von einer weiteren Erklärung für Tumorassoziation mit Endometriose: Endometriose bewirkt lokal und systemisch eine Inflammationsreaktion und eine Veränderung des Hormonhaushalts. Diese könnte für die Tumorentstehung mitverantwortlich sein. Wenn dies der Fall wäre, dann müsste Endometriose als Risikofaktor für Tumorentstehung berücksichtigt werden (Ness und Modugno, 2006). Durch den Nachweis von L1 in Endometriose ist dieses Protein als ein potenzieller Faktor in der Tumorentstehung anzusehen. Durch einige der L1-Funktionen könnte die in den oben genannten Studien vermutete Endometriose-Tumor-Sequenz miterklärt werden.

Das Adhäsionsmolekül L1 ist in den verschiedensten malignen Tumoren nachgewiesen worden. Dazu gehören das Phäochromozytom, Uteruskarzinome, Ovarialkarzinome, Gliome, rezidivierende Neuroblastome, maligne Melanome, Lungenkarzinome, Nierenzellkarzinome, Adenokarzinome der Harnblase, kleinzellige Bronchialkarzinome, Pankreaskarzinome und Kolonkarzinome (Sebens Mürköster et al., 2007, Huszar et al., 2006, Gavert et al., 2005, Fogel et al., 2004, Fogel et al., 2003, Evan-Rahm et al., 2001 Dale und Brandtzaeg, 1989). Es wurden 31 neuroendokrine Tumoren der Haut auf L1 untersucht. Dabei wiesen fast alle Tumoren L1 auf. Es wurde allerdings signifikant weniger L1 in Metastasen und Rezidiven festgestellt (Deichmann et al., 2003). L1 ist in 80% der Pankreaskarzinomarten vorhanden. L1 Überexpression bewirkt eine Chemotherapieresistenz. Durch Inhibition von L1 ließ sich diese Chemotherapieresistenz deutlich senken (Sebens Mürköster et al., 2007). Zum Teil ist die L1-Überexpression ein Faktor für Tumorprogression und für eine besonders schlechte Prognose. L1 bewirkt Adhäsion, Migration und Genregulation in Endometrium- und Ovarialkarzinomen (Altevogt und Fogel, 2004). Diese Eigenschaften können analog auch in Endometriose gesehen werden. Ausbreitung und Adhäsion von Endometriose hängt von verschiedenen Faktoren ab. Veränderungen in der Expression verschiedener Moleküle bewirken Veränderungen der Zellaktivitäten. Eines der wesentlichen Moleküle hierfür könnte auch bei Endometriose das Adhäsionsmolekül L1 sein, welches in dieser Arbeit untersucht

wurde. Hohe L1 Expression in Gewebe und Serum von Patienten mit Karzinomen ist mit Rezidiven und kurzer Überlebenszeit assoziiert. Dies ist unabhängig von dem histologischen Subtyp des Ovarial- oder Endometriumkarzinoms. L1 wird als potenzieller Marker für Tumoraggressivität diskutiert, der eine zusätzliche Bestimmung zur histologischen Klassifikation bieten könnte. Lösliches L1 signalisiert Krankheitsprogression und Rezidive, bevor klinische Zeichen auftreten. Anti-L1-Antikörper könnten möglicherweise eine bessere Therapie von Endometrium- und Ovarialkarzinomen ermöglichen (Fogel et al., 2004, Altevogt und Fogel, 2004). L1 ist allerdings nicht in allen Tumoren und deren Subtypen vorhanden (Huszar et al., 2006).

In diese Arbeit wurde gezeigt, dass Endometrioseläsionen immunhistochemisch vor allem im Epithel eine hohe L1-Konzentration aufweisen. Diese Aussage kann mit den PCR-Ergebnissen dieser Arbeit nur tendenziell untermauert werden. An Kolonkarzinomzellen ist herausgefunden worden, dass L1 durch β -Catenin induziert wird. Es ist vor allem an der invasiven Front des Tumors zu finden und ist für hohe Motilität und Migration zuständig (Gavert et al., 2005). Die Zugabe von L1 Antikörpern zu Tumorzellen vermindert deren Wachstum, Motilität und Invasion. In Mäusen führt eine Injektion von L1 exprimierenden Zellen zur Tumorentstehung. In diesen Tumoren lies sich wiederum L1 nachweisen (Gavert et al., 2005). Im Regelfall bewirken ADAM 10 und ADAM 17 die Abspaltung des extrazellulär gelegenen Anteils von L1 (Stoek et al., 2006, Gutwein et al., 2002). Sowohl ADAM 10 als auch L1 wurden vermehrt in Epithel von Endometriose nachgewiesen (Hornung et al., 2005). Das stützt die in dieser Arbeit nachgewiesene L1-Lokalisation in Epithel von Endometriose. In Endometrium konnte kein signifikanter Unterschied der L1-Verteilung zwischen Epithel und Stroma nachgewiesen werden.

Außer dem Adhäsionsmolekül L1 gibt es weitere Proteine, die in Tumoren und malignen Erkrankungen vorkommen. Das Protoonkogen c-kit ist in malignen und benignen Tumoren sowie in Endometriose und Endometrium von Endometriosepatientinnen nachgewiesen worden. In Endometrium und Endometriose wurde es nur im Epithel gefunden. In invasiver Endometriose wurde c-kit hoch exprimiert nachgewiesen (Uzan et al., 2005). Es liegt also eine Assoziation von exprimierten Proteinen mit bestimmten Eigenschaften der Endometriose vor. Außerdem existieren bestimmte Lokalisationen von Proteinen, die ihren Funktionen entsprechen. Dementsprechend ist die L1-Lokalisation in dem Epithel von Endometriose zu erwarten. Immunhistochemisch wurde dort im Gegensatz zum

Stroma eine hohe L1-Expression nachgewiesen.

Bei Endometriose kommen metastasenähnlich Absiedelungen vor (Starzinski-Powitz et al., 2001). In vitro wurde gezeigt, dass die invasiven Eigenschaften von Endometriose auch in der Zellkultur beibehalten werden. Drei von vier untersuchten epithelialen Endometriosezell-Linien hatten ein ähnlich invasives Potenzial wie metastasierende Tumorzellen. Eine der Endometriosezell-Linien, eutopes Endometrium und nichtmetastasierende Tumorzellen hatten kein invasives Potenzial (Zeitvogel et al., 2001). Ein Faktor, der die Invasivität der Endometriosezellen fördern kann, ist Peritonealflüssigkeit. Gibt man zu dem Kollagen-Invasions-Assay Peritonealflüssigkeit, dann steigt die invasive Potenz der Zellen. Der Effekt blieb auch nach Herausfiltern von Steroiden und Wachstumsfaktoren sowie nach Erhitzen der Peritonealflüssigkeit auf 95°C erhalten. Eutopes Endometrium konnte durch die Wirkung von Peritonealflüssigkeit kein invasives Potential entwickeln (Starzinski-Powitz et al., 1998). In Endometrioseepithel fehlt wie bei einigen Tumoren das Tumor-Suppressor-Molekül E-Cadherin. Es verhindert normalerweise die Invasion von Gewebe (Gaetje et al., 1997). Genetische Vergleiche zwischen einer invasiven und einer nicht invasiven Endometriosezell-Linie zeigten, dass es eine mRNA gibt, die nur in der invasiven Endometriose zu finden ist, nicht aber in invasiven oder nicht invasiven Tumorzellen. In eutopem Endometrium konnte man niedrigere Mengen der entsprechenden mRNA nachweisen. Diese entsprechende mRNA ist ca. 4000 Kilobasen lang und nicht weiter spezifiziert. Die Invasivität von Endometriose teilt demnach nicht nur Aspekte der Tumormetastasierung, sondern hat auch eigene Mechanismen der Ausbreitung (Starzinski-Powitz et al., 1998). Diese Ergebnisse wiederum sprechen für die Theorie, dass Endometrium von Endometriosepatientinnen verändert ist gegenüber dem Endometrium von Frauen ohne Endometriose.

Endometriose hat wie maligne Zellen die Eigenschaft, apoptoseresistent zu sein. Endometriosezellen exprimieren Fas-Ligand und geben ihn in die Peritonealflüssigkeit ab. Dieser bindet an Fas-Antigen exprimierende Killerzellen und führt so zu ihrer Apoptose (Eidukaite et al., 2006). In Pankreaskarzinomen ist eine L1-Überexpression mit Apoptoseprotektion gegenüber Chemotherapeutika assoziiert (Sebens Mürköster et al., 2007). Zellen von Ovarialkarzinomen setzen mehr L1 frei, wenn apoptotische Bedingungen herrschen. Unter apoptotischen Bedingungen sind multiple Metalloproteinasen aktiviert, im Vergleich zu nicht apoptotischen Bedingungen. L1 ist dann in größerer Menge in Serum und Aszites der Patientinnen

zu finden. Freies L1 ist ein potenter Induktor von Zellmigration und extrazellulären Signalkaskaden (Gutwein et al., 2005). Zudem dient L1 in Ovarialkarzinomen einem gewissen Apoptoseschutz. L1-transfizierte Zellen und L1-exprimierende Ovarialkarzinomzellen wurden verschiedenen Apoptosestimuli ausgesetzt. L1-exprimierende Zellen waren deutlich apoptoseresistenter als Zellen ohne L1. Lösliches L1 verhinderte nur teilweise die Apoptose der entsprechenden Zellen. L1-Unterdrückung in Ovarialkarzinomzellen bewirkte eine Sensibilisierung für Apoptose (Stoek et al., 2007). Analog zum Ovarialkarzinom dient L1 evtl. auch in Endometriose dem Apoptoseschutz.

Der Vergleich von Endometrium von Endometriosepatientinnen und Kontrollpatientinnen ergab in dieser Arbeit keinen signifikanten Unterschied der L1-Expression. Auch in der Verteilung zwischen Epithel und Stroma innerhalb des Endometriums konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Endometrium von Endometriosepatientinnen und von Kontrollpatientinnen unterscheidet sich molekularbiologisch. Östrogenregulierte Gene sind in Endometrium von Endometriosepatientinnen und in Endometrioseläsionen hochreguliert. Eines davon ist das Cyr61-Gen. Es kodiert für ein Protein, welches wie L1 mit Adhäsion, Migration und Neovaskularisation in Zusammenhang gebracht wird (Absenger et al., 2004). Kao et al. zeigen, dass mehrere Gene in Endometrium von Endometriosepatientinnen dysreguliert sind. Während der Implantationsphase sind einige Gene up-, andere downreguliert. Von 12686 untersuchten Genen waren 91 Gene signifikant mehr als zweifach erhöht, 112 Gene waren mehr als zweifach erniedrigt. Einige Gene wurden randomisiert ausgesucht und deren Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR und/oder Northern-blot validiert. Es bestätigten sich eine Hochregulation von Collagen alpha2 Typ I (2,6fach) und bile salt export pump (2fach). Es bestätigten sich auch eine Down-Regulation von N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase (1,7fach), Glycodelin (51,5fach), Integrin alpha2 (1,8fach) und B61 (4,5fach) (Kao et al., 2003). In Endometrium von Endometriosepatientinnen ist im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine verminderte Differenzierungsfähigkeit festgestellt worden (Klemm et al., 2006). Eine andere Studie beschreibt einen Unterschied von Apoptoseproteinen in Endometrium von Endometriosepatientinnen (Bourlev et al., 2006). Sowohl eutope als auch ektope Endometriumzellen von Endometriosepatientinnen exprimieren vermindert die proapoptotischen Gene p53 und Caspase-1. Im Vergleich dazu konnte in normalem Endometrium von gesunden Probandinnen eine erhöhte Expression des antiapoptotischen DAD-1-Genes

nachgewiesen werden (Braun et al., 2006). Die proteolytische Aktivität in Endometrium von Endometriosepatientinnen ist erhöht (Colette et al., 2004). Es gibt auch Studien, die in einigen Aspekten keinen Unterschied zwischen eutopem Endometrium bei Endometriosepatientinnen und Kontrollpatientinnen erkennen lassen. So ist kein Unterschied in der Integrinexpression und dem Rezeptorstatus für Östrogen und Progesteron festzustellen (Gaetje et al., 2006, Jones et al., 1995). Im Gegensatz zu der von Gaetje et al. beschriebenen Integrinidentität in Endometrium von Patientinnen und Kontrollen zeigen Hii et al., dass das Integrin Alpha(v)beta3 in Endometriumgefäßen von Endometriosepatientinnen erhöht ist (Hii und Rogers, 1998). In Endometriumepithel von Endometriosepatientinnen ist Alpha(v)beta3 dagegen erniedrigt (Khorram und Lessey, 2002). Alpha(v)beta3 ist relevant, weil es bei Tumorzellen und T-Lymphozyten ein Bindungspartner von L1 sein kann (Duczmal et al., 1997). Endometrium von Endometriosepatientinnen weist also multiple Unterschiede zu Endometrium von gesunden Kontrollen auf. Man konnte noch nicht alle Ursachen und Folgen dieser Veränderungen in Endometriose von Endometriosepatientinnen verstehen. Ein Faktor, der auf jeden Fall mit berücksichtigt werden sollte, ist das veränderte endokrine Milieu durch Endometriose (Koninckx et al., 1999). Nicht nur verändertes Endometrium könnte Endometriose bedingen, es könnte auch ein Einfluss von Endometriose auf das eutopie Endometrium ausgeübt werden.

In der vorliegenden Arbeit ist L1 in Endometriose und Endometrium nachgewiesen worden. In Endometriose ist immunhistochemisch mehr L1 in Epithel nachzuweisen als in Stroma. In der quantitativen RT-PCR ist in Endometriose tendenziell mehr L1 in Epithel, während in Endometrium tendenziell mehr L1 in Stroma vorkommt. Die Tendenzen der L1- Verteilung sind in Endometrioseherden und Endometrium also gegensätzlich. Da diese PCR-Ergebnisse bei $P=0,05$ nicht signifikant sind, könnte man auch davon ausgehen, dass kein Unterscheid der L1- Verteilung besteht. Dies steht allerdings im Gegensatz zu den immunhistochemischen Ergebnissen, wobei in Endometrioseepithel deutlich mehr L1 zu erkennen war als in Endometriosestroma. In Zellkulturen von Endometrium von Endometriosepatientinnen ist die L1-Konzentration wiederum höher in Epithel als in Stroma (Finas et al., 2006, Hornung et al., 2005). Verglichen mit den oben genannten Studien gibt es in dieser Arbeit einen Unterschied in der Vorgehensweise. Er besteht vor allem in dem direkten Schneiden und Färben der Proben, um dann mit Hilfe der Mikrodisektion Probematerial für die RNA-Isolierung zu gewinnen. Dies soll verhindern, dass

eventuelle Einflüsse während der Zellkultur das Ergebnis verfälschen. Das Problem der Mikrodissektion wiederum ist, dass die gewonnene Probenmenge immer sehr gering ist. Daher sind die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR im Unterschied zwischen Epithel und Stroma von Endometriumproben fraglich. Die Stichprobe (n=4) ist klein. Der hohe Zeitaufwand durch die Mikrodissektion hat es unmöglich gemacht, mehr Proben zu untersuchen. Die angewandte quantitative RT-PCR ist die Methode der Wahl, um niedrig exprimierte Gene zu bestimmen. Gut quantifizieren lassen sich jedoch nur mittel bis hoch exprimierte Gene (Yin et al., 2001). Die in dieser Arbeit verwendete real time RT-PCR ist die sensitivste Methode, um die Genexpression zu quantifizieren (Liu und Saint, 2002). In diesem Fall ist die Quantifizierung problematisch, da die aus der Mikrodissektion gewonnenen Probenmengen sehr gering sind. Hinzu kommt, dass in allen durchgeführten Versuchen mit Endometriose und Endometrium L1 im Vergleich zu dem Housekeeping Gen HPRT niedriger exprimiert wurde.

Eventuell ist L1 sogar Ursache für Endometriose, oder zumindest an deren Entstehung beteiligt. Eine der gängigsten Theorien zur Endometrioseentstehung ist die Implantationstheorie von Sampson (Sampson, 1927). Sie besagt, dass Gebärmutter Schleimhaut an anderer Stelle anwächst. Die Schleimhaut wird entweder durch retrograde Menstruation, hämatogene und lymphogene Metastasierung oder durch Eindringen der Schleimhaut in die Uterusmuskulatur verschleppt. L1 als Migrations- und Adhäsionsmolekül könnte zur Auswanderung von Endometriumzellen führen. Diese könnten sich z.B. an das Peritoneum haften und dort einen Endometrioseherd bilden. Bei Frauen mit hoher L1-Expression in ihrem Endometrium könnte die Wahrscheinlichkeit, Endometriose zu haben oder zu bekommen höher sein als bei Frauen mit niedriger L1 Expression. Diese Hypothese ist durch die Ergebnisse dieser Arbeit nur teilweise zu untermauern, da nur tendenziell mehr L1 bei Endometriosepatientinnen nachzuweisen ist als bei Kontrollen. Auch in anderen Arbeiten wurde mehr L1 in Endometrium von Endometriosepatientinnen festgestellt als bei gesunden Kontrollen (Finas et al., 2006, Hornung et al., 2005). Diese Theorie könnte auch die hohe Rezidivrate erklären, denn L1 in Endometrium könnte den Zellen ermöglichen, wieder auszuwandern und neue Endometrioseherde zu bilden. Auch die Adhäsionsfunktion von L1 ist wesentlich, denn ausgewanderte Zellen müssen an das Peritoneum anhaften, um sich dort zu implantieren.

L1 ist ein in der Nervenentwicklung und in der Gehirnentwicklung essentielles Protein

(Fransen et al., 1997, Wong et al., 1995). L1 ist in die Nervenregeneration involviert (Dezawa und Nagano, 1996). Es kommt vor allem in Nerven und Schwanzzellen vor (Thelen et al., 2002). Dort ist es an Kontakten zwischen Schwanzzellen und Axonen sowie zwischen Schwanzzellen untereinander zu finden (Carenini et al., 1998). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass bei fehlendem L1 unmyelinisierte Nerven und von nur einer Myelinscheide umhüllte Nerven entstehen (Itoh et al., 2005). In vitro bewirkt fehlendes L1 eine Stagnation von Nervenwachstum (Dahme et al., 1997). In peritonealen Endometrioseläsionen sind signifikant mehr Nervenfasern und Nervenendigungen nachgewiesen worden als in normalem Peritoneum (Tokushige et al., 2006). Endometriosepatientinnen leiden unter anderem unter starken Schmerzen des Unterbauches, Dysmenorrhoe und Dyspareunie. Diese könnten durch vermehrte Nerveneinsprossung in das umgebende Gewebe bedingt sein. L1 könnte Nervenaussprossung in Endometriose und in dem umgebenden Gewebe verursachen. Möglicherweise ist dies durch das Abspalten von löslichem L1 mittels der Metalloproteinase ADAM10 der Fall. Lösliches L1 ist auch in Serum und Aszites von Patienten mit Uterus- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen worden. Hier ist lösliches L1 ein Faktor für eine schlechte Prognose (Fogel et al., 2003). Bei tief infiltrierender Endometriose beklagen die Patientinnen besonders starke Schmerzen. Hier sind nicht nur vermehrt Nerven, sondern auch mehr aktivierte Mastzellen nachgewiesen worden. Sie können durch ihre Mediatoren zur Schmerzwahrnehmung beitragen (Anaf et al., 2006). Nach Hysterektomie von Patientinnen mit und ohne Endometriose wurden deren Uteri auf Nerven untersucht. Die Uteri der Endometriosepatientinnen wiesen eine höhere Nervendichte auf als die von Frauen ohne Endometriose (Atwal et al., 2005). Tokushige et al. bestätigen diese Aussage. In ihrer Studie wurden in allen untersuchten Uteri von Endometriosepatientinnen vermehrt Nerven nachgewiesen. Bei keiner der Kontrollpatientinnen fanden sich entsprechende Nervenfasern (Tokushige et al., 2006). In einer aktuellen Studie von Mechsner et al. wurden Endometrioseläsionen und nicht beteiligtes Peritoneum von Endometriosepatientinnen immunhistochemisch untersucht. In 74,5% erwies sich, dass schmerzleitende, Substanz-P positive Nerven direkt an und in Endometrioseläsionen lokalisiert sind. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Endometriose neurotrophe Eigenschaften besitzt (Mechsner et al., 2007). Inwieweit diese Eigenschaften durch das Adhäsionsmolekül L1 bedingt sind, bleibt herauszufinden. Es ist möglich, dass in dieser Arbeit in Endometriose nachgewiesenes L1 in Assoziation zur Schmerzwahrnehmung zu sehen. Im

Rattenmodell wurde gezeigt, dass periphere Nerverschädigung die L1-Verteilung in Dorsalganglien und im Rückenmark-Hinterhorn verändert. Nach peripherer Axotomie entsteht eine L1-Überexpression. Die dadurch entstehenden neuropathischen Schmerzen bewirken eine Allodynie und Hyperalgesie. Ein L1 Antikörper vermindert die L1-Überexpression nach Axotomie. Ein intrathekal injizierter L1-Antikörper bewirkt eine dosisabhängige Schmerzreduktion (Yamanaka et al., 2007). Daraus lässt sich erkennen, dass L1 in der Schmerzwahrnehmung generell eine wichtige Rolle spielt. Auch ein solcher Mechanismus könnte bei der Schmerzentstehung bei Endometriose eine Rolle spielen. Die Ergebnisse der oben angeführten Studien zeigen, dass L1 ein in der Entwicklung des Nervensystems essentielles Protein ist. Man kann vermuten, dass L1 für die Schmerzen bei Endometriose mitverantwortlich ist.

Die Therapie der Endometriose ist bisher nicht zufrieden stellend. Daher wird an neuen Endometriosetherapeutika geforscht. Der heutige Goldstandard ist eine chirurgische und medikamentöse Therapie (Ceyhan et al., 2006, Lu und Ory, 1995). Das in dieser Arbeit in Endometrium und Endometriose nachgewiesene L1 könnte als potenzieller Angriffspunkt für eine Endometriosetherapie dienen.

Als Therapeutikum beim Ovarialkarzinom ist ein L1-Antikörper in der Diskussion. Im Tierversuch bewirkt ein L1-Antikörper 40-61 % weniger Tumorzellwachstum und –ausbreitung sowie 19-75 % weniger Aszitesbildung. In vitro inhibieren L1-Antikörper das Wachstum verschiedener L1-exprimierender Zellen. Untersucht wurden Zellen des Kolonkarzinoms, des Ovarialkarzinoms, zwei unterschiedlicher Nierenkarzinome, zwei unterschiedlicher Neuroblastome und des Prostatakarzinoms. Es wurden drei verschiedene Antikörper untersucht. Sie zeigen durchaus unterschiedliche Effekte. Anti L1-mAb chCE7 inhibiert signifikant das Tumorzellwachstum aller hier untersuchten, L1-exprimierenden Tumorzellen. Der Antikörper L1-11A inhibiert bis auf eine Zelllinie des Nierenkarzinoms und des Neuroblastoms alle oben genannten Karzinomzellen in ihrem Wachstum. Die Therapie mit dem HEA 125 Antikörper bewirkte nur bei einer der Neuroblastomzelllinien eine Wachstumsinhibition. Als Vergleich dienten unbehandelte Kontrollzellen. Die Effekte der L1-Antikörper wurden bezüglich des Ovarialkarzinoms genauer untersucht. Nur der L1-11A-Antikörper bewirkt eine Inhibition der Migration von Ovarialkarzinomzellen. Um sicher zu gehen, dass dieser Effekt spezifisch an der L1-Inhibition liegt, wurde ein Vergleich mit L1-transfizierten Zellen durchgeführt. An Nacktmäusen wurden in vivo Versuche durchgeführt. L1 Antikörper chCE7 und L1-11A wurden in der höchsten

Konzentration im Tumor nachgewiesen. Mit drei verschiedenen Antikörperkonzentrationen wurde der Effekt von L1-11A auf die Tumormasse in Nacktmäusen untersucht. Die Kontrollgruppe wurde mit PBS oder IgG-Kontroll-Antikörpern behandelt. Die Studie endete damit, dass die Mäuse der Kontrollgruppe morbid waren, während die mit L1-11A behandelten Mäuse eine hohe Vitalität zeigten. Eine dosisabhängige Reduktion der Tumormasse wurde festgestellt. Die Tumorreduktion in der Gruppe mit der höchsten Antikörperkonzentration (10mg/kg) war signifikant. Durch L1-Antikörper wurde auch die Proliferation der Tumorzellen dosisabhängig unterdrückt und die Aszitesbildung deutlich verringert. Während der gesamten Therapie wurden keinerlei Nebenwirkungen oder toxische Schäden durch L1-Antikörper beobachtet. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Tumorzellmotilität tatsächlich durch die L1-Antikörper gehemmt wird und nicht durch andere Mechanismen (Arlt et al., 2006). Eine weitere Studie mit dem gleichen Aufbau zeigt, dass der Effekt von Anti-L1-Antikörper chCH7 eine bessere Wirkung aufweist, wenn er in Kombination mit Radioimmuntherapie gegeben wird. Radioaktives Kupfer wird dabei direkt an den L1- Antikörper gebunden (Knogler et al., 2007). In Melanomen wird L1 für die Melanomvergrößerung, Invasion und Metastasierung verantwortlich gemacht und ein L1-Antikörper ebenfalls als Therapieoption diskutiert. Migration und Invasion verringern sich unter L1-Suppression, sind jedoch nicht vollständig unterdrückbar (Meier et al., 2006). Auch gegen Endometriose könnte möglicherweise ein solcher L1-Antikörper wirksam sein. Die vermehrte L1-Expression in Endometrium von Endometriosepatientinnen spricht für die potenzielle Metastasierung dieser Zellen. Durch einen L1- Antikörper könnte diese ggfs. unterdrückt werden, indem weniger Endometrioseläsionen entstehen bzw. sich weniger Rezidive bilden würden. Auch die L1-Funktionen wie Adhäsion und ektopes Überleben könnten eventuell durch einen entsprechenden Antikörper vermindert werden. Sie sind möglicherweise auch mitverantwortlich für die Entstehung von Endometriose.

5. Zusammenfassung

Endometriose ist eine gutartige, progrediente Erkrankung mit hoher Prävalenz. Die Entstehung von malignen Tumoren, insbesondere von dem endometrioiden Ovarialkarzinom, wurde häufiger bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose beobachtet. Das Adhäsionsmolekül L1 kommt physiologisch in Nerven vor. Es ist aber auch in Ovarialkarzinomen und anderen malignen Tumoren überexprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Endometrium von Endometriosepatientinnen unterscheidet sich in vielerlei

Hinsicht von Endometrium von gesunden Frauen. In dieser Arbeit wurde L1 in Endometriose und Endometrium untersucht. Immunhistochemisch wurden Paraffinschnitte mit einem spezifischen monoklonalen anti-L1 Antikörper angefärbt. Weitere Gewebeproben wurden zu Gefrierschnitten verarbeitet, um dann der Mikrodissektion unterzogen zu werden. Dabei wurde Epithel und Stroma getrennt und nach RNA-Isolation mittels quantitativer der RT-PCR untersucht. In Endometrioseläsionen ist L1 immunhistochemisch vor allem im Epithel stark nachweisbar. In der quantitativen RT-PCR von gefrorenem Gewebe ist dieser Unterschied zwischen Epithel und Stroma nur tendenziell nachzuweisen. In Endometrium von Endometriosepatientinnen findet sich tendenziell mehr L1 als in Endometrium von Kontrollen ($p= 0,0695$). Ein eindeutiger Unterschied zwischen der L1-Expression in Epithel und Stroma konnte in Endometrium nicht nachgewiesen werden. Wir vermuten, dass das Adhäsionsmolekül L1 durch Adhäsion und Innervation mit der Endometrioseentstehung zusammenhängt. Es könnte ausserdem ein wesentlicher pathogenetischer Faktor bei dem Übergang von benignem zu malignem Gewebe sein.

Literaturverzeichnis:

Absenger Y, Hess-Stumpp H, Kreft B, Kratzschmar J, Haendler B, Schutze N, Regidor P A, & E, W. 2004. Cry61, a deregulated gene in endometriosis. *Mol Hum REprod*, 10(16): 399-407.

Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, & Hornung D. 2006. Is Endometriosis Associated with Systemic Subclinical Inflammation? *Gynecol Obstet Invest.*, 62 (63): 139-147.

Altevogt, P., & Fogel, M. 2004. The role of L1 in the progression of ovarian carcinomas. *Zentralbl. Gynakol*, 126 (125) 323-325.

Anaf V., Chapron, C., El Nakadi, I., Simonart, T., & Noel, J.C. 2006. Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.*, 86(85):1336-1343.

Arlt, M.J., Novak-Hofer, I., Gast, D., Gschwend, V., Moldenhauer, G., Grunberg, J., Honer, M., Schubiger, P.A., Altevogt, P., & Kruger, A. 2006. Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res*, 66 (62) 936-943.

Atwal, G., du Plessis, G., Armstrong, G., Slade, R., & Quinn, M. 2005. Uterine innervation after hysterectomy for chronic pelvic pain with and without endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 193(195):1650-1655.

Barbieri, R.L. 1990. Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am. J. Obset. Gynecol.*, 162(162):565-567.

Bearer, C.F. 2001. L1 adhesion molecule signal cascades: targets for ethanol developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 22(25):625-633.

Bourlev, V., Larsson, A., & Olavsson, M. 2006. Elevated levels of fibroblast growth factor-2 in serum from women with endometriosis. *American J Obset Gynecol.*, 194 (193): 755-759.

Braun, D.P., Ding, J., Shaheen, F., Willey, J.C., Rana, N., & Dmowski, W.P. 2006. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril.*, 87(82):263-268.

Braundmeier, A. G., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A., Guo, H., Toole, B. P., & Nowak, R. A. 2006. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

Regulates Metalloproteinases in Human Uterine Endometrium. *J Clin Endocrin Metab.*

Brinton, L.A., Gridley, G., Persson, I., Baron, J., & Bergqvist, A. 1997. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 176(173):572-579.

Burlev, V.A., Pavlovich, S.V., & Il'yasova, N.A. 2006. Apoptosis and proliferative activity in endometrium during peritoneal endometriosis. *Bull Exp Biol Med*, 141(142): 204-207.

Busacca, M., Chiaffarino, F., Caniani, M., Vignali, M., Bertulesi, C., Oggioni, G., & Parazzini, F. 2006. Determinants of long term clinically detected recurrence rates of deep, ovarian, and pelvic endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 195(192):426-432.

Carenini, S., Schachner, M., & Martini, R. 1998. Cytochalasin D disrupts the restricted localization of N-CAM, but not of L1, at sites of Schwann cell-neurite and Schwann cell-Schwann cell contact in culture. *J Neurocytol*, 27(26):453-458.

Ceyhan, T., Atav, V., Gungor, S., Karateke, A., Oral, A., & Baser, I. 2006. Efficacy of laparoscopically-assisted extracorporeal cystectomy in patients with ovarian endometrioma. *J Minim Invasive Gynecol.*, 13 (12): 145-149.

Chalas, E., Chumas, J., Barbieri, R., & Mann, W.J. 1991. Nucleolar organizer regions in endometriosis, atypical endometriosis, and clear cell and endometrioid carcinomas. *Gynecol Oncol*, 40(43): 260-263.

Colette, T., Bellehumeur, C., Kats, R., Maheux, R., Mailloux, R., Villeneuve, M., & Akoum, A. 2004. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod.*, 19(16): 1257-1264.

Dahme, M., Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M., & Mantei, N. 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system.

Nat Genet., 17(13):346-349.

Dale, I., & Brandtzaeg, P. 1989. Expression of the epithelial L1 antigen as an immunohistochemical marker of squamous cell carcinoma of the lung.

Histopathology, 14(15):493-502.

De Priest, P.D., Banks, E.R., Powell, D.E., van Nagell, J.R.J., Gallion, H.H., Puls, L.E., Hunter, J.E., Kryscio, R.J., & Royalty, M.B. 1992. Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women.

Gynecol Oncol, 47(41):71-75.

Deichmann, M., Kurzen, H., Egner, U., Altevogt, P., & Hartschuh, W. 2003.

Adhesion molecules CD171 (L1CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas). J Cutan Pathol, 30(36):363-368.

Demyanenko, G.P., Tsai, A.Y., & Maness, P.F. 1999. Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. J Neurosci., 19(12):4907-4920.

Dezawa, M., & Nagano, T. 1996. Immunohistochemical localization of cell adhesion molecules and cell-cell contact proteins during regeneration of the rat optic nerve induced by sciatic nerve autotransplantation. Anat Rec, 246(241):114-126.

Duczmal, A., Schöllhammer, S., Katich, S., Ebeling, O., Schwartz-Albiez, R., & Altevogt, P. 1997. The L1 adhesion molecule supports alpha v beta 3-mediated migration of human tumor cells and activated T lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun, 232 (231) 236-239.

Ebeling, O., A., D., Aigner, S., Geiger, C., Schöllhammer, S., Kemshead, J.T., Möller, P., Schwartz-Albiez, R., & Altevogt, P. 1996. L1 adhesion molecule on

human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha-v β 3 integrin. *Eur J Immunol*, 26 2508-2516.

Eidukaite, A., Siaurys, A., & Tamosiunas, V. 2006. Abberant expresion of CD95 and CD69 Molecules among CD56 Cells in Women with Endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, 55 (54) 276-281.

Evan-Rahm, S.C., Maoz, M., Prokroy, E., Katz, B., Gutwein, P., Altevogt, P., & Bar-Shavit, R. 2001. Tumor Cell Invasion Is Promoted by Activation of Protease Activated Receptor-1 in Cooperation with the alpha-v β 5 Integrin. *J Biol Chem*, 276 (214) 10952-10962.

Finas, D., Altevogt, P., Fogel, M., Noack, F., Xu, H., Diedrich, K., & Hornung, D. 2006. Expression of cell adhesion molecule L1 in endometriosis. *Hum Reprod.*, 144, O-113.

Finas, D., Huszar, M., Agic, A., Dogan, S., Kiefel, H., Riedle, S., Gast, D., Marcovich, R., Noack, F., Altevogt, P., Fogel, M., Hornung, D. 2008. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) as a pathogenetic factor in endometriosis. *Hum Reprod.*, Mar 10 (Epub ahead of print)

Fogel, M., Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, I., Ben-Arie, A., Huszar, M., & Altevogt, P. 2003. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet*, 362 (9387) 9869-9875.

Fogel, M., Huszar, M., Altevogt, P., & Ben-Arie, A. 2004. L1 (CD171) as a novel marker for ovarian and endometrial carcinomas. *Expert Rev Mol Diagn*, 4 (4) 455-462.

Fogel, M., Mechtersheimer, S., Huszar, M., Smirnov, A., Abu-Dhai, A., Tilgen, W., Reichrath, J., Georg, T., Altevogt, P., & Gutwein, P. 2003. L1 adhesion molecule (CD171) in development and progresion of human malignant melanoma. *Cancer Lett*, 189 (182) 237-247.

Fransen, E., Van Camp, G., Vits, L., & Willems, P.J. 1997. L-1 associated diseases: clinical genetics divide, molecular genetics unite. *Human Molecular Genetics*, 6(10):1625-1632.

Gaetje, R., Kotzian, S., Herrmann, G., Baumann, R., & Starzinski-Powitz, A. 1997. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol.*, 150(152):461-467.

Gaetje, R., Rody, A., Kissler, S., Kaufmann, M., & Ahr, A. 2006. Integrin expression in eutopic and ectopic endometrium. *Zentralbl. Gynäcol.*, 128(123):135-137.

Gast, D., Riedle, S., Schabath, H., Schlich, S., Schneider, A., Issa, Y., Stoeck, A., Fogel, M., Joumaa, S., Wenger, T., Herr, I., Gutwein, P., & Altevogt, P. 2005. L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer*, 151 (154) 658-665.

Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T., & Ben-Ze'ev, A. 2005. L1, a novel target of β -catenin signalling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol*, 168(164):633-642.

Guo, S.W., & Wang, Y. 2006. The prevalence of endometriosis in women with chronic pelvic pain. *Gynecol Obstet Invest.*, 62(63):121-130.

Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M., & Altevogt, P. 2002. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB Journal*, 17(12):292-294.

Gutwein, P., Stoeck, A., Riedle, S., Gast, D., Runz, S., Condon, T.P., Marme, A., Phong, M.C., Linderkamp, O., Skorokhod, A., & Altevogt, P. 2005. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 11(17) 2492-2501.

Hii, L.L., & Rogers, P.A. 1998. Endometrial vascular and glandular expression of

integrin alpha(v)beta3 in women with and without endometriosis. *Hum Reprod.*, 13(14):1030-1035.

Hirabayashi, K., Yasuda, M., Osamura, R.Y., Hirasawa, T., & Murakami, M. 2006. Ovarian nongestational choriocarcinoma mixed with various epithelial malignancies in association with endometriosis. *Gynecol Oncol*, 202(201):111-117.

Hornung, D., Xu, H., Altevogt, P., Fogel, M., Noack, F., Diedrich, K., & Finas, D. 2005. From Retrograde Menstruation to Endometriosis- A Possible Pathophysiological Role of L1, a Cell Adhesion and Migration Protein. *Zentralbl. Gynakol*, 127 (110.1055) 1920-1972.

Hucke, J., & Distler, W. 1989. Clinical manifestation and classification of endometriosis. *Gynacologe*, 22(25):289-293.

Huszar, M., Moldenhauer, G., Gschwend, V., Ben-Arie, A., Altevogt, P., & Fogel, M. 2006. Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and target therapy. *Hum Pathol*, 37(38):1000-1008.

Itoh, K., Fushiki, S., Kamiguchi, H., Arnold, B., Altevogt, P., & Lemmon, V. 2005. Disrupted Schwann cell-axon interactions in peripheral nerves of mice with altered L1-integrin interactions. *Mol Cell Neurosci*, 30 (34) 624- 629.

Jimbo, H., Yoshikawa, H., Onda, T., Yasugi, T., Sakamoto, A., & Taketani, Y. 1997. Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 59(53):245-250.

Jones, R.K., Bulmer, J.N., & Searle, R.F. 1995. Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. *Hum Reprod.*, 10(12):3272-3279.

Kadmon, G., Montgomery, A.M., & Altevogt, P. 1998. L1 makes immunological progress by expanding its relations. *Dev Immunol*, 6 (3-4) 205-213.

Kao, L.C., Germeyer, A., Tulac, S., Lobo, S., Yang, J.P., Taylor, R.N., Osteen, K., Lessey, B.A., & Guidice, L.C. 2003. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology*, 144(147): 2870-2881.

Khorram, O., & Lessey, B.A. 2002. Alterations in expression of endometrial endothelial nitric oxide synthase and alpha(v)beta(3) integrin in women with endometriosis. *Fertil Steril.*, 78(74): 860-864.

Kikuchi, I., Takeuchi, H., Kitade, M., Shimanuki, H., Kumakiri, J., & Kinoshita, K. 2006. Recurrence rate of endometriomas following a laparoscopic cystectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 85(89):1120-1124.

Klemt, P., Carver, J., Kennedy, S., Koninckx, P., & Mardon, H. 2006. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril.*, 85 (83): 564-572.

Knogler, K., Grünberg, J., Zimmermann, K., Cohrs, S., Honer, M., Ametamey, S., Altevogt, P., Fogel, M., Schubiger, P.A., & Novak-Hofer, I. 2007. Copper-67 radioimmunotherapy and growth inhibition by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibodies in a therapy model of ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 13(12):603-611.

Koninckx, P.R., Kennedy, S., & Barlow, D.H. 1999. Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid. *Gynecol Obstet Invest.*, 47(41): 23-33.

Liu, W., & Saint, D.A. 2002. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(292):347-353.

Lu, P.J., & Ory, S.J. 1995. Endometriosis: current management. *Mayo Clin Proc*, 70(75):453-463.

Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D.,

Altevogt, P., Saftig, P., & Reiss, K. 2005. L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteinases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol*, 25 (20) 9040- 9053.

Mathur, S., Peress, M.R., Williamson, H.O., Youmans, C.D., Maney, S.A., Garvin, A.J., Rust, P.F., & Fudenberg, H.H. 1982. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol*, 50(52): 259-266.

Matthias, J.E., Arlt, M.J., Novak-Hofer, I., Gast, D., Gschwend, V., Moldenhauer, G., Grünberg, J., Honer, M., Schubiger, P.A., Altevogt, P., & Krüger, A. 2006. Efficient Inhibition of Intra-Peritoneal Tumor Growth and Dissemination of Human Ovarian Carcinoma Cells in Nude Mice by Anti-L1-Cell Adhesion Molecule Monoclonal Antibody Treatment. *Cancer Res*, (66):936-943.

Mechsner, S., Bartley, J., Halis, G., Lange, J., Loddenkemper, C., & Ebert, A.D. 2002. Endometrial carcinoma using GnRH analogues therapy in endometriosis. *Zentralbl. Gynäcol.*, 124(110):478-481.

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

Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V., & Altevogt, P. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.*, 155 (154): 661-674.

Meier, F., Busch, S., Gast, D., A., G., Altevogt, P., Maczey, E., Riedle, S., Garbe, C., & Schitteck, B. 2006. The adhesion molecule L1 (CD171) promote melanoma progression. *Int J Cancer*.

Missmer, S.A., Hankinson, S.E., Spiegelmann, D., Barbieri, R.L., Marshall, L.M., & Hunter, D.J. 2004. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol*, 160(168):

784-769.

Mounsey, A.L., Wilgus, A., & Slaeson, D.C. 2006. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Physician*, 74(74):594-600.

Ness, R.B., & Modugno, F. 2006. Endometriosis is a model for inflammation-hormone interactions in ovarian and breast cancer. *Eur J Cancer*, 42(46):691-703.

Oleszewski, M., Beer, S., Katich, S., Geiger, C., Zeller, Y., Rauch, U., & Altevogt, P. 1999. Integrin and Neurocan Binding to L1 Involves distinct Ig Domains. *J Biol Chem*, 274 (235) 24602-24610.

Prowse, A.H., Manek, S., Varma, R., Liu, J., Godwin, A., Maher, E., & Tomlinson, I. 2006. Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer. *Int J Cancer*, 119(113): 556-562.

Razzouk, K., Roman, H., Chanavaz-Lacheray, I., Scotte, M., Verspyck, E., & Marpeau, L. 2006. Mixed clear Cell and Endometrioid Carcinoma Arising in Parietal Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.*, 63(63): 140-142.

Rier, S.E., Parsons, A.K., & Becker, J.L. 1994. Endometriosis in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21: 433-441.

Saltiel, E., & Garabedian-Ruffalo, S.M. 1991. Pharmacologic management of endometriosis. *Clin Pharm*, 10(17): 518-531.

Sampson, J.A. 1927. Peritoneal Endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 14: 422-469.

Schindler, A.E., Christensen, B., Henkel, A., Oettel, M., & Moore, C. 2006. High dose pilot study with the novel progestogen dienogest in patients with endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, 22 (21) 29-17.

Sebens Mürköster, S., Werbing, V., Sipos, B., Debus, M.A., Witt, M., Grossmann, M., Leisner, D., Kötteritzsch, J., Kappes, H., Klöppel, G., Altevogt, P., Fölsch, U.R., & Schäfer, H. 2007. Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 261(219):2759-2768.

Sharpe-Timms, K.L., Ricke, E.A., Piva, M., & Horowitz, G.M. 2000. Differential expression and localization of de-novo synthesized endometriotic haptoglobin in endometrium and endometriotic lesions. *Hum Reprod.*, 15(10):2180-2185.

Shi, Y., Luo, X., Zhu, X., Hua, K., Zhu, Y., & Li, D. 2006. Effects of combined 17 β -estradiol with TCDD on secretion of chemokine IL-8 expression of its receptor CXCR1 in endometriotic focus-associated cells in co-culture. *Hum Reprod.*

Somigliana, E., Vigano, P., Parazzini, F., Stoppelli, S., Giambattista, E., & Vercellini, P. 2006. Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol Oncol*, 101(102):331-341.

Starzinski-Powitz, A., Gaetje, R., Zeitvogel, A., Kotzian, S., Handrow-Metzmacher, H., Herrmann, G., Fanning, E., & Baumann, R. 1998. Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. 4(5): 724-729.

Starzinski-Powitz, A., Handrow-Metzmacher, H., & Kotzian, S. 1999. The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis? *Mol Med Today*, 5(7):304-309.

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

Stoeck, A., Gast, D., Sanderson, M.P., Issa, Y., Gutwein, P., & Altevogt, P. 2007. L1-CAM in a membrane bound or soluble form augments protection from apoptosis

in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol.*, 104(102):461-469.

Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E., & Altevogt, P. 2006. A role of exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J*, 393(393) 609-618.

Stoeck, A., Schlich, S., Issa, Y., Gschwend, V., Wenger, T., Herr, I., Marme, A., Bourbie, S., Altevogt, P., & Gutwein, P. 2005. L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett.*

Thelen, K., Kedar, V., Panicker, A.K., Schmid, R.-S., Midkiff, B.R., & Maness, P.F. 2002. The Neural Cell Adhesion Molecule L1 Potentiates Integrin-Dependant Cell Migration to Extracellular Matrix Proteins. *The Journal of Neuroscience*, 22(12):4918-4931.

Tokushige, N., Markham, R., Russell, P., & Fraser, I.S. 2006a. Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod.*, 21(11): 3001-3007.

Tokushige, N., Markham, R., Russell, P., & Fraser, I.S. 2006b. High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum Reprod.*, 21(23): 782-787.

Ulrich, U., Richter, O., Wardelmann, E., Valter, M., Schmutzler, R., Sillem, M., Possover, M., & Mallmann, P. 2003. Endometriosis and malignoma. *Zentralbl. Gynäcol.*, 125(127-128):239-242.

Uyemura, K., Takeda, Y., Asou, H., & Hayasaka, K. 1994. Neural cell adhesion proteins and neurological diseases. *J Biochem(Tokyo)*, 116(116):1187-1192.

Uzan, C., Cortez, A., Dufournet, C., Fauvet, R., Siffroi, J.P., & Darai, E. 2005. Endometrium from women with and without endometriosis, and peritoneal, ovarian and bowel endometriosis, show different c-kit protein expression. *J Reprod Immunol*, 65(61): 55-63.

Vercellini, P., Fedele, L., Aimi, G., Pietropaolo, G., Consonni, D., & Crosignani,

P.G. 2007. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Hum Reprod.*, 22(21):266-271.

Wong, E.V., Kenrick, S., Willems, P., & Lemmon, V. 1995. Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *Trends Neurosci.*, 18(14):168-172.

Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., & Noguchi, K. 2007. Alteration of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Eur J Neurosci*, 25(24):1097-1111.

Yin, J.L., Shackel, N.A., Zekry, A., Mc Guinness, P.H., Richards, C., Putten, K.V., Mc Caughan, G.W., Eris, J.M., & Bishop, G.A. 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green 1. *Immunol Cell Biol.*, 79(73):213-221.

Yu, C.Q., Shi, S.F., Liu, Y.H., Wang, R.X., Song, Y.H., & Ju, J. 2006. Primary culture and morphologic observation of eutopic and ectopic endometrial cells from patients with endometriosis. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 4 (2) 289- 193.

Zeitvogel, A., Baumann, R., & Starzinski-Powitz, A. 2001. Identification of an invasive, N-Cadherin-Expression Epithelial Cell Type in Endometriosis Using a New Cell Culture Model. *Am J Pathology*, 159:1839-1852.

Zhang, C., Marme, A., Wenger, T., Gutwein, P., Edler, I., Rittgen, W., Debetin, K.M., Altevogt, P., Mattern, J., & Herr, I. 2006. Glucocorticoid-mediated inhibition of chemotherapy in ovarian carcinomas. *Int J Oncol*, 28 (22) 551-558.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AFS	American Fertility Society
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CRASH	corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia, and hydrocephalus
Cu	Kupfer
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
EtOH	Ethanol
Eo	Endometriose
et al.	Et alii (und Mitarbeiter)
Fig.	Figure
g	Gramm
I	Iod
kDa	Kilo Dalton
I.E.	Internationale Einheit

IgG	Immunglobulin G
K	Kontrolle (Kontrollpatientin)
kg	Kilogramm
l	Liter
mAb	monoclonal Antibody
max.	maximal
MBG	Metaiodobenzylguanidine
MBq	Mega Becquerel
µg	Mikrogramm
µm ²	Quadratmikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NF	nuclear factor
nm	Nanometer
No.	Nummer
OP	Operation
PET	Positronen Emissions Tomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
rAFS	revised American Fertility Society
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
sek	Sekunde
Tab.	Tabelle
U	Umdrehung
u. A.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. D. Hornung für ihre gute Betreuung mit ihren Antworten auf meine vielen Fragen und ihrer ständigen Hilfsbereitschaft. Dankeschön auch an PD Dr. D. Finas für seine Unterstützung zu Beginn der Doktorarbeit.

Alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Hornung haben mich immer wieder sehr motiviert, weiter zu arbeiten. In ratlosen Situationen waren immer Diskussionspartner mit guten Vorschlägen da und alle Beteiligten halfen mir nach besten Kräften weiter zu kommen. Vielen Dank vor allem an Dr. Söngül Dogan, Dr. Schima Djalali, Dr. Admir Agic, Constanze Siggel und Gabi Marschner.

Den technischen Mitarbeiterinnen der Pathologie der Universität zu Lübeck danke ich dafür, dass ich jederzeit ihr Mikrotom benutzen durfte.

In der Anatomie danke ich allen Beteiligten an der Mikrodissektion. Danke an alle, die bei aufkommenden Fragen zugegen waren und helfen konnten. Vielen Dank auch, dass ich einiges Material der Anatomie mitbenutzen durfte.

Vielen Dank natürlich an meine Familie und alle Freunde, die sich immer wieder nach dem Voranschreiten der Arbeit erkundigten und mich ermunterten, genau das richtige Pensum an Arbeit zu schaffen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Deborah Esther Michaela Zeeden

Geburtsdatum: 09. Februar 1983

Geburtsort: Dinslaken

Eltern: Heinrich und Ina Zeeden

Geschwister: Christian und Tobias Zeeden

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung

1989-1991 Grundschule Wrist

1991-1993 Grundschule Ortenberg

1993-1999 Wolfgang Ernst Gymnasium Büdingen

1999-2000 ein Austauschschüler-Jahr in Pune, Indien

2000-2002 Wolfgang Ernst Gymnasium Büdingen

Studium

Seit WS 2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Mainz

06.09.2004 Ärztliche Vorprüfung

Seit WS 2004 Studium der Humanmedizin im klinischen Abschnitt an der
Universität zu Lübeck

10/2008 Staatsexamen