

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

Dissertation

Expressionsmuster von Kandidatengenenen bei Sterilitätspatientinnen

**Quantitativer Expressionsvergleich der Gene FOXO 3a, STAT 3 und PIAS X
im Ovar bei Endometriose und vorzeitiger ovarieller Insuffizienz (POF)**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck**

**von
Christiane Mohr
aus Merseburg**

Lübeck 2006

- 1. Berichtstatter / Berichtstatterin: Prof. Dr. med. Klaus Diedrich**
- 2. Berichtstatter / Berichtstatterin: Prof. Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach**

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2007

**Zum Druck genehmigt.
Lübeck, den 16.05.2007**

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
-Dekan der Medizinischen Fakultät-**

I.	Inhaltsübersicht	
I.	Inhaltsübersicht.....	3
II.	Inhaltsverzeichnis	7
III.	Abkürzungsverzeichnis	13
IV.	Tabellenverzeichnis	21
V.	Abbildungsverzeichnis	23
VI.	Erster Teil: Einführung in die Fragestellung	25
	A. Einleitung.....	25
	B. Betrachtete Krankheiten	32
	C. Vorstellung der Kandidatengene.....	57
VII.	Zweiter Teil: Materialien und Methoden.....	71
	A. Grundlegendes	71
	B. RNA Extraktion	74
	C. cDNA Synthese.....	76
	D. Qualitative konservative PCR.....	78
	E. Gelelektrophorese	81
	F. Aufreinigung der Zielprodukte und Sequenzierung.....	82
	G. Quantitative Real-Time PCR.....	84

VIII. Dritter Teil: Auswertung und Ergebnisse.....	93
A. RNA Extraktion	93
B. cDNA Synthese und konservative PCR.....	94
C. Sequenzierungsergebnisse	96
D. Standardkontrollen	97
E. Real - Time PCR.....	100
IX. Vierter Teil: Diskussion.....	115
A. Differentielle Expression von FOXO 3a	117
B. Differentielle Expression von STAT 3.....	118
C. Differentielle Expression von PIAS X.....	119
D. Ausblick für weitere Forschungsziele.....	120
X. Fünfter Teil: Zusammenfassung.....	123
XI. Literaturverzeichnis.....	127
A. Literaturstellen aus Büchern	127
B. Zeitschriftenartikel	129
C. Internetseiten	145
D. Leitlinien und Gesetze	145
XII. Anhänge.....	147
A. Photometrische Konzentrationsbestimmung RNA	147

B. Rohdaten Real-Time PCR (Housekeeping-Gene)	148
C. Rohdaten Real-Time PCR (Kandidatengene)	151
D. Internetrecherche.....	154
E. Primersequenzen.....	155
F. Danksagung.....	157
G. Lebenslauf.....	159

II. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsübersicht.....	1
II. Inhaltsverzeichnis	7
III. Abkürzungsverzeichnis	13
IV. Tabellenverzeichnis	21
V. Abbildungsverzeichnis	23
VI. Erster Teil: Einführung in die Fragestellung	25
A. Einleitung.....	25
B. Betrachtete Krankheiten	32
1. Premature ovarian failure (POF)	32
a) Definition, Prävalenz und Symptomatik	32
b) Ätiologie.....	34
c) Therapie.....	39
2. Endometriose.....	41
a) Definition, Prävalenz, Symptomatik und Klassifikation	41
b) Ätiologie und Modelle der Pathophysiologie.....	43
c) Sterilität und Infertilität bei Endometriose	52
d) Therapie.....	54

C.	Vorstellung der Kandidatengene.....	57
1.	FOXO 3a	57
2.	STAT 3	61
3.	PIAS X.....	67
VII.	Zweiter Teil: Materialien und Methoden.....	71
A.	Grundlegendes	71
1.	Überlegung zur Vorgehensweise.....	71
2.	Allgemein benötigte Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien	72
B.	RNA Extraktion	74
1.	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien.....	74
2.	Methodik	75
C.	cDNA Synthese.....	76
1.	Geräte, Reagenzien.....	76
2.	Methodik	76
D.	Qualitative konservative PCR.....	78
1.	Geräte, Reagenzien.....	78
2.	Methodik	78
E.	Gelelektrophorese	81
1.	Geräte, Reagenzien.....	81

2. Methodik	81
F. Aufreinigung der Zielprodukte und Sequenzierung.....	82
1. Aufreinigungsmethode aus dem PCR Ansatz	82
2. Sequenzierung	83
G. Quantitative Real-Time PCR.....	84
1. Aufreinigung und Herstellung eines Standards	84
a) Geräte, Reagenzien.....	84
b) Aufreinigung aus dem Gel.....	84
c) Berechnung des Standards	85
d) Herstellung des Standards	86
2. Quantitatives Real-Time Verfahren.....	88
a) Geräte, Verbrauchsmaterial, Reagenz	88
b) PCR Ansatz und Protokoll.....	88
c) Quantifizierungsverfahren	90
3. Schmelzkurvenanalyse	90
VIII. Dritter Teil: Auswertung und Ergebnisse.....	93
A. RNA Extraktion	93
B. cDNA Synthese und konservative PCR.....	94
1. Kontrolle der cDNA Synthese.....	94
2. Nachweis der Kandidatengene	94

C.	Sequenzierungsergebnisse	96
D.	Standardkontrollen	97
1.	Aufreinigung	97
2.	Real-Time Kontrolle	98
E.	Real - Time PCR.....	100
1.	Voraussetzungen und Überlegungen zur Auswertung	100
2.	Angewandte Methoden	104
a)	Absolute Auswertung.....	105
b)	Relative Auswertung	106
3.	Ergebnisse	108
a)	Ergebnisse der absoluten Auswertung	108
b)	Ergebnisse der relativen Auswertung.....	110
c)	Zusammenfassung der Expressionsergebnisse	112
4.	Statistische Kontrolle der Ergebnisse	112
IX.	Vierter Teil: Diskussion.....	115
A.	Differentielle Expression von FOXO 3a	117
B.	Differentielle Expression von STAT 3.....	118
C.	Differentielle Expression von PIAS X.....	119
D.	Ausblick für weitere Forschungsziele.....	120
X.	Fünfter Teil: Zusammenfassung.....	123

XI. Literaturverzeichnis.....	127
A. Literaturstellen aus Büchern	127
B. Zeitschriftenartikel	129
C. Internetseiten	145
D. Leitlinien und Gesetze	145
XII. Anhänge.....	147
A. Photometrische Konzentrationsbestimmung RNA	147
B. Rohdaten Real-Time PCR (Housekeeping-Gene)	148
C. Rohdaten Real-Time PCR (Kandidatengene)	151
D. Internetrecherche.....	154
E. Primersequenzen.....	155
F. Danksagung	157
G. Lebenslauf	159

III. Abkürzungsverzeichnis

A	A	Adenin
	A.	Auswertung
	Abb.	Abbildung
	AG	Aktiengesellschaft
	AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
	Ak	Antikörper
	Ang	Angiopoietin
	AP1	Adaptor Related Protein 1
	ARIP	Androgen Receptor-Interacting Protein
	AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
B	Bcl-2/BAX	Oncogene B-Cell Leukemia 2/ Bcl-2 associated X Protein
	bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
	bp	Basenpaar
	β-ME	2-Mercaptoethanol
	BMX	Bone Marrow Kinase, X-linked
	BRCA 1	Breast Cancer 1 gene
	BRD	Bundesrepublik Deutschland
	bzw.	beziehungsweise
C	°C	Grad Celsius (Temperaturangabe)
	c	centi (10⁻²)
	C	Cytosin
	ca.	circa

Ca	Carcinom
CBP/p300	CREB-Binding Protein/Histonacetylase
cDNA	komplementäre DNA
c-fos	Serum Response Element-binding Factor
CIS	Cytokine Inducible SH2-containing Protein
c-jun	Mitogen-Activated Protein Kinase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
COUP-TF	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter- Transcription Factor
COX-2	Cyclooxygenase-2
CP	Crossing point
CREB	Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding Protein
CSF-1	Colony Stimulating Factor-1
C (t)	Cycle of Treshold
D	
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dy/dx	1. Differentialquotient der Funktion $y=f(x)$
E	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
Etk	EPH-like Tyrosine Kinase

F	f.	folgende
	FSH	Follikelstimulierendes Hormon
	FOXO	Forkhead in Rhabdomyosarkome-like 1 (Genfamilie, z. B. FOXO 3a)
	f(x)	mathematische Funktion einer Variablen x
G	g	Gramm (Massenangabe)
	G	gap (im Zellzyklus), Guanin
	GADD 45	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gene 45
	GALT	Galactose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase
	GCSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
	GF	Growth Factor
	GFR	Growth Hormon Releasing Factor
	ggf.	gegebenenfalls
	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
	GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
	GnSAF	Gonadotropin Surge-Attenuating Factor
	GSTM1	Glutathion-S-Transferase M1
H	HDAC	Histondeacetylase
	HG	Housekeeping-Gen
	HGF	Hepatocyte Growth Factor
	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
	Hrsg.	Herausgeber
	HRT /HT	Hormonersatztherapie
	HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase

I	I	Fluoreszenzintensität
	ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
	ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
	IE	Internationale Einheit
	IFN	Interferon
	IFNAR	Interferon-Rezeptor Untereinheit/Kette 1
	IGF	Insuline-like Growth Factor
	IGFBP-3	Insuline-like Growth Factor Binding Protein-3
	IL	Interleukin
	IU	Internationale Unit
	IUP	Intrauterinpessar
	IVF	In-Vitro Fertilisation
	i. V.	im Vergleich
	i. V. m.	in Verbindung mit
J	JAB	JAK Binding Protein
	JAK	Janus Kinase
K	KG	Kandidatengen
	Ki 67	Proliferation-related Ki-67 Antigen (identified by monoclonal antibody Ki-67)
L	l	Liter
	Lck	Lymphocyte-specific Protein-Tyrosine Kinase
	LH	Luteinisierendes Hormon
	LIF	Leukemia Inhibitory Factor
	LJ	Lebensjahr

M	μ	micro (10⁻⁶)
	m	milli (10⁻³), Masse, Meter, Steigung einer Geraden
	M	molar, molare Masse, Mitose
	MCM	Minichromosome maintenance, S. cervisiae, Homolog of
	MCP	Monocyte Chemotactic Protein
	M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
	MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
	min	Minute
	MMP	Matrixmetalloproteinasen
	MnSOD	Mitochondriale Superoxid Dismutase
	mRNA	Boten-RNA (messenger)
N	n	nano (10⁻⁹), Schnittpunkt mit der y-Achse
	N	Teilchenanzahl einer abgeschlossenen Stoffmenge
	N_A	AVOGADRO-Konstante (6,023x10²³)
	NCBI	National Center for Biotechnology Information
	NK	Negativkontrolle, Natural-Killer-Zellen
	No.	Number (Zeitschrift)
	Nr.	Nummer
	NSAR	Nicht Steroidale Antiphlogistika
O	o. g.	oben genannt
	OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
P	%	Prozent
	§	Paragraph
	p	pico (10⁻¹²)

p27 (KIP1)	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
p53	Tumor Protein
p85	Phosphatidylinositol 3-Kinase, associated
p450	Cytochrome, steroid-inducible
p66shc	SHC Transforming Protein
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit p (Statistik)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
PG	Prostaglandine (z. B. PGE2)
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT (Genfamilie, z. B. PIAS X)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PK	Positivkontrolle
PKB	Proteinkinase B
POF	Premature Ovarian Failure (vorzeitige Ovarialinsuffizienz)
PTEN	Phosphatase und Tensinhomolog auf Chromosom 10
R	
rAFS	revised American Fertility Society
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cells Expressed and Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase

S	s	Sekunde (Zeitangabe)
	S	Synthese, Sedimentationskoeffizient
	S.	Seite
	SDHA	Succinat-Dehydrogenase Komplex, Untereinheit A
	SERM	Selective Estrogen Receptor Modulators
	SF-1	Steroidogenic Factor 1
	SHP	Protein Tyrosin Phosphatase (SH-Gruppe)
	SIRT1	Silent Information Regulator Typ 1
	SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling
	SP1	Specificity Protein 1
	SPRM	Selective Progesterone Receptor Modulators
	SRF	Serum Response Factor
	SSI	STAT-induced STAT Inhibitor
	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Genfamilie, z. B. STAT 3)
T	T	Temperatur, Thymin
	TBE	Trisbase, Borsäure, EDTA
	TBP	TATA Box-bindendes Protein
	TCF	Transcription Factor
	TGF	Transforming Growth Factor
	T_m	Schmelztemperatur
	TNF	Tumor Necrosis Factor
	TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
U	U	Unit
	u. a.	unter anderem

	usw.	und so weiter
	UV	Ultraviolett
V	V	Volt
	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
	v-fps	Fujinami Avian Sarcoma viral Oncogene
	vgl.	vergleiche
	Vol.	Volume (Zeitschrift)
	v-src	Avian Sarcoma viral Oncogene
Z	z. B.	zum Beispiel
	z. T.	zum Teil

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Genetik des POF-Syndroms.....	37
Tabelle 2:	Autoimmune Assoziationen zum POF-Syndrom.....	39
Tabelle 3:	Identifizierte Effektor-Gene von FOXO 3a nach Expressionsstudien	59
Tabelle 4:	Laborgeräte.....	72
Tabelle 5:	Verbrauchsartikel.....	73
Tabelle 6:	Laborchemikalien	73
Tabelle 7:	Gerätebedarf für die RNA Extraktion.....	74
Tabelle 8:	Verbrauchsmaterialien zur RNA Extraktion.....	74
Tabelle 9:	Reagenzien für die RNA Extraktion	74
Tabelle 10:	Ansatz für die RNA Extraktion einer Probe.....	76
Tabelle 11:	Geräte und Reagenzien für die cDNA Synthese.....	76
Tabelle 12:	Ansatz für die cDNA Synthese einer Probe	77
Tabelle 13:	Geräte und Reagenzien für die konservative PCR.....	78
Tabelle 14:	PCR Ansatz für eine Probe	80
Tabelle 15:	Geräte für die Gelelektrophorese	81
Tabelle 16:	Reagenzien für die Gelherstellung, TBE-Ansatz	81
Tabelle 17:	Zusammensetzung des Ladepuffers.....	82
Tabelle 18:	Aufreinigungsansatz für eine Probeneinheit	83

Tabelle 19:	Geräte und Reagenzien für die Gelaufreinigung.....	84
Tabelle 20:	Aufreinigungsansatz angepasst je Geleinheit (4 Banden pro Gen)	85
Tabelle 21:	Berechnung der Standard-Verdünnungsreihe	86
Tabelle 22:	Real-Time PCR Maschine und Auswertungssoftware	88
Tabelle 23:	Verbrauchsmaterialien für die Real-Time PCR	88
Tabelle 24:	Fertigreagenz für die Real-Time PCR.....	88
Tabelle 25:	Real-Time PCR Ansatz für eine Probe.....	89
Tabelle 26:	Sequenzierungsergebnisse der Kandidatengene (MWG)	96
Tabelle 27:	Berechnung absolute Auswertung (HG: SDHA).....	106
Tabelle 28:	Berechnung absolute Auswertung (HG: TBP)	106
Tabelle 29:	Berechnung relative Auswertung (HG: SDHA)	108
Tabelle 30:	Berechnung relative Auswertung (HG: TBP).....	108
Tabelle 31:	p-Werte der statistischen Auswertung.....	113

V. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lokale Östrogensynthese in Endometrioseläsionen (modifiziert nach Wülfing und Kiesel 2005, S. 327, Abb. 2.).....	47
Abbildung 2:	Immunmediatoren bei Endometriose (modifiziert nach Küpker et al. 1998, S. 722, Figure 3. und Finas et al. 2004, S. 119, Abb. 3)	50
Abbildung 3:	Interaktion von Immunsystem und Angiogenese (modifiziert nach Greb et al. 2002, S. 240, Abb. 2.)	51
Abbildung 4:	Regulationsmechanismen um FOXO 3a (angelehnt an Jünger et al. 2003, S. 20.14, Figure 7).....	58
Abbildung 5:	Wege der Aktivierung von STAT-Proteinen (modifiziert nach Darnell Jr. 1997, S. 1631, Fig. 2)	63
Abbildung 6:	Hemmende Einflüsse auf die STAT-Aktivierung (modifiziert nach Igaz et al. 2001, S. 436, Fig. 1)	68
Abbildung 7:	Standard Graph SDHA (Housekeeping-Gen).....	87
Abbildung 8:	Data Graph SDHA, Threshold line manuell = 0,037	87
Abbildung 9:	Melting Curve Graph PIAS (Kandidatengen, POF- Patientinnen)	91
Abbildung 10:	RNA (total) von Kontroll (K)- und Endometriose (E)-Proben nach RNeasy Mini Kit Extraktion	93
Abbildung 11:	Kontrolle der cDNA Synthese mittels Housekeeping-Gen (TBP).....	94

Abbildung 12:	Nachweis der Kandidatengene im Ovar (qualitativ)	95
Abbildung 13:	Nachweis eines Housekeeping-Gens (SDHA)	97
Abbildung 14:	Banden zur Aufreinigung aus dem Gel zur Standard- herstellung	98
Abbildung 15:	Standardreihen von PIAS X (links) und TBP (rechts).....	99
Abbildung 16:	Standardreihen von FOXO 3a (links) und STAT 3 (rechts)	99
Abbildung 17:	Amplifikation cDNA Pool mit SDHA Standard.....	100
Abbildung 18:	Probenverteilung i. V. zum TBP Standard	101
Abbildung 19:	Probenverteilung i. V. zum SDHA Standard.....	102
Abbildung 20:	STAT Endometriose-Gruppe	103
Abbildung 21:	Übersicht über die Quantifizierungsstrategien der Real-Time PCR (modifiziert nach Pfaffl 2004, S. 92, Abb. 1).....	104
Abbildung 22:	Ergebnisse absolute Auswertung (HG: SDHA).....	109
Abbildung 23:	Ergebnisse absolute Auswertung (HG: TBP).....	110
Abbildung 24:	Ergebnisse relative Auswertung (HG: SDHA)	111
Abbildung 25:	Ergebnisse relative Auswertung (HG: TBP)	111

VI. Erster Teil: Einführung in die Fragestellung

A. Einleitung

In Deutschland sind ca. 10-15 % aller Paare von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen. Angesichts der derzeitigen Gesellschaftsstruktur ist dies ein nicht zu vernachlässigender Anteil.¹ Die verursachenden Störungen sind bei Frauen und Männern etwa gleich verteilt, wobei häufig mehr als ein Faktor zum Tragen kommt. Bei einem Drittel der Fälle bleibt die Ursache allerdings dauerhaft ungeklärt.² Von ungewollter Kinderlosigkeit ist die Rede, wenn sich die erwünschte Schwangerschaft nach über zwölf Monaten immer noch nicht eingestellt hat.³ In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise auf die Zunahme dieses Problems im Zusammenhang mit Rauchen, Alkohol, anderen Umwelttoxinen und Stress. Doch auch Wohlstandserkrankungen wie Diabetes mellitus und andere Stoffwechselerkrankungen tragen ihren Teil dazu bei.⁴ Zweifelsohne sind eine veränderte Familienplanung sowie die Stellung von Ausbildung und Beruf dafür verantwortlich, dass das durchschnittliche Alter der Frauen zum Zeitpunkt der ersten Geburt bei inzwischen 28 Jahren angekommen ist.⁵ Die Anzahl der im Ovar angelegten Oocyten ist begrenzt und erreicht ihr Maximum von ca. sieben Millionen Zellen im fünften intrauterinen Monat. Schon bei der Geburt haben sie sich auf nur noch zwei Millionen verringert. Eine weitere Verringerung der Re-

¹ Vgl. Sator et al. 2003; Strowitzki 1998.

² Vgl. Strowitzki 1998.

³ Vgl. Strowitzki 1998.

⁴ Vgl. Ludwig et al. 2004; Margreiter et al. 2005; Strowitzki 1998.

⁵ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Strowitzki 1998.

serve auf 400.000 verbleibende Primordialfollikel erfolgt bis zum Eintritt in die Pubertät. Mit Beginn der Menopause befinden sich nur noch etwa 1000 Eizellen im Ovar.⁶ Die Fruchtbarkeit der Frau hängt daher nachweislich von ihrem Alter ab. Bis zum 40. Lebensjahr (LJ) vermindert sich die Chance auf ein Kind um 30 %, wobei insbesondere nach dem 35. LJ mit einer starken Abnahme zu rechnen ist.⁷ Von den vielen möglichen Ursachen der Kinderlosigkeit sind 21 % auf eine Störung des Eisprungs zurück zu führen. Wenngleich nur ein geringer Anteil davon auf das Krankheitsbild der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz (Premature ovarian failure syndrome, POF) entfällt, so ist es doch ihre schwerwiegendste Ausprägung. An POF erkrankte Frauen zeigen im Verlauf der Erkrankung viele Gemeinsamkeiten mit Frauen unmittelbar vor und während der Menopause. Fatal daran ist, dass die jungen Frauen ein Jahrzehnt zu früh von Eizellverlust und zunehmendem Östrogenmangel betroffen sind.⁸ Mit insgesamt 6 % ist die Endometriose eine der häufigsten prämenopausalen Subfertilität verursachenden Erkrankungen. Werden die Eierstöcke oder Eileiter von den ektopen Endometriumläsionen in Mitleidenschaft gezogen, scheint das Problem offensichtlich. Jedoch leiden auch Patientinnen mit scheinbar seichtem Krankheitsverlauf sehr häufig an Fertilitätsstörungen. Neue erklärende Ansatzpunkte befinden sich zurzeit im Forschungsstadium.⁹ Letzte Erfolg versprechende Maß-

⁶ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Küpker et al. 2002b; Schröder et al. 2004; Strowitzki 1999; Wirthner et al. 2000.

⁷ Vgl. Akande et al. 2004; Bancsi et al. 2002; Erdem et al. 2004; Kligman und Rosenwaks 2001; Lass et al. 1997; Margreiter et al. 2005; Strowitzki 1998; Strowitzki 1999; Toner et al. 1991.

⁸ Vgl. Strowitzki 1998.

⁹ Vgl. Ho et al. 2002; Jenkins et al. 1991; Reis et al. 2004; Strowitzki 1998; Strowitzki 1999.

nahme bleibt oft die assistierte Reproduktion in Form der In-Vitro Fertilisation (IVF). Heutzutage geht meist eine Stimulationsbehandlung voraus, für die verschiedene Protokolle vorhanden sind.¹⁰ Die Patientin wird hormonell und sonographisch überwacht und der Eisprung zum optimalen Zeitpunkt künstlich ausgelöst. Am Folgetag werden die herangereiften Follikel unter transvaginaler Ultraschallkontrolle abpunktiert und die Oozyten im Reaktionsgefäß mit den Spermazellen zusammengebracht. Die Befruchtung erfolgt auf natürlichem Wege ohne Zutun; ist sie erfolgreich, finden sich nach 18-24 Stunden Vorkernstadien. Zwei Tage nach der Punktion erfolgt der Embryotransfer (Zwei- oder Vierzellstadium). Auch die zweite Zyklushälfte wird hormonell bis zum sicheren Nachweis einer Schwangerschaft oder eintretender Regelblutung unterstützt.¹¹ Die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer mit diesem Verfahren liegt bei 20-25 %, sinkt aber bei den über 39-Jährigen auf nur 12 % ab.¹² Die klassischen Indikationsbereiche für die IVF bestehen aus einer sehr heterogenen Gruppe, beginnend beim tubaren Faktor und Endometriose über andrologische Einschränkungen bis hin zur idiopathischen¹³ Sterilität.¹⁴ Nicht alle Entitäten können mit gleich guter Effizienz behandelt werden. Schon während der hormonellen Stimulation gibt es einen Teil von Patientinnen (5-18%), die als „low responder“ bezeichnet

¹⁰ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Strowitzki 1999. Ein Überblick über mögliche Stimulationsverfahren findet sich in Macnamee und Brinsden 1999 und Urbancsek et al. 2000.

¹¹ Vgl. Strowitzki 1998. Für genauere Informationen zur Technologie der assistierten Reproduktion mittels IVF siehe Brinsden 1999; Elder 1999 sowie Rabe et al. 2000.

¹² Vgl. Dines et al. 2000; Felberbaum 1999; Strowitzki 1998.

¹³ Erkrankung ohne erkennbare oder nachweisbare Ursache; medizinisch essentiell.

werden.¹⁵ Eine einheitliche Definition für dieses Phänomen ist bisher noch nicht gefunden.¹⁶ Die Sensitivität der Eierstöcke auf Gonadotropine ist herabgesetzt. Es bilden sich nur wenige reife Follikel (< 2-5, Durchmesser < 14-17 mm) und auch der Östrogenspiegel (< 300-500 pg/ml) bleibt verhältnismäßig niedrig.¹⁷ Die Abbruchrate eines Stimulationszyklus unter den betroffenen Frauen ist relativ hoch, ihre Chance schwanger zu werden extrem gering.¹⁸ Die Schwangerschaftsrate korreliert positiv mit der Zahl der transferrten Embryonen (1 Embryo ≈ 9,8 %; 2 Embryonen ≈ 21,9 %; 3 Embryonen ≈ 33,8 %). In Deutschland ist gemäß dem Embryonenschutzgesetz das Übertragen von höchstens drei Embryonen erlaubt. Dadurch soll die Rate der Mehrlingsschwangerschaften, welche mit einem erhöhten Risiko für die Patientinnen einhergehen, möglichst gering gehalten werden.¹⁹ Zudem erhöht sich die Wahrscheinlichkeit auf Erfolg beim Transfer von über drei Embryonen nur noch unwesentlich.²⁰ Die IVF von Oocyten hat eine große Variation zwischen 30 % bis maximal 50-60 %.²¹ „Low responder“ haben nur

¹⁴ Vgl. Pellicer et al. 1994; Strowitzki 1998; Strowitzki 2000.

¹⁵ Vgl. Akande et al. 2004; Hohlagschwandtner et al. 1999; Margreiter et al. 2005; Martinez et al. 2002; Strowitzki 1999; Urbancsek et al. 2000.

¹⁶ Vgl. Bancsi et al. 2002; Erdem et al. 2004; Feldman et al. 2001; Kovacs und Witt 2002; Margreiter et al. 2005; Strowitzki 1999; Urbancsek et al. 2000.

¹⁷ Vgl. Akande et al. 2004; Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Bancsi et al. 2002; Erdem et al. 2004; Feldman et al. 2001; Hohlagschwandtner et al. 1999; Jenkins et al. 1991; Kovacs und Witt 2002; Kligman und Rosenwaks 2001; Lass et al. 1997; Margreiter et al. 2005; Pellicer et al. 1994; Strowitzki 1999; Urbancsek et al. 2000.

¹⁸ Vgl. Akande et al. 2004; Bancsi et al. 2002; Erdem et al. 2004; Jenkins et al. 1991; Kovacs und Witt 2002; Strowitzki 1999.

¹⁹ Vgl. Dines et al. 2000; Embryonenschutzgesetz 1990, § 1; Sator et al. 2003.

²⁰ Vgl. Strowitzki 1999.

²¹ Vgl. Felberbaum 1999; Feldman et al. 2001; Reis et al. 2004; Strowitzki 1999.

eine sehr geringe Oocytenausbeute, deren Qualität außerdem häufig vermindert ist. Deshalb kann eine „low response“ auch als relative Indikation für eine Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) angesehen werden.²² Als Risikofaktoren für eine „low response“ wurden inzwischen ein zu niedriger oder zu hoher basaler Spiegel des follikelstimulierenden Hormons (FSH) (< 5 oder > 15 mU/ml), ein Body-Mass-Index von kleiner 24 oder größer 30 und das chronologische Alter von über 35 LJ erkannt.²³ Anschließend folgte die Suche nach Möglichkeiten eventuelle prädiktive Faktoren früh zu erkennen, um die Patientinnen entsprechend ihrer ovariellen Reserve beraten zu können, dazu zählen:²⁴

- Bestimmung des basalen FSH am 3. Zyklustag (>10-15 mIU/ml),
- Bestimmung des Ovarvolumens mittels transvaginaler Sonographie (< 3 cm³) bzw. der Follikelanzahl (Antral Follicle Count),
- Bestimmung des basalen LH-Spiegels (< 3 mIU/ml),
- Bestimmung des basalen Östrogenspiegels (> 75-80 pg/ml),
- Bestimmung des frühfollikulären Inhibin B-Spiegels (< 45 pg/ml),
- Bestimmung des IGFBP-3-Spiegels,
- Clomiphen Challenge-Test (5.-9. Zyklustag Clomiphen, 9.-11. Zyklustag basales FSH erhöht auf > 12-26 IU/ml),

²² Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Bancsi et al. 2002; Feldman et al. 2001; Jenkins et al. 1991; Kligman und Rosenwaks 2001; Strowitzki 2000.

²³ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Hohlagschwandtner et al. 1999; Jenkins et al. 1991; Lass et al. 1997; Ludwig et al. 2004; Toner et al. 1991.

²⁴ Vgl. Akande et al. 2004; Bancsi et al. 2002; Erdem et al. 2004; Feldman et al. 2001; Kligman und Rosenwaks 2001; Kovacs und Witt 2002; Lass et al. 1997; Margreiter et al. 2005; Martinez et al. 2002; Pellicer et al. 1994; Salobir et al. 1996; Sator et al. 2003; Sonntag et al. 2004; Strowitzki 1999; Toner et al. 1991; Urbancsek et al. 2000.

-
- Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)-Test (2.-4. Zyklustag GnRH, Ausbleiben des flare-up Effekts),
 - FSH-Test (3. Zyklustag 300 IU FSH, 24 h danach basales FSH > 11 IU/ml und Östrogen < 30 pg/ml).
 - Weitere potenzielle Marker (z. B. GnSAF), deren biologische Funktion teilweise noch ungeklärt ist, werden erforscht.
 - Zuletzt wurden Ansätze zur Entwicklung eines Score-Systems aus der Kombination verschiedener prädiktiver Faktoren untersucht.

Bekannte Stimulationsprotokolle wurden in Erwartung eines verbesserten Ergebnisses modifiziert und zahlreiche neue Schemata initiiert. Sowohl eine gesteigerte Gonadotropindosis als auch der Einsatz von flare-up-Protokollen sowie die Kombination mit Wachstumshormon, GFR, Glukokortikoiden oder Acetylsalicylsäure erbrachten zweifelhafte und zwischen den Studien variierende Ergebnisse. Ebenfalls enttäuscht wurde die anfängliche Hoffnung auf Erfolg bei der Reduktion der GnRH-Agonisten-Menge, Verwendung von rekombinantem FSH und der Voröstrogenisierung mit Ovulationshemmern. Bisher konnte in klinischen Studien kein zu einem Benefit führendes Verfahren gefunden werden. Alternativ kommen auch so genannte Softprotokolle zur Unterstützung eines natürlichen Zyklus zur Anwendung.²⁵ Somit fehlt weiterhin ein einheitliches, aussichtsreiches Vorgehen bei der Behandlung von „low responder“-Patientinnen.²⁶ Die Diagnose POF-Syndrom ist sehr wahrscheinlich, wenn mehrfach erhöhte basale FSH-

²⁵ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Feldman et al. 2001; Hohlagschwandtner et al. 1999; Strowitzki 1999; Urbancsek et al. 2000.

²⁶ Vgl. Strowitzki 1999.

Konzentrationen nachgewiesen werden können.²⁷ Doch auch andere Ursachen, wie Endometriose, Eierstockoperationen, Chemo- und Radiotherapie sowie weitere genetische oder umweltbedingte Veränderungen können eine „low response“ hervorrufen.²⁸ Unabhängig von einer FSH-Erhöhung konnten immunologische und angiogenetische Auffälligkeiten im Ovar der betroffenen Patientinnen aufgedeckt werden, die sowohl zu den pathophysiologischen Konzepten der Endometriose als auch der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz passen könnten.²⁹ Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufdeckung der genetischen Hintergründe beider Erkrankungen (POF und Endometriose) zu leisten. Dazu wurden drei Kandidatengene (FOXO 3a, STAT 3 und PIAS X) identifiziert, deren differentielle Expression nun an erkrankten und gesunden Ovarien untersucht werden soll. Nur mit einer verbesserten Kenntnis sowohl der physiologischen als auch der pathologischen Verhältnisse im Ovar und deren Veränderungen während der verschiedenen Entwicklungsstadien wird es in Zukunft möglich sein, kausale Therapieansätze zu verfolgen und die Patientinnen in eine erfolgreiche Kinderwunschbehandlung zu führen.³⁰

²⁷ Vgl. Pellicer et al. 1994.

²⁸ Vgl. Ho et al. 2002; Jenkins et al. 1991; Margreiter et al. 2005; Martinez et al. 2002; Reis et al. 2004; Toner et al. 1991.

²⁹ Vgl. Ho et al. 2002; Jenkins et al. 1991; Margreiter et al. 2005; Pellicer et al. 1994; Reis et al. 2004; Strowitzki 1999.

³⁰ Vgl. Margreiter et al. 2005.

B. Betrachtete Krankheiten

1. Premature ovarian failure (POF)

a) Definition, Prävalenz und Symptomatik

Etwa 1-2 % der unter 40-jährigen und 0,1 % der unter 30-jährigen Frauen in Mitteleuropa erleiden eine vorzeitige Ovarialinsuffizienz.³¹ Dabei kommt es zum verfrühten Versiegen der Ovarfunktionen und infolge des Östrogenmangels zu menopausenähnlichen Symptomen. Das negative Feedback der Gonaden auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse entfällt, wodurch die zentrale Hormonsekretion enthemmt wird. Als wichtigstes Definitionskriterium des entstandenen hypergonadotropen Hypogonadismus gilt der dauerhaft (> 4 Monate) über 40 IE/l erhöhte FSH-Spiegel im Blut (zwei Messungen im Abstand von mindestens einem Monat) bei niedrigen Östrogenwerten. Als Erstes wird oft die begleitende Oligo- oder Amenorrhö bemerkt, die je nach Ursache der Erkrankung primär (10-28 % mit POF) oder sekundär (4-18 % mit POF) sein kann.³² Jedoch beschreibt nur ein Teil der Frauen bereits im Vorfeld der Diagnose seit längerem bestehende Zyklusunregelmäßigkeiten;³³ über die Hälfte der Betroffenen haben keine Zyklusauffälligkeiten.³⁴ Häufig kommt es nur bei Kinderwunschbehandlung oder bei Abklärung anhaltender postmenopausaler Symptome (Flush, vermehrtes Schwitzen, Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit, depressive Verstimmung

³¹ Vgl. Küpker et al. 2002b; Runnebaum und Rabe 1999; Ulrich et al. 2002; Wirthner et al. 2000.

³² Vgl. Lamal et al. 2000 ; Runnebaum und Rabe 1999.

³³ Vgl. Falsetti et al. 1999.

usw.)³⁵ und ovarieller Ausfallerscheinungen (z. B. Vaginitis, Dysurie, Dysparunie)³⁶ zur weiteren Diagnostik und zufälligen Aufdeckung des Krankheitsbildes. Lange wurde dieser Zustand für fix und irreversibel gehalten, was sich in der Bezeichnung „vorzeitige Menopause“ niederschlägt. Inzwischen ist durch spontan eingetretene Schwangerschaften (5-10 %) ³⁷ bekannt, dass vereinzelte Ovulationen auftreten können und zumindest über einen gewissen Zeitraum eine Restfunktion des Ovars erhalten bleibt, wodurch der neuere Begriff der „vorzeitigen ovariellen Dysfunktion“³⁸ geprägt wurde. Während des Erkenntnisprozesses ergaben sich mehrere Versuche einer Klassifikation. Histologisch und auch sonographisch hält sich die Einteilung in folliculäre (Dysfunktion der Follikel, Resistant Ovary Syndrom) und afollikuläre (Follikelatresie) Ovarien.³⁹ Jedoch lassen sich nicht alle verursachenden Entitäten entsprechend zuordnen. Zudem besteht weiterhin Unklarheit, ob nicht zwei Stadien eines progredienten Verlaufes erfasst werden, bei dem zunächst noch restliche Follikel vorhanden sind und zu Grunde gehen bevor das Ovar schließlich komplett „leer“ ist.⁴⁰ Scheinbar einfacher ist die Unterteilung in familiäre hereditäre Formen (4-30 %), die sich durch einen frühzeitigen Beginn auszeichnen, und die sporadisch auftre-

³⁴ Vgl. Runnebaum und Rabe 1999.

³⁵ Vgl. Falsetti et al. 1999; Laml et al. 2000.

³⁶ Vgl. Ulrich et al. 2002.

³⁷ Vgl. Laml et al. 2000; Runnebaum und Rabe 1999; Wirthner et al. 2000.

³⁸ Vgl. Laml et al. 2000.

³⁹ Vgl. Fox 1992.

⁴⁰ Vgl. Laml et al. 2000.

tenden Fälle.⁴¹ Allerdings wird auch damit keine Klarheit über die sehr heterogene Ätiologie des Krankheitsbildes erreicht. Der theoretische Ansatz zu den vier physiologischen Verursachungsmöglichkeiten (verminderte Follikelanlage, induzierte Atresie, Rekrutierungsstörung, Ausreifungsarrest) hat sich aufgrund mangelnder Kenntnisse von den verschiedenen Krankheitsentitäten bisher nicht als praktikabel erwiesen.⁴² Es bleibt also nur die genaue Identifikation des verursachenden Prinzips in jedem Einzelfall.

b) Ätiologie

Der kommende Abschnitt soll einen Überblick über die wichtigsten kausalen Bereiche und Entitäten der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz geben. Aufgrund der bereits angesprochenen Mannigfaltigkeit und des ständig neuen Erkenntniszuwachses kann in diesem Rahmen kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden. Die wichtigsten heute bekannten Auslöser finden sich in den folgenden Bereichen:⁴³

- Genetik (Chromosomenaberration, Genmutation),
- Autoimmunerkrankungen (vgl. Tabelle 2),
- Infektionen (z. B. Mumps, AIDS, Varicellen, Cytomegalie, Shigellen, Malaria),
- iatrogen (pelvine Operation, Chemotherapie, Radiotherapie),
- Umweltnoxen (z. B. Nikotin).

⁴¹ Vgl. Runnebaum und Rabe 1999; Schröer et al. 2004; Strowitzki und Vogt 2003; Tibiletti et al. 1999.

⁴² Vgl. Christin-Maitre et al. 1998; Küpker et al. 2002b.

Allerdings gelten 60 % der Fälle immer noch als idiopathisch, da bei ihnen keine Ursache gefunden werden kann.⁴⁴ Als die beiden wichtigsten kausalen Gebiete werden die genetische Disposition und Störungen der Autoimmunität genannt, die über die Hälfte aller POF-Erkrankungen erklären sollen.⁴⁵ Das Krankheitsbild der prematuren Menopause kann sowohl eigenständig auftreten als auch Teil eines Gesamtsymptombildes im Rahmen einer übergeordneten Erkrankung sein. Dabei finden sich im Bereich der Genetik wiederum vielfältige Untergruppen, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Theoretisch werden folgende Konsequenzen einer chromosomalen Veränderung angenommen:⁴⁶

- Chromosomendefekte führen durch eine nicht regelrechte Anordnung in der Äquatorialebene der Zelle zu einer behinderten Teilung und anschließendem Zelltod.
- Es werden Gene inaktiviert die für eine normale ovarielle Entwicklung nötig sind (z. B. Haploinsuffizienz).
- Gene, die eine folliculäre Atresie begünstigen, werden vermehrt exprimiert.

⁴³ Vgl. Runnebaum und Rabe 1999; Strowitzki und Vogt 2003.

⁴⁴ Vgl. Schröer et al. 2004.

⁴⁵ Vgl. Schröer et al. 2004.

⁴⁶ Vgl. Layman 2002; Prueitt et al. 2000.

Genetik des POF-Syndroms

Untergruppe	Gen	Lokus	Penetranz
X-Chromosomenaberration (63 %)			
Triple X			37 %
Ulrich-Turner-Syndrom (XO), Varianten (Mosaik, Deletionen)		(Xp11.2- 22.1)	variabel, XO 90 %
balancierte X-autosome Translokation			
autosomale Chromosomenaberration			
Trisomien (13, 18, 21, 22)			
Genmutation X			
Fragiles X-Syndrom (FRAXA) Prämut. ⁴⁷	FMR 1	Xq27.3	16-21 %
Genmutation autosomal			
Soffwechselstörung (Enzymdefekt)			
Galaktosämie (GALT)	Q188R		65-80 %
Karbohydratdefizientes Glykoprotein- syndrom, Typ1 (CDG 1)	PMM2-Gen		
Achondroplasia			
Diabetes mellitus			
Schilddrüsenerkrankungen			
Steroidsynthese (Enzymdefekte)			
17a Hydrolase, 17-20 Desmolase	CYP 17		
Aromatase	CYP 19		
Signaldefekte			
FSH-Rezeptor		2p21-15	variabel
LH-Rezeptormutation		2p	
Inhibingenmutation	a-Gen		
Syndrome ⁴⁸			
Blepharophimosis-Ptoxis-Epicanthus inversus Syndrom, Typ 1 (BPES) ⁴⁹	FOXL 2	3q22-24	
autoimmune Polyendokrinopathie-Candi- Diasis-ektodermale Dystrophie (APECED)	AIRE	21q22.3	>60 %
Ataxia-Teleangiectasia-Genmutation	ATM	11q22-23	
Nijmegen-Breakage-Syndrom	NBS 1	8q21	

⁴⁷ Vgl. Machado-Ferreira et al. 2002.

⁴⁸ Vgl. Wieacker 2002.

⁴⁹ Vgl. De Baere et al. 2001; Prueitt und Zinn 2001.

Werner-Syndrom	RECQL 2	8p12-11.2
Bloom-Syndrom	RECQL 3	15q26.1
Cockayne-Syndrom	ERC 6/ 8	5/10q11
Denys-Drash-Syndrom	WT 1	11p15
Rothmund-Thomson-Syndrom	RECQL 4	8q24.3
Perrault-Syndrom		
Martsoft-Syndrom		
identifizierte Kandidatengene		
POF 1 ⁵⁰		Xq26-28
POF 2	DIAPH 2	Xq13.3-22
X inactivation site (XIST)		Xq13
Xaa Proaminopeptidase ⁵¹	XPNPEP 2	
Eukaryontischer Transkriptionsfaktor 2B ⁵²	EIF 2 B	
Transkriptionsfaktoren	ZFX	Xp21-22
	FOXO 3a	
(Steroid-Faktor 1) SF 1	NR5A 1	
Signal Transduktion	STAT ⁵³	
	GDF 9	
	BMP 15	
Tyrosinkinase Rezeptor (c-kit)		
Apoptoseregulation	BAX	
	BCL 2	
Meiose	MLH 1	
Proteinbildung	DAZL	
	CPEB	
Adhäsion (Connexin 37)		

Tabelle 1: Genetik des POF-Syndroms ⁵⁴

⁵⁰ Vgl. Küpker et al. 2002b.

⁵¹ Vgl. Prueitt et al. 2000.

⁵² Vgl. Fogli et al. 2003.

⁵³ Vgl. Küpker et al. 2002b.

⁵⁴ Vgl. Bondy et al. 1998; Christin-Maitre et al. 1998; Laml et al. 2000; Layman 2002; Schlessinger et al. 2002; Schröer et al. 2004; Strowitzki und Vogt 2003; Ulrich et al. 2002; Wieacker 2002.

Eine weitere starke Assoziation besteht zu autoimmunen Veränderungen (20 %),⁵⁵ einerseits in Form eines Teilsymptoms bekannter Autoimmunerkrankungen (vgl. Tabelle 2), andererseits durch den gehäuften Nachweis bestimmter Autoantikörper,⁵⁶ deren Spezifität bisher nicht belegt werden konnte, da diese auch in gesunden Frauen auftreten können.⁵⁷ Auch die entsprechenden organspezifischen Antigene sind noch nicht vollständig identifiziert.⁵⁸ Daher kann ein isoliertes autoimmun verursachtes POF-Syndrom zurzeit nur nach Ausschluss aller anderen bekannten Ursachen und gegebenenfalls einem histologischen Nachweis einer Oophoritis diagnostiziert werden.⁵⁹

⁵⁵ Vgl. Betterle und Volpato 1998.

⁵⁶ Vgl. Betterle und Volpato 1998; Fox 1992; Laml et al. 2000; Luborsky 2002; Strowitzki und Vogt 2003; Ulrich et al. 2002.

⁵⁷ Vgl. Betterle und Volpato 1998; Bondy et al. 1998; Luborsky 2002; Novosad et al. 2003.

⁵⁸ Vgl. Betterle und Volpato 1998.

⁵⁹ Vgl. Betterle und Volpato 1998.

Autoimmunerkrankungen	Autoantikörper
Morbus Addison	Ak gegen Zona pellucida
Myasthenia gravis	Ak gegen Oocyten Cytoplasma
Morbus Crohn	Ak gegen Granulosazellen
Vitiligo	Ak gegen FSH-Rezeptor
Lupus erythematodes	Ak gegen LH-Rezeptor
Sjögren Syndrom	Steroidzellantikörper (SCA)
Rheumatoide Arthritis	3 β HSD-Antikörper
Diabetes mellitus (Typ 1)	
Hypothyreose	
Hypoparathyroidismus	
perniciöse Anämie	

Tabelle 2: Autoimmune Assoziationen zum POF-Syndrom⁶⁰

Um die betroffenen Patientinnen in Zukunft angemessen behandeln zu können und Nebenwirkungen einer unnötigen Behandlung zu vermeiden, müssen sowohl die physiologischen als auch die pathologischen Veränderungen, die zur Entstehung dieses Krankheitsbildes führen, weiter aufgeklärt und geeignete diagnostische Maßnahmen zu deren Erkennung entwickelt werden.

c) Therapie

Die Behandlung der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz ist bisher ausschließlich symptomatisch ausgerichtet. Dabei stehen vor allem der Ausgleich der endokrinologischen Unterversorgung und die verminderte Reproduktionsfä-

⁶⁰ Vgl. Betterle und Volpato 1998; Fox 1992; Laml et al. 2000; Luborsky 2002; Runnebaum und Rabe 1999; Strowitzki und Vogt 2003; Ulrich et al. 2002.

higkeit im Mittelpunkt.⁶¹ Den Betroffenen sollte nicht nur bei Kinderwunsch, sondern bei entsprechender Diagnosestellung dieser menopausenähnlichen Krankheit stets eine umfassende Aufklärung und psychische Unterstützung geboten werden.⁶² Ebenso wie nach der Menopause ist durch den Östrogenmangel das Risiko für Osteoporose und kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht.⁶³ Daher wird oft eine Hormonersatztherapie (HRT) empfohlen. Anders als bei der postmenopausalen Substitution ist eine Dosierung in voller Höhe der sonst im gesunden Ovar gebildeten Steroidhormone nötig.⁶⁴ Eine Fortführung nach Eintritt des normalen Menopausenalters (durchschnittlich 51. LJ) steht in Frage, da die HRT nachweislich negative Auswirkungen wie z. B. ein erhöhtes Risiko für verschiedene Karzinome birgt.⁶⁵ Durch zusätzliche Einhaltung einer gesunden Lebensweise (calciumreiche Ernährung, Nichtraucherin, Bewegung)⁶⁶ kann der Gefahr der Osteoporose begegnet werden. Auch andere klimakterische Syndrome sowie die Urogenitalatrophie können mit der HRT gut behandelt werden. Nach derzeitiger Studienlage ist sie jedoch nicht, wie zuvor angenommen, geeignet, um kardiovaskulären Ereignissen vorzubeugen.⁶⁷ Ein weiteres großes Problem stellt die Subfertilität der jungen Patientinnen dar. In der Sterilitätssprechstunde gehören sie zu der Gruppe der schwer therapierba-

⁶¹ Vgl. Nelson 2001.

⁶² Vgl. AWMF-Leitlinien online Register Nr. 016/003; Nelson 2001.

⁶³ Vgl. Nelson 2001.

⁶⁴ Vgl. Nelson 2001.

⁶⁵ Vgl. AWMF-Leitlinien Register online Nr. 015/038; Nelson 2001; Schröder et al. 2004; Ziegler und Meldrum 2005.

⁶⁶ Vgl. Nelson 2001.

⁶⁷ Vgl. AWMF-Leitlinien online Register Nr. 015/038; Ziegler und Meldrum 2005.

ren „low responder“, deren Ovarien nicht entsprechend auf die hormonelle Stimulation reagieren.⁶⁸ Trotz immer wieder neuer Therapieversuche (Gonadotropinerhöhung, GnRH-Agonisten Verminderung, flare up Protokolle, Wachstumshormone, GFR, Glukokortikoide, Voröstrogenisierung, Softprotokolle bei natürlichem Zyklus)⁶⁹ konnte bisher kein allgemein anerkanntes funktionierendes Behandlungskonzept erstellt werden.⁷⁰ Eine erfolgreichere Alternative wäre die in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz untersagte Eizellenspende.⁷¹ Andernfalls haben die Paare eine etwa 10%ige Chance auf eine spontan eintretende Schwangerschaft. Frauen ohne Kinderwunsch sollten deshalb antikonzeptionell behandelt werden.⁷²

2. Endometriose

a) Definition, Prävalenz, Symptomatik und Klassifikation

Die Endometriose ist eine meist chronisch verlaufende benigne Erkrankung, bei der sich endometriales Gewebe außerhalb der eutopen Lokalisation in der Uterushöhle manifestiert und ausbreitet.⁷³ Befinden sich die ektopen

⁶⁸ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Strowitzki 1999; Zollner und Steck 2003.

⁶⁹ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; De Geyter 2003; Strowitzki 1999; Zollner und Steck 2003.

⁷⁰ Vgl. De Geyter 2003; Nelson 2001; Strowitzki 1999.

⁷¹ Vgl. Bals-Pratsch und Diedrich 2001; Embryonenschutzgesetz 1990, §1; Nelson 2001; Zollner und Steck. Zur Technologie der Eizellenspende siehe Marcus und Brinsden 1999.

⁷² Vgl. Nelson 2001.

⁷³ Vgl. Barnhart et al. 2002; Brosens 1999; Dabrosin et al. 2002; Smith 1999; Wu und Ho 2003.

Endometrioseherde innerhalb der Uteruswand, spricht man von Endometriosis genitalis interna. Bei dem Befall der Tuben, Ovarien oder des genitalen Peritonealüberzugs liegt eine Endometriosis genitalis externa vor. Im Falle der Endometriosis extragenitalis sind andere Teile des Peritoneums wie z. B. Blase und Darm betroffen.⁷⁴ Die Endometriose ist keine seltene Erkrankung, die in Mitteleuropa bei ca. 10 % aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter anzutreffen ist.⁷⁵ In der Sterilitätssprechstunde findet sich eine entsprechend höhere Prävalenz von 20-40 %. Dieser Effekt ist jedoch teilweise auf die besonders gründliche Diagnostik in diesem Patientinnenkollektiv zurückzuführen.⁷⁶ Wegweisendes Symptom sind die starken zyklusabhängigen Unterbauchschmerzen, die oft mit Dysmenorrhö einhergehen. Zusätzlich können bei entsprechender anatomischer Lage der Herde Schmerzen und Blutabgang bei Geschlechtsverkehr, Miktion und Defäkation auftreten.⁷⁷ Trotz genauer klinisch palpabler Untersuchung, transvaginalem und transrektalem Ultraschall kann bei anhaltend schwerem Krankheitsbild und Sterilität (30-50 %)⁷⁸ die gültige Diagnose nur durch die Laparoskopie (ggf. mit Hysteroskopie und Chromopertubation) gesichert werden.⁷⁹ Hierdurch lässt sich eine standardisierte Klassifikation (rAFS-Einteilung) erfassen, die sich an Größe und Tiefe, Adhäsionsfähigkeit

⁷⁴ Vgl. Sillem und Teichmann 2003.

⁷⁵ Vgl. Barnhart et al. 2002; Brucker 2004; Dabrosin et al. 2002; Finas et al. 2004; Koninckx und Barlow 1999; Sillem und Teichmann 2003; Wieser et al. 2004.

⁷⁶ Vgl. Barnhart et al. 2002; Dabrosin et al. 2002; Martínez-Román et al. 1997; Sillem und Teichmann 2003.

⁷⁷ Vgl. Barnhart et al. 2002; Brucker 2004; Dabrosin et al. 2002; Sillem und Teichmann 2003; Wu und Ho 2003.

⁷⁸ Vgl. Martínez-Román et al. 1997.

⁷⁹ Vgl. Sillem und Teichmann 2003; Smith 1999.

der ektopen Zellen, Lokalisation und Ausdehnung sowie Durchgängigkeit der Tuben orientiert. Jedoch korreliert diese Stadieneinteilung (I-IV) nicht ausreichend mit dem klinischen Schweregrad der Subfertilität und anderen typischen Beschwerden.⁸⁰ Trotz medikamentöser und chirurgischer Therapien kommt es in bis zu 80 % der fortgeschrittenen Fälle nach drei bis fünf Jahren zu Rezidiven.⁸¹ Wahrscheinliche Risikofaktoren dieser hauptsächlich prämenopausal östrogenabhängig⁸² auftretenden Erkrankung sind eine kurze Zyklusdauer, eine frühe Menarche, Geburtenlosigkeit (Nulliparae) und obstruktive anatomische Fehlbildungen.⁸³

b) Ätiologie und Modelle der Pathophysiologie

Anerkannt ist heute die Theorie der retrograden Menstruation und Implantation von ektopen Endometrium nach Sampson.⁸⁴ Da bei 76-90 % aller Frauen eine solche retrograde Menstruation angenommen wird, jedoch nur ein Bruchteil auch an Endometriose erkrankt, wird heute nach Faktoren gesucht, die diese Entwicklung erklären.⁸⁵ Um zu verstehen, wie eine Zelle in

⁸⁰ Vgl. American Society of Reproductive Medicine 1997; Brosens 1999; Malik et al. 2002; Sillem und Teichmann 2003.

⁸¹ Vgl. Brucker 2004; Küpker et al. 2002a; Schweppe 2002.

⁸² Vgl. Dabrosin et al. 2002; Gazvani und Templeton 2002; Küpker et al. 2002a.

⁸³ Vgl. Sillem und Teichmann 2003; Smith 1999; Wu und Ho 2003; Wülfing und Kiesel 2005.

⁸⁴ Vgl. Brosens 1999; Dabrosin et al. 2002; Gazvani und Templeton 2002; Koninckx und Barlow 1999; Sillem und Teichmann 2003; Smith 1999; Wu und Ho 2003.

⁸⁵ Vgl. Leyendecker et al. 1996; Gazvani und Templeton 2002; Kressin et al. 2002; Malik et al. 2002; Smith 1999.

fremder Umgebung überleben, sich festsetzen und proliferieren kann, müssen folgende theoretisch mögliche Ursachen überprüft werden:⁸⁶

- Ein Mehrangebot an rückfließenden Gewebsanteilen erhöht die Wahrscheinlichkeit der ektopen Manifestation.⁸⁷
- Besondere Eigenschaften (Adhäsionsfähigkeit, Apoptoseresistenz) und Fähigkeiten (Enzyminduktion) der Zellen befähigen diese, der normalen immunologischen Reinigungsfunktion zu entgehen.⁸⁸
- Ein verändertes peritoneales Milieu bietet günstige Bedingungen (Immunmodulation, Wachstumsfaktoren, Angiogeneseinduktion, hormonelle Steuerung) für ein Fortbestehen der Zellproliferation.⁸⁹
- Alle Veränderungen müssen auf genetischer Ebene reproduzierbar und kausal verfolgbar sein. Das familiär signifikant erhöhte Erkrankungsrisiko (5-8 %) für Verwandte ersten Grades, insbesondere im Falle schwerer Formen, weist auf einen polygenen Erbgang hin. Nach möglichen Kandidatengenomen wird gesucht; bekannt sind Verbindungen zu GALT und GSTM1.⁹⁰

In vielen Bereichen konnten bisher Forschungsergebnisse erzielt werden, die jedoch nicht immer einheitlich sind. Außerdem stellt sich die Frage, wie diese in ein gemeinsames Konzept der Pathophysiologie integriert werden können, da oft Unklarheit darüber besteht, ob das Entdeckte kausal oder re-

⁸⁶ Vgl. Dabrosin et al. 2002; Gazvani und Templeton 2002; Wieser et al. 2004.

⁸⁷ Vgl. Leyendecker et al. 1996; Smith 1999.

⁸⁸ Vgl. Leyendecker et al. 1996.

⁸⁹ Vgl. Leyendecker et al. 1996.

⁹⁰ Vgl. Kennedy 1999; Wieser et al. 2004; Wu und Ho 2003.

aktiv zu werten ist.⁹¹ Es konnte gezeigt werden, dass die Uterusmuskulatur von an Endometriose erkrankten Frauen einer gesteigerten und fehlgerichteteten Peristaltik unterliegt, die den retrograden Transport von abgeschilfertem Gewebe unterstützt.⁹² Genexpressionsstudien ergaben zahlreiche Hinweise in verschiedensten Bereichen, darunter Veränderungen der Konzentrationen von Zytoskelettbestandteilen (Vimentin, β -actin, α 2-actin), die die Invasivität der Zellen belegen könnten,⁹³ ribosomalen Proteinen und atypischen Immunglobulinen in den Läsionen.⁹⁴ Eine großflächig angelegte Studie zeigte aberrante Expressionsmuster der folgenden Genprodukte:⁹⁵

- Integrine, Transportproteine;
- Matrixmetalloproteinasen, Zinkmetalloenzyme;
- Wachstumsfaktoren;
- Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsmoleküle;
- RNA-Poly-merase, Translationsenzyme (Processing),
- DNA Reparaturenzyme, antiapoptotische Proteine (Bcl-2, Bax);
- Enzyme der Steroidbiosynthese, Carboanhydrase;
- Zelloberflächenmoleküle, Progesteronrezeptoren, Glycodelin, Implantationsfaktoren;
- sekretorische Proteine, Immunmodulatoren, vesikuläre Transportmoleküle.

⁹¹ Vgl. Gazvani und Templeton 2002.

⁹² Vgl. Leyendecker et al. 1996.

⁹³ Vgl. Eyster et al. 2002.

⁹⁴ Vgl. Eyster et al. 2002.

⁹⁵ Vgl. Finas et al. 2004; Kao et al. 2003; Wieser et al. 2004; Wu und Ho 2003.

Von besonderem Interesse sind die Matrixmetalloproteinasen (MMP), denen bei der ektopen Implantation der endometrioiden Zellen wohl eine bedeutende Rolle zukommt.⁹⁶ Im Mittelpunkt steht derzeit die Überexpression der Aromatase (Androstendion und Testosteron zu Östron und Östradiol) in den ektopen Herden, die durch eine vermehrte lokale Östradiolbildung den Zellen eine autonome Proliferation ermöglicht.⁹⁷ Gesteuert wird dieser Vorgang von einem ausschließlich im ektopen Endometrium vorkommenden, stimulierenden, hochaffinen Transkriptionsfaktor SF-1 (Steroidogenic Factor 1), während ein hemmender Transkriptionsfaktor COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor) gleichermaßen im ektopen wie im eutopen Gewebe vorhanden ist.⁹⁸ Eine parallel dazu vorhandene 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD) Typ 2-Defizienz verstärkt diesen Effekt. Die unverändert vorliegende 17 β -HSD Typ 1 bildet fortwährend Östradiol, das nicht mehr in der Gegenreaktion (17 β -HSD Typ 2) wieder zu Östron umgebaut werden kann.⁹⁹ Auch die Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist in den Endometrioseherden deutlich erhöht. Verschiedene immunologische entzündliche Substanzen und Östrogen induzieren deren Expression. Durch die COX-2 gebildetes Prostaglandin E2 (PGE2) führt wiederum über einen positiven Feedback-Mechanismus zur verstärkten Synthese von Aromatase, so dass ein Circulus

⁹⁶ Vgl. Brosens 1999; Donnez et al. 1998; Finas et al. 2004; Kressin et al. 2002; Malik et al. 2002; Wu und Ho 2003.

⁹⁷ Vgl. Brucker 2004; Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Finas et al. 2004; Gazvani und Templeton 2002; Wülfing und Kiesel 2005.

⁹⁸ Vgl. Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Finas et al. 2004; Wülfing und Kiesel 2005.

⁹⁹ Vgl. Brucker 2004; Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Finas et al. 2004; Wülfing und Kiesel 2005.

vitosus entsteht (vgl. Abbildung 1).¹⁰⁰ Diese Erkenntnisse fügen sich in das steril-inflammatorische Gesamtbild des endometriösen Milieus ein.¹⁰¹

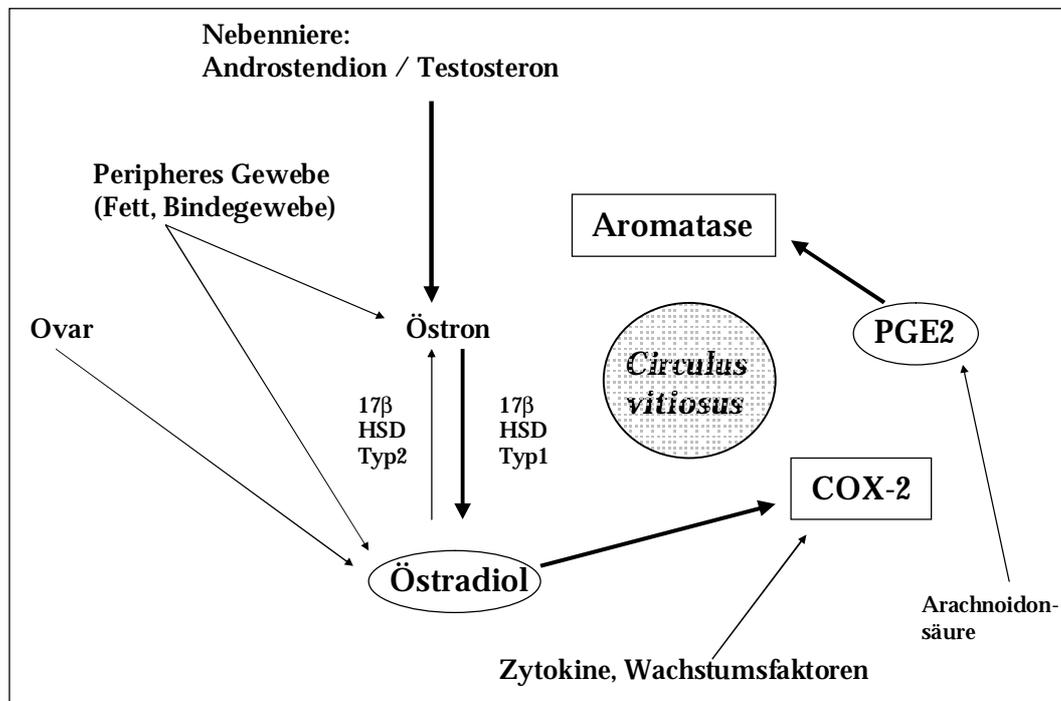


Abbildung 1: Lokale Östrogensynthese in Endometrioseläsionen (modifiziert nach Wülfing und Kiesel 2005, S. 327, Abb. 2.)

In der Peritonealflüssigkeit an Endometriose erkrankter Frauen findet sich eine deutlich erhöhte Anzahl immunkompetenter Zellen.¹⁰² Ausnahme stellen hierbei die Natural-Killer (NK)-Zellen dar, deren zytotoxische Funktion

¹⁰⁰ Vgl. Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Gazvani und Templeton 2002; Wülfing und Kiesel 2005.

¹⁰¹ Vgl. Gazvani und Templeton 2002; Wu und Ho 2003.

¹⁰² Vgl. Gazvani und Templeton 2002; Greb et al. 2002; Martínez-Román et al. 1997.

behindert scheint.¹⁰³ Besondere pathophysiologische Bedeutung kommt den in großer Menge vorhandenen und stark aktivierten Makrophagen zu.¹⁰⁴ Einerseits werden sie rekrutiert, um das ortsfremde Gewebe zu entfernen,¹⁰⁵ andererseits zusätzlich von verstärkt in den ektopen Zellen gebildeten Chemokine (Eotaxin, RANTES) angezogen.¹⁰⁶ Durch sie ausgeschüttete sekretorische Produkte (IL-1, 2, 6, 8, 10, TNF- α , IFN- γ , VEGF, PGE2, PGF2 α) scheinen den Krankheitsprozess zu unterstützen.¹⁰⁷ Daneben finden sich weitere im immunologischen Kontext stehende Moleküle in veränderter Konzentration (vgl. Abbildung 2):¹⁰⁸ Wachstumsfaktoren (PDGF, IGF, EGF, bFGF, M-CSF, HGF, TGF- β), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1), Zytokine (IL-13, MCP-1, MIF) und Erythropoietin. Hingegen konnten Hinweise auf ein autoimmunes Geschehen (Nachweis von Autoantikörper, Assoziation zu atopischer Diathese) bisher nicht spezifiziert werden.¹⁰⁹ Eine wichtige Interaktion der immunologischen Veränderungen besteht jedoch zum Prozess der Angiogenese (vgl. Abbildung 3), die für eine langfristige Ernährung der ektopen Zellverbände unverzichtbar ist.¹¹⁰ Dabei scheint Vascular Endothe-

¹⁰³ Vgl. Finas et al. 2004; Gazvani und Templeton 2002; Wu und Ho 2003.

¹⁰⁴ Vgl. Finas et al. 2004; Gazvani und Templeton 2002; Greb et al. 2002; Küpker et al. 1998; Mart nez-Rom n et al. 1997.

¹⁰⁵ Vgl. Wu und Ho 2003.

¹⁰⁶ Vgl. Finas et al. 2004; Greb et al. 2002.

¹⁰⁷ Vgl. Brosens 1999; Finas et al. 2004; Gazvani und Templeton 2002; Greb et al. 2002; Malik et al. 2002; Smith 1999; Wu und Ho 2003.

¹⁰⁸ Vgl. Finas et al. 2004; Gazvani und Templeton 2002; Küpker et al. 1998; Smith 1999; Wu und Ho 2003.

¹⁰⁹ Vgl. Greb et al. 2002; Mart nez-Rom n et al. 1997.

¹¹⁰ Vgl. Donnez et al. 1998; Malik et al. 2002.

lial Growth Factor (VEGF) eine entscheidende Rolle zu spielen.¹¹¹ Einerseits wird VEGF durch aktivierte Peritonealmakrophagen sezerniert, andererseits konnte eine verstärkte Expression im Endometrium (eutop und ektop) erkrankter Frauen nachgewiesen werden, worin ein erhöhtes Manifestationspotential zu sehen ist.¹¹² VEGF entfaltet seine neoangiogene Wirkung direkt am Endothel und steigert die Permeabilität der Gefäßwände.¹¹³ Bei der Neubildung von Blutgefäßen kommt es zum Zusammenspiel von VEGF mit dem Angiopoietinsystem.¹¹⁴ Angiopoietin 1 (Ang-1) führt durch die Anlagerung von Perizyten zur Stabilisierung von Kapillaren; Angiopoietin 2 (Ang-2) wirkt entgegengesetzt.¹¹⁵ Die Regulationsmechanismen aller drei Moleküle sind noch nicht abschließend aufgeklärt. Die Expression von VEGF soll durch Gonadotropine, Sexualsteroiden und unabhängig davon durch Hypoxie beeinflusst werden.¹¹⁶ Sowohl Gonadotropine als auch Steroide sollen einen Effekt auf die Ang-2/Ang-1-Ratio ausüben.¹¹⁷ Nachgewiesen ist, dass Östrogene die Angiogenese sowohl direkt als auch indirekt stimulieren.¹¹⁸

¹¹¹ Vgl. Augustin und Kuhn sen. 1999; Donnez et al. 1998; Hazzard et al. 1999; Kressin et al. 2002; Malik et al. 2002; Shifren et al. 1996.

¹¹² Vgl. Donnez et al. 1998; Gazvani und Templeton 2002; Malik et al. 2002; Shifren et al. 1996; Smith 1999; Wu und Ho 2003.

¹¹³ Vgl. Augustin und Kuhn sen. 1999; Donnez et al. 1998; Kressin et al. 2002.

¹¹⁴ Vgl. Kressin et al. 2002; Malik et al. 2002.

¹¹⁵ Vgl. Augustin und Kuhn sen. 1999; Hazzard et al. 1999; Kressin et al. 2002; Malik et al. 2002.

¹¹⁶ Vgl. Hazzard et al. 1999; Kressin et al. 2002; Shifren et al. 1996; Smith 1999.

¹¹⁷ Vgl. Hazzard et al. 1999; Kressin et al. 2002.

¹¹⁸ Vgl. Augustin und Kuhn sen. 1999; Shifren et al. 1996; Wu und Ho 2003.

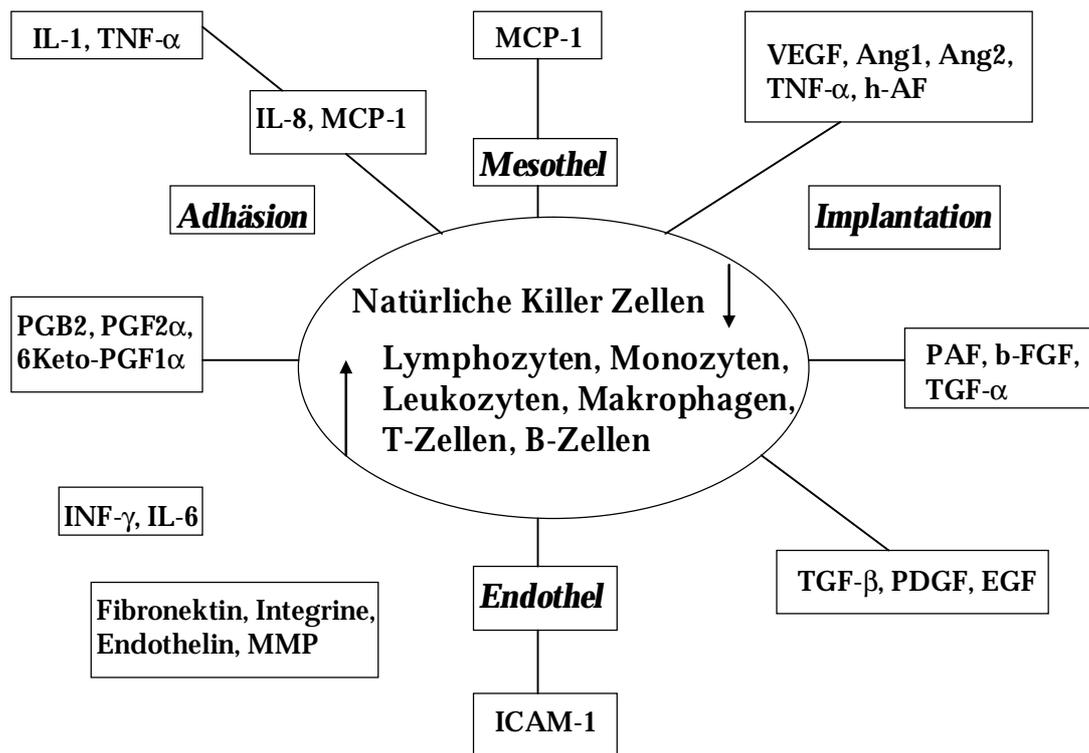


Abbildung 2: Immunmediatoren bei Endometriose (modifiziert nach Küpker et al. 1998, S. 722, Figure 3. und Finas et al. 2004, S. 119, Abb. 3)

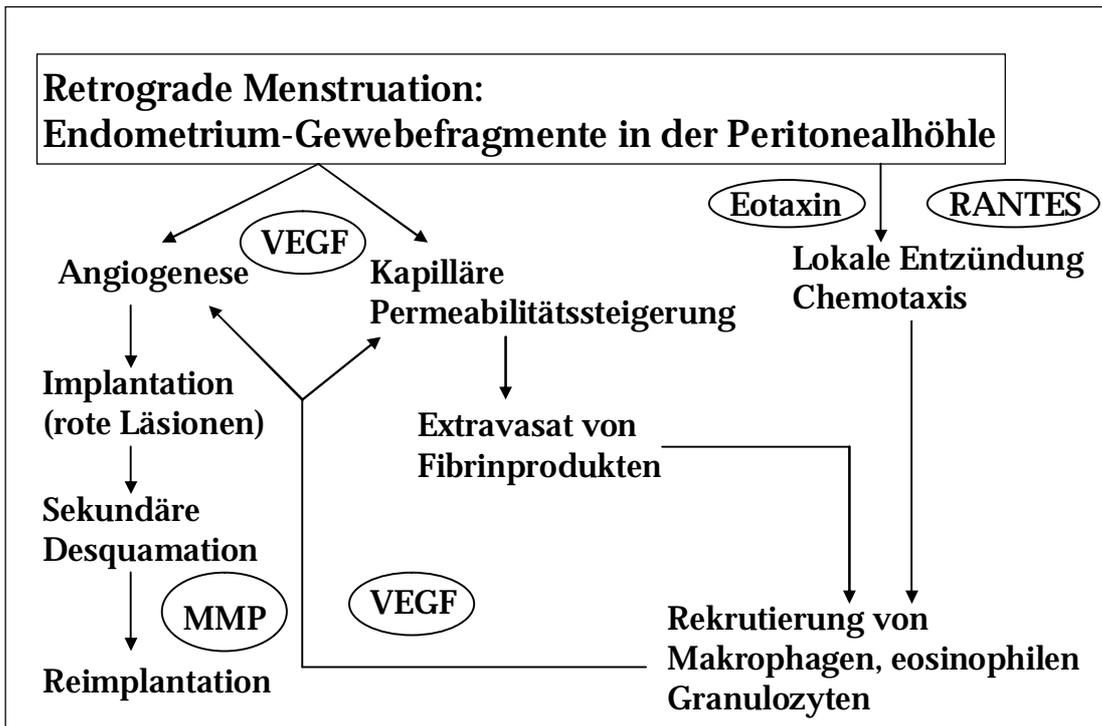


Abbildung 3: Interaktion von Immunsystem und Angiogenese (modifiziert nach Greb et al. 2002, S. 240, Abb. 2.)

Bisher waren morphologische Beschreibungen der Endometrioseherde durch eine subjektive Wahrnehmung uneinheitlich und schwer reproduzierbar.¹¹⁹ Sinnvoller erscheint nach derzeitigem Kenntnisstand eine Einteilung nach der Aktivität der Läsionen,¹²⁰ die sich an deren histologischem Aufbau und parakriner Sekretion messen lässt. Rote Endometrioseherde zeigen aktive glanduläre Bestandteile bei guter Vaskularisation, eine hohe Mitoserate und einen gesteigerten VEGF-Gehalt.¹²¹ Weiße Läsionen nehmen

¹¹⁹ Vgl. Brosens 1999; Malik et al. 2002.

¹²⁰ Vgl. Brosens 1999; Malik et al. 2002.

¹²¹ Vgl. Donnez et al. 1998; Malik et al. 2002; Schweppe 2002; Wu und Ho 2003.

eine Zwischenstufe ein, braune zeigen das Bild einer fortgeschrittenen wenig aktiven Endometriose.¹²²

c) Sterilität und Infertilität bei Endometriose

Lange Zeit wurde die Subfertilität der an Endometriose erkrankten Frauen allein durch die strukturell anatomischen Veränderungen im kleinen Becken erklärt. Jedoch treten fibröse Verwachsungen mit Tubenverschluss hauptsächlich in den fortgeschrittenen Stadien (III und IV) auf.¹²³ Somit lassen sich damit nicht die geringeren Schwangerschaftsraten bei IVF in den Anfangsstadien (I und II) begründen.¹²⁴ Auf der Suche nach den möglichen funktionellen Ursachen ergaben sich folgende Hinweise:¹²⁵

- Das Ovar befindet sich in einer immunologisch aktiven Zone. Schlechte Fertilisationsraten weisen auf eine verminderte Oocytenqualität.¹²⁶ Sowohl die Peritonealflüssigkeit als auch das Serum erkrankter infertiler Frauen haben eine embryotoxische Wirkung.¹²⁷ Aktivierte Peritonealmakrophagen vernichten Spermien.¹²⁸

¹²² Vgl. Donnez et al. 1998; Malik et al. 2002; Wu und Ho 2003.

¹²³ Vgl. Martínez-Román et al. 1997; Smith 1999.

¹²⁴ Vgl. Arici et al. 1996; Barnhart et al. 2002; Cahill und Hull 2000; Kao et al. 2003; Martínez-Román et al. 1997; Smith 1999.

¹²⁵ Vgl. Arici et al. 1996; Barnhart et al. 2002; Leyendecker et al. 1996; Martínez-Román et al. 1997; Schweppe 2002; Wu und Ho 2003.

¹²⁶ Vgl. Cahill und Hull 2000.

¹²⁷ Vgl. Martínez-Román et al. 1997; Smith 1999; Wu und Ho 2003.

¹²⁸ Vgl. Martínez-Román et al. 1997.

-
- Während des Implantationszeitraumes unterscheidet sich die Genexpression des eutopen Endometriums erkrankter Frauen von dem gesunder.¹²⁹ Insbesondere ist dessen Rezeptivität (Integrin $\alpha v \beta 3$)¹³⁰ verändert, wodurch eine geringere Konzeptionsrate und das Auftreten von Frühaborten erklärt werden kann.¹³¹
 - Die Hyper- und Dysperistaltik der Uterusmuskulatur führt zu ungerichtetem Spermientransport und behinderter Embryoimplantation.¹³²

Daneben besteht die Möglichkeit, dass die Sterilität nicht durch die Endometriose, sondern durch andere eigenständige pathophysiologische Veränderungen entstanden ist.¹³³ Es konnten geringfügige Unstimmigkeiten der endokrinen Regulation über die Hypothalamus-Hypophyse-Ovar-Achse festgestellt werden.¹³⁴ Dies stellt eine mögliche Erklärung dafür dar, dass auch Endometriose-Patientinnen zu den „low respondern“ (geringer Östrogenanstieg, geringe Oocytenausbeute) gehören.¹³⁵

¹²⁹ Vgl. Kao et al. 2003.

¹³⁰ Vgl. Wu und Ho 2003.

¹³¹ Vgl. Arici et al. 1996; Cahill und Hull 2000.

¹³² Vgl. Leyendecker et al. 1996.

¹³³ Vgl. Cahill und Hull 2000; Martínez-Román et al. 1997; Schweppe 2002.

¹³⁴ Vgl. Cahill und Hull 2000.

¹³⁵ Vgl. Barnhart et al. 2002; Cahill und Hull 2000; Strowitzki 1999.

d) Therapie

Die Wahl der geeigneten Therapieoption richtet sich in erster Linie nach dem primären Behandlungsgrund.¹³⁶ Während den Schmerzpatientinnen eine Vielzahl von medikamentösen Alternativen zur Verfügung stehen, konnten in der Kinderwunschbehandlung damit keine Erfolge erzielt werden.¹³⁷ Allerdings scheint die chirurgische Sanierung eine Verbesserung der Subfertilität zu erreichen.¹³⁸ Diskutiert wird auch der Nutzen einer ultralangen GnRH-Analoga-Therapie vor IVF.¹³⁹ Trotz aller zuvor genannten Einschränkungen (vgl. Abschnitt VI. B.2.c)) ist das IVF-Verfahren mit einer Schwangerschaftswahrscheinlichkeit von 25 % immer noch sehr effizient.¹⁴⁰ Auch bei Ovarialendometriomen oder nodulärer Endometriose wird der operative Eingriff mit anschließender Medikation empfohlen.¹⁴¹ Ziel jeglicher gegenwärtiger medikamentöser Therapieversuche ist eine Hypoöstrogenisierung mit andauernder Anovulation, da nach der Schwellenwerttheorie von Barbieri ein Östrogenwert von 40 pg/ml nicht überschritten werden darf, um die Endometriose zu bekämpfen.¹⁴² Dabei stellte der Einsatz von GnRH-Agonisten bislang den Goldstandard dar. Dieser kann aber nur über sechs Monate fortgeführt werden, da andernfalls neben postmenopausalen All-

¹³⁶ Vgl. Brucker 2004.

¹³⁷ Vgl. Brucker 2004; Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Schweppe 2002; Sillem und Teichmann 2003.

¹³⁸ Vgl. Brucker 2004; Koninckx und Barlow 1999; Küpker et al. 2002a.

¹³⁹ Vgl. Brucker 2004; Schweppe 2002.

¹⁴⁰ Vgl. Barnhart et al. 2002.

¹⁴¹ Vgl. Brucker 2004; Sillem und Teichmann 2003. Für genauere Angaben zu Nutzen und Technik der operativen Maßnahmen siehe Koninckx und Barlow 1999.

¹⁴² Vgl. Brucker 2004; Küpker et al. 2002a; Wülfing und Kiesel 2005.

gemeinsymptomen mit schwerwiegenden Folgen für die Knochenmineralisation (Osteopenie) und den Lipidstoffwechsel (vaskuläre Erkrankungen) zu rechnen ist.¹⁴³ Abhilfe soll hier eine Add-back-Therapie schaffen. Um einen normalen Knochenbau zu ermöglichen, sind jedoch Östrogenwerte von mindestens 60 pg/ml nötig.¹⁴⁴ Ein ähnlich gutes Wirkspektrum mit geringen Nebenwirkungen konnte bei der Verwendung von GnRH-Antagonisten gezeigt werden. Durch ihren speziellen Wirkmechanismus bleiben basale Östrogenspiegel um 50 pg/ml erhalten.¹⁴⁵ Zurzeit sind sie allerdings noch nicht für diesen Anwendungsbereich zugelassen. Alternativen stellen gestagenbetonte orale Kontrazeptiva,¹⁴⁶ Gestagene (zentrale Hemmung, Dezidualisierung, Hemmung von MMP)¹⁴⁷ sowie Danazol (Erhöhung des Testosteronspiegels, Endometriumatrophie)¹⁴⁸ dar. Auch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAR) haben in der Schmerztherapie ihren Platz, der durch neue Forschungsergebnisse (Hemmung der COX-2, vgl. Abschnitt VI. B.2.b)) untermauert wird.¹⁴⁹ Fraglich bleibt die mögliche Anwendung von spezifischen COX-2-Inhibitoren.¹⁵⁰ Geprüft wird, ob bereits aus anderen Bereichen bekannte Medikamente, wie Levonogestrel im IUP, TNF α -Antagonisten, Antigestagene, SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators)¹⁵¹ und SPRMs

¹⁴³ Vgl. Brucker 2004; Küpker et al. 2002a; Schweppe 2002.

¹⁴⁴ Vgl. Brucker 2004; Küpker et al. 2002a; Schweppe 2002.

¹⁴⁵ Vgl. Brucker 2004; Küpker et al. 2002a.

¹⁴⁶ Vgl. Brucker 2004; Küpker et al. 2002a.

¹⁴⁷ Vgl. Brucker 2004; Finas et al. 2004; Küpker et al. 2002a.

¹⁴⁸ Vgl. Brucker 2004.

¹⁴⁹ Vgl. Brucker 2004; Ebert und Starzinski-Powitz 2002.

¹⁵⁰ Vgl. Ebert und Starzinski-Powitz 2002.

¹⁵¹ Vgl. Küpker et al. 2002a.

(Selective Progesterone Receptor Modulators) weitere Vorteile erbringen können.¹⁵² Ein großer Fortschritt wird durch die Erforschung spezifischer Inhibitoren der Aromatase, MMP und Angiogenese erwartet (vgl. Abschnitt VI. B.2.b)).¹⁵³ Die viel versprechende Wirkung der Aromatase-Hemmer konnte bereits in Fallstudien nachgewiesen werden.¹⁵⁴ Durch ihr teratogenes, embryotoxisches Potential sind sie aber für die meisten jungen Frauen keine Lösung.¹⁵⁵ Einen neuen Ansatz stellt die Kombination von Aromatasehemmern und GnRH-Agonisten dar. Auch mit dem Angiogenesehemmer Angiostatin konnte im Mausmodell die Endometriose erfolgreich behandelt werden. Da sich eine systemische Gabe jedoch auf die Funktion des gesamten Reproduktionsapparates negativ auswirken kann, muss zunächst die Anwendbarkeit einer lokalen Therapie erforscht werden.¹⁵⁶ Noch immer gibt es keinen kurativen Ansatz zur Behandlung dieser Erkrankung.¹⁵⁷ Gefordert wird der Einsatz der verschiedenen Medikamente je nach Aktivität des Krankheitsprozesses.¹⁵⁸ Hierfür müssen zunächst geeignete, einfach zu eru-

¹⁵² Vgl. Finas et al. 2004.

¹⁵³ Vgl. Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Finas et al. 2004; Wülfing und Kiesel 2005.

¹⁵⁴ Vgl. Küpker et al. 2002a; Wülfing und Kiesel 2005.

¹⁵⁵ Vgl. Brucker 2004; Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Wülfing und Kiesel 2005.

¹⁵⁶ Vgl. Dabrosin et al. 2002; Finas et al. 2004.

¹⁵⁷ Vgl. Brucker 2004; Küpker et al. 2002a.

¹⁵⁸ Vgl. Malik et al. 2002; Schweppe 2002.

ierende Marker (Aromatase p450, TNF α , Proliferationsmarker Ki67) identifiziert werden.¹⁵⁹

C. Vorstellung der Kandidatengene

1. FOXO 3a

Zu der im menschlichen Genom konservierten Familie der Forkhead Transkriptionsfaktoren gehören außer FOXO 3a noch drei weitere Gene (FOXO 1, FOXO 4 und FOXO 6).¹⁶⁰ Die Aktivität von FOXO 3a wird maßgeblich vom Insulin-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signaltransduktionsweg bestimmt (vgl. Abbildung 4).¹⁶¹ Der second messenger PIP₃ (Phosphatidylinositoltrisphosphat) aktiviert Enzyme (PKB, PDK1), die ihrerseits FOXO 3a durch Phosphorylierung inaktivieren und ins Zytoplasma verschieben.¹⁶² Nach seiner Aktivierung wird FOXO 3a in den Zellkern transportiert und entfaltet dort seine Wirkung als Transkriptionsfaktor. Außer durch Behinderung der Proteinkinase B (PKB) kann FOXO 3a auch durch oxidativen Stress oder Nahrungsreduktion induziert werden.¹⁶³ An-

¹⁵⁹ Vgl. Ebert und Starzinski-Powitz 2002; Malik et al. 2002; Schweppe 2002.

¹⁶⁰ Vgl. Brunet et al. 2004; Castrillon et al. 2003; Hosaka et al. 2004; Jünger et al. 2003; Kops et al. 2002; Modur et al. 2002.

¹⁶¹ Vgl. Alvarez et al. 2001; Brunet et al. 2004; Castrillon et al. 2003; Essers et al. 2005; Hosaka et al. 2004; Hsu et al. 2003; Jünger et al. 2003; Kops et al. 2002; Modur et al. 2002; Tran et al. 2002.

¹⁶² Vgl. Essers et al. 2005; Hosaka et al. 2004; Jünger et al. 2003; Modur et al. 2002; Nemoto und Finkel 2002.

¹⁶³ Vgl. Essers et al. 2005; Jünger et al. 2003; Hwangbo et al. 2004; Nemoto et al. 2004; Nemoto und Finkel 2002; Kops et al. 2002.

hand von Modellen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) werden mögliche Effektor-Gene (vgl. Tabelle 3) und vielfältige Regulationsverbindungen (SIRT1, p53, p66shc, PTEN, β -Catenin) von FOXO 3a gesucht und erforscht.¹⁶⁴

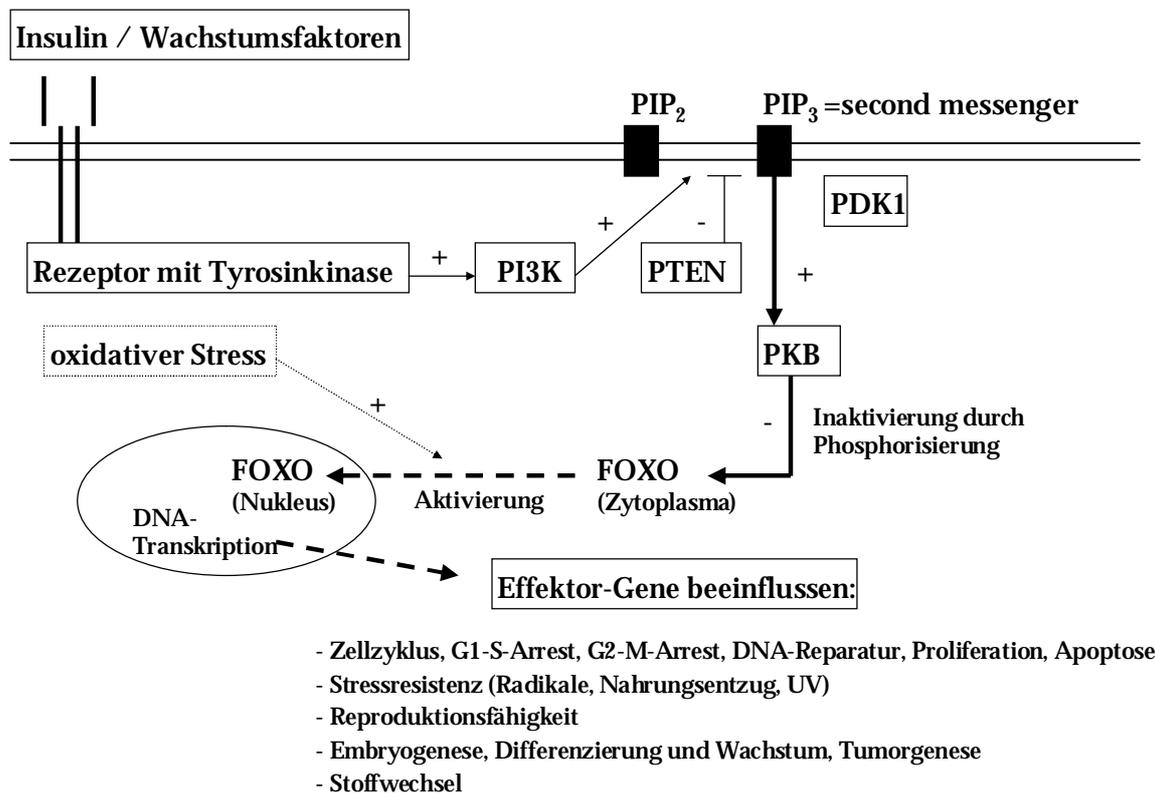


Abbildung 4: Regulationsmechanismen um FOXO 3a (angelehnt an Jünger et al. 2003, S. 20.14, Figure 7)

¹⁶⁴

Vgl. Alvarez et al. 2001; Brunet et al. 2004; Essers et al. 2005; Jünger et al. 2003; Modur et al. 2002; Nemoto et al. 2004; Nemoto und Finkel 2002; Tran et al. 2002.

Identifizierte Effektor-Gene von FOXO 3a (Auszug)	
Funktionsbereich	Gen
DNA- Reparatur	GADD45
	PA26
	DNA Polymerase Iota
Antioxidantien	Selenoprotein P
	MnSOD
	CYT P450
Zellzyklus	Wip1
	EXT1
	Cyclin G2
	Cyclin B
	p27KIP1
	Plk
	CG 3799
	centaurin gamma
Zelltod	Legumain
	NIP3
	Fas Ligand
	BIM
	TRAIL
	DAP1
	bcl-2
	SMAD4
	Cbp 300/p300
	GTF II
Transkription und Translation, Signaling	SATB1
	Jak1
	p90 S6
	d4E
	CDK8

Tabelle 3: Identifizierte Effektor-Gene von FOXO 3a nach Expressionsstudien¹⁶⁵

¹⁶⁵ Vgl. Alvarez et al. 2001; Brunet et al. 2004; Jünger et al. 2003; Kops et al. 2002; Modur et al. 2002; Tran et al. 2002.

Eine bedeutende Rolle kommt FOXO 3a bei der Kontrolle des Zellzyklus zu.¹⁶⁶ Sowohl am Checkpoint G1-S als auch am Übergang G2-M kann FOXO 3a einen Zellarrest (p27/KIP1) hervorrufen und somit DNA-Reparaturmechanismen (GADD45) unterstützen und Proliferations- oder Apoptosevorgänge einleiten.¹⁶⁷ Zudem vermittelt es suffiziente Reaktionen auf verschiedenste Stressoren, wie oxidative Radikale (MnSOD), UV-Strahlung (GADD45) und Nahrungsentzug.¹⁶⁸ Von besonderem Interesse bei der Frage der Sterilität sind jedoch die Erkenntnisse zweier Arbeitsgruppen, die die Veränderungen bei FOXO 3a -/- Knockout Mäusen untersuchten. Anfangs gab es keine offensichtlichen Unterschiede zu normalen Mäusen; alle waren gesund und fertil.¹⁶⁹ Im weiteren Verlauf kam es in den FOXO 3a -/- Mäusen zu einer Hyperaktivierung der Ovarfunktion. Histologisch fand man sehr viele aktivierte Primär- und Sekundärfollikel, sowie eine erhöhte Anzahl von Follikeln in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien bei insgesamt vergrößerten Ovarien vor.¹⁷⁰ Anschließend folgte eine Regressionsphase mit deutlichen Atresiezeichen. Die Anzahl der noch vorhandenen Primordialfollikel war stark reduziert und das Ovarvolumen nahm ab. Schließlich ging der fortschreitende Prozess in eine vorzeitige ovarielle Erschöpfung über.¹⁷¹ Ebenso wie beim Krankheitsbild POF konnten bei den Mäusen erhöhte

¹⁶⁶ Vgl. Hosaka et al. 2004; Jünger et al. 2003.

¹⁶⁷ Vgl. Alvarez et al. 2001; Brunet et al. 2004; Kops et al. 2002; Nemoto und Finkel 2002; Tran et al. 2002.

¹⁶⁸ Vgl. Brunet et al. 2004; Essers et al. 2005; Hosaka et al. 2004; Hsu et al. 2003; Hwangbo et al. 2004; Jünger et al. 2003; Kops et al. 2002; Nemoto und Finkel 2002; Tran et al. 2002.

¹⁶⁹ Vgl. Castrillon et al. 2003; Hosaka et al. 2004.

¹⁷⁰ Vgl. Castrillon et al. 2003; Hosaka et al. 2004.

¹⁷¹ Vgl. Castrillon et al. 2003; Hosaka et al. 2004.

FSH- und LH-Spiegel festgestellt werden. Der Menstruationszyklus der Tiere war zunächst unregelmäßig und versiegte anschließend völlig.¹⁷² Diese Daten belegen die Bedeutung von FOXO 3a bei der Rekrutierung und Suppression der folliculären Reserve im Ovar.¹⁷³ Die Auswirkungen einer genetischen Veränderung in der Expression von FOXO 3a bei Endometriose wurden bisher kaum beleuchtet. Vorstellbar sind Prozesse wie sie heute in der Tumorgenese diskutiert werden. Eine geringere Induktion bestimmter proapoptotischer FOXO 3a Effektor-Gene (z. B. TRAIL) würde das pathologische Überleben von Zellen unterstützen.¹⁷⁴ Zuletzt wurden auch mögliche Querverbindungen zu Regelkreisen des Immunsystems (z. B. IFN, JAK-STAT, TNF α) aufgezeigt.¹⁷⁵ Die oben beschriebenen Veränderungen im Ovar bei FOXO 3a Verlust könnten die gemeinsame Problematik von POF- und Endometriose-Patientinnen in der IVF-Behandlung als „low responder“ erklären.

2. STAT 3

Die Genfamilie der STAT-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription) besteht aus sieben Mitgliedern (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6), deren Expression im Organismus weit verbreitet ist. Sie erfüllen vielfältige Aufgaben in den Bereichen Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Zellüberleben und Inflammation. Dabei wird ihre Aktivität

¹⁷² Vgl. Castrillon et al. 2003.

¹⁷³ Vgl. Castrillon et al. 2003; Hosaka et al. 2004.

¹⁷⁴ Vgl. Modur et al. 2002.

¹⁷⁵ Vgl. Modur et al. 2002.

durch eine große Anzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst.¹⁷⁶ Diese Liganden binden an verschiedene Oberflächenrezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase (EGF, PDGF, CSF-1) oder Verbindung zum Janus-Kinase (JAK)-System (IFN- α , - β , - γ , IL-2, -3, -4, -5, -6, -7, -10, -11, -12, -13, -15, Prolaktin, Thrombopoietin, GF, Leptin). Die so im Zytoplasma phosphorylierten STAT-Moleküle bilden homogene oder heterogene Dimere und wandern in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktoren zu wirken.¹⁷⁷ Bei der Inaktivierung spielen wahrscheinlich Dephosphorylasen und Proteasen eine Rolle.¹⁷⁸ STAT 3 im Speziellen kann sowohl über eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) als auch über den IL-6 Transduktionsweg induziert werden (vgl. Abbildung 5). Bisher konnten STAT 3-Reaktionen auf IL-6-Zytokine, GCSF, EGF, IFN, Leptin, IL-2, IL-10, IL-12, LIF, CNTF und Oncostatin M nachgewiesen werden.¹⁷⁹ Daraufhin bilden sich homogene STAT 3-3 oder heterogene STAT 3-1 Dimere.¹⁸⁰ Von STAT 3 liegen zwei Splicevarianten, das längere STAT 3 α und das kürzere STAT 3 β , vor. STAT 3 β hat dabei nicht nur die Aufgabe eines dominanten hemmenden Faktors, sondern

¹⁷⁶ Vgl. Betz et al. 2001; Bowman et al. 2000; Chapman et al. 1999; Darnell Jr. 1997; Igaz et al. 2001; Ihle 2001; Liu et al. 1998; Subramaniam et al. 2001; Takeda et al. 1998; Turkson und Jove 2000; Welte et al. 2003.

¹⁷⁷ Vgl. Arora et al. 2003; Bowman et al. 2000; Chan et al. 2004; Chapman et al. 1999; Chung et al. 1997; Darnell Jr. 1997; Igaz et al. 2001; Ihle 2001; Jenab und Morris 1996; Jenab und Morris 1997; Jenab und Morris 1998; Liu et al. 1998; Maritano et al. 2004; Pfeffer et al. 1997; Subramaniam et al. 2001; Takeda et al. 1997; Takeda et al. 1998; Turkson und Jove 2000; Welte et al. 2003; Yuang et al. 2005.

¹⁷⁸ Vgl. Darnell Jr. 1997; Subramaniam et al. 2001.

¹⁷⁹ Vgl. Chung et al. 1997; Darnell Jr. 1997; Ihle 2001; Jenab und Morris 1998; Maritano et al. 2004; Takeda et al. 1997; Takeda et al. 1998; Welte et al. 2003; Yoo et al. 2002; Yuang et al. 2005.

¹⁸⁰ Vgl. Chung et al. 1997; Darnell Jr. 1997.

auch selbstständige Funktionen und Effektor-Gene hauptsächlich im immunologischen Bereich.¹⁸¹

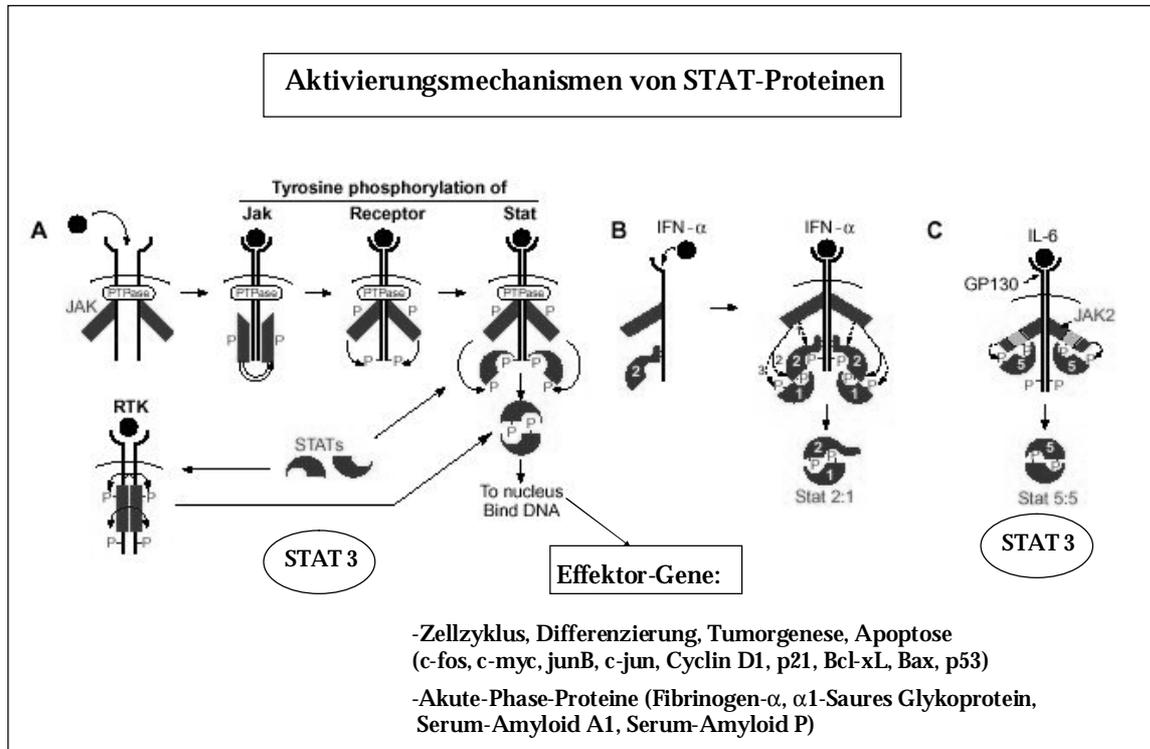


Abbildung 5: Wege der Aktivierung von STAT-Proteinen (modifiziert nach Darnell Jr. 1997, S. 1631, Fig. 2)

Welche genaue Wirkung eine STAT 3 Aktivierung ausübt, hängt maßgeblich von dem entsprechenden Gewebe, dessen Rezeptorausstattung und gleichzeitig parakrin einwirkenden Substanzen ab. So konnten sowohl proapoptische als auch entgegengesetzte antiapoptische Veränderungen in

¹⁸¹

Vgl. Ihle 2001; Maritano et al. 2004; Yoo et al. 2002.

verschiedenen Zelltypen nachvollzogen werden.¹⁸² Um die Bedeutung der STAT-Proteine in vivo zu ergründen, wurden Untersuchungen an Knock-out Mäusen durchgeführt. STAT 3 defiziente Embryonen versterben noch vor dem Gastrulationsstadium.¹⁸³ Auffällig war eine polarisierte Verteilung von STAT 3-Molekülen während der embryonalen Entwicklungsphasen vor der Implantation.¹⁸⁴ In der Folge wurden Tiere mit spezifischen STAT 3 inaktivierten Geweben gezüchtet und deren reaktive Veränderungen erfasst. Erschwert wird die Deutung von neuen Erkenntnissen durch die multiplen Querverbindungen mit weiteren Transduktionswegen (PI3K), Transkriptionsfaktoren (c-jun, SP1, c-fos, SRF, TCF, AP1, CREB), Enzymen (CBP/p300, HDAC) und potenziellen Cofaktoren (p85, IFNAR, BRCA 1, MCM).¹⁸⁵ Trotzdem konnten bestimmte STAT 3 Effektor-Gene zum einen bei der Akuten-Phase-Reaktion, zum anderen bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation identifiziert werden (vgl. Abbildung 5).¹⁸⁶ Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem unterliegen einer starken Steuerungsfunktion durch STAT 3:¹⁸⁷

¹⁸² Vgl. Bowman et al. 2000; Chapman et al. 1999; Darnell Jr. 1997; Igaz et al. 2001; Ihle 2001; Maritano et al. 2004; Russel und Richards 1999; Takeda et al. 1997; Yuang et al. 2005.

¹⁸³ Vgl. Bowman et al. 2000; Chung et al. 1997; Darnell Jr. 1997; Igaz et al. 2001; Ihle 2001; Maritano et al. 2004; Subramaniam et al. 2001; Takeda et al. 1998; Turkson und Jove 2000; Yoo et al. 2002.

¹⁸⁴ Vgl. Antczak und Blerkom 1997.

¹⁸⁵ Vgl. Bowman et al. 2000; Darnell Jr. 1997; Igaz et al. 2001; Jenab und Morris 1996; Pfeffer et al. 1997; Subramaniam et al. 2001; Yuang et al. 2005.

¹⁸⁶ Vgl. Bowman et al. 2000; Chan et al. 2004; Chapman et al. 1999; Jenab und Morris 1997; Jenab und Morris 1998; Maritano et al. 2004; Takeda et al. 1998; Turkson und Jove 2000; Yoo et al. 2002; Yuang et al. 2005.

¹⁸⁷ Vgl. Chapman et al. 1999; Ihle 2001; Maritano et al. 2004; Takeda et al. 1998; Turkson und Jove 2000; Welte et al. 2003; Wang et al. 2004; Yoo et al. 2002.

-
- Für das Überleben von T-Lymphozyten und deren adäquater Immunantwort ist die intakte STAT 3 Expression unumgänglich.
 - In dendritischen-antigenrepräsentierenden Zellen ist es für eine normal entwickelte T-Zell-Toleranz notwendig.
 - Eine STAT 3 Deletion im Knochenmark verursacht eine übermäßige Vermehrung und Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulocyten. Die antiinflammatorische Immunantwort auf IL-10 ist gestört, die Abwehrkraft gegen Endotoxine eingeschränkt.
 - STAT-spezifische Defekte scheinen eine Rolle bei verschiedenen Krankheitsprozessen, wie z. B. Morbus Crohn, Asthma bronchiale, rheumatoide Arthritis und Immundefektsyndromen zu spielen.

Unter physiologischen Bedingungen beeinflusst STAT 3 das Zellwachstum und scheint oft nötig, um Apoptosevorgänge zu verhindern.¹⁸⁸ Durch eine kontinuierliche Expression, induziert durch unterschiedliche Onkogene (v-Src, v-Fps, Lck, Etk/BMX), kann es maßgeblich bei der Entstehung und Erhaltung epithelialer und hämatopoietischer maligner Neoplasien beteiligt sein.¹⁸⁹ Dafür sind folgende Mechanismen, die auf ähnliche Weise auch in Endometrioseherden denkbar sind, verantwortlich:¹⁹⁰

- Die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen als humorale Antwort der Gewebszellen ist gestört.
- Dadurch wird eine angemessene Migration von phagozytierenden und humoralen Immunzellen beeinträchtigt.

¹⁸⁸ Vgl. Chan et al. 2004; Takeda et al. 1998; Welte et al. 2003; Wang et al. 2004.

¹⁸⁹ Vgl. Bowman et al. 2000; Chan et al. 2004; Igaz et al. 2001; Ihle 2001; Subramaniam et al. 2001; Takeda et al. 1998; Turkson und Jove 2000; Wang et al. 2004.

¹⁹⁰ Vgl. Wang et al. 2004.

-
- Das tumoröse Gewebe präsentiert veränderte Antigenmuster, um spezifischen T-Zellen zu entgehen.
 - Transformierte Zellen sind in der Lage Stoffe zu bilden, die eine ungestörte Ausreifung von dendritischen-antigenrepräsentierenden Zellen verhindern.

Prolaktin und Leptin können beide über ihre Rezeptoren STAT-Proteine im Ovar aktivieren.¹⁹¹ Bei Hormoninaktivierung oder Rezeptordefekten kommt es neben anderen Auffälligkeiten zur Sterilität der Tiere.¹⁹² Leptin wird in Granulosazellen exprimiert und kann in Oocyten STAT 3 phosphorylieren und so möglicherweise entscheidend in den Reproduktionszyklus eingreifen.¹⁹³ Bei s/s Mäusen (Verbindungsweg von Leptin über STAT 3 ist unterbrochen) sind Anatomie und Funktion der Ovarien nicht verändert. Dies ist ein Hinweis auf die Unabhängigkeit der leptinassozierten Sterilität vom STAT 3-Transduktionsweg.¹⁹⁴ STAT 3 findet sich je nach Differenzierungsgrad der Follikel in unterschiedlicher Menge in den Granulosazellen des Ovars. In kleinen unreifen oder apoptotischen Follikeln ist es im Gegensatz zu präovulatorischen Stadien vermehrt aktiviert.¹⁹⁵ Diese Veränderungen verlaufen unabhängig von Prolaktin,¹⁹⁶ während FSH und Östradiol eine hemmende Wirkung auf die STAT 3-DNA-Bindung ausüben.¹⁹⁷ Die Sup-

¹⁹¹ Vgl. Antczak und Blerkom 1997; Matsuoka et al. 1999; Russel und Richards 1999.

¹⁹² Vgl. Antczak und Blerkom 1997; Bates et al. 2003; Matsuoka et al. 1999; Russell und Richards 1999.

¹⁹³ Vgl. Antczak und Blerkom 1997; Matsuoka et al. 1999.

¹⁹⁴ Vgl. Bates et al. 2003.

¹⁹⁵ Vgl. Russel und Richards 1999.

¹⁹⁶ Vgl. Russel und Richards 1999.

¹⁹⁷ Vgl. Russel und Richards 1999.

pression von STAT 3 kann als gonadotropin- und steroidgesteuertes Mittel zur Wachstums- und Differenzierungskontrolle von Follikeln gedeutet werden. Zudem nimmt in physiologisch wachsenden Follikeln der STAT 3-Gehalt stetig ab.¹⁹⁸ Im Hinblick auf eine verminderte ovarielle Reserve steht der Zusammenhang von aktiviertem STAT 3 zu Atresievorgängen im Ovar im Mittelpunkt des Interesses.¹⁹⁹

3. PIAS X

Auf den JAK-STAT-Transduktionsweg wirkt eine Vielzahl an hemmenden Faktoren ein (vgl. Abbildung 6). Neben den schon erwähnten Phosphatasen (SHP-1, SHP-2)²⁰⁰ zählt dazu auch eine Gruppe von zytokin-induzierbaren Proteinen (CIS, SOCS, SSI, JAB), deren Expression von STAT-Dimeren gefördert wird und so einem negativen Feedback-Mechanismus unterliegt.²⁰¹ Unabhängig davon agiert die aus bisher vier Mitgliedern (PIAS 1, PIAS 3, PIAS γ , PIAS χ) bestehende PIAS-Familie.²⁰² Diese konstitutiv im Zellkern vorhandenen Proteine funktionieren pufferähnlich.²⁰³ Für PIAS 1 und PIAS 3 konnte bereits ihre Spezifität gegenüber STAT 1 und STAT 3 nachgewiesen

¹⁹⁸ Vgl. Russel und Richards 1999.

¹⁹⁹ Vgl. Russel und Richards 1999.

²⁰⁰ Vgl. Arora et al. 2003; Betz et al. 2001; Igaz et al. 2001; Liu et al. 1998; Russel und Richards 1999.

²⁰¹ Vgl. Betz et al. 2001; Chung et al. 1997; Igaz et al. 2001; Liu et al. 1998.

²⁰² Vgl. Arora et al. 2003; Betz et al. 2001; Liu et al. 1998; Liu und Shuai 2001; Moilanen et al. 1999.

²⁰³ Vgl. Arora et al. 2003; Igaz et al. 2001.

werden.²⁰⁴ PIAS-Moleküle entfalten ihre Wirkung an aktivierten phosphorylierten STAT-Dimeren und verhindern deren DNA-Bindung und nachfolgende Transkription entsprechender Gene.²⁰⁵

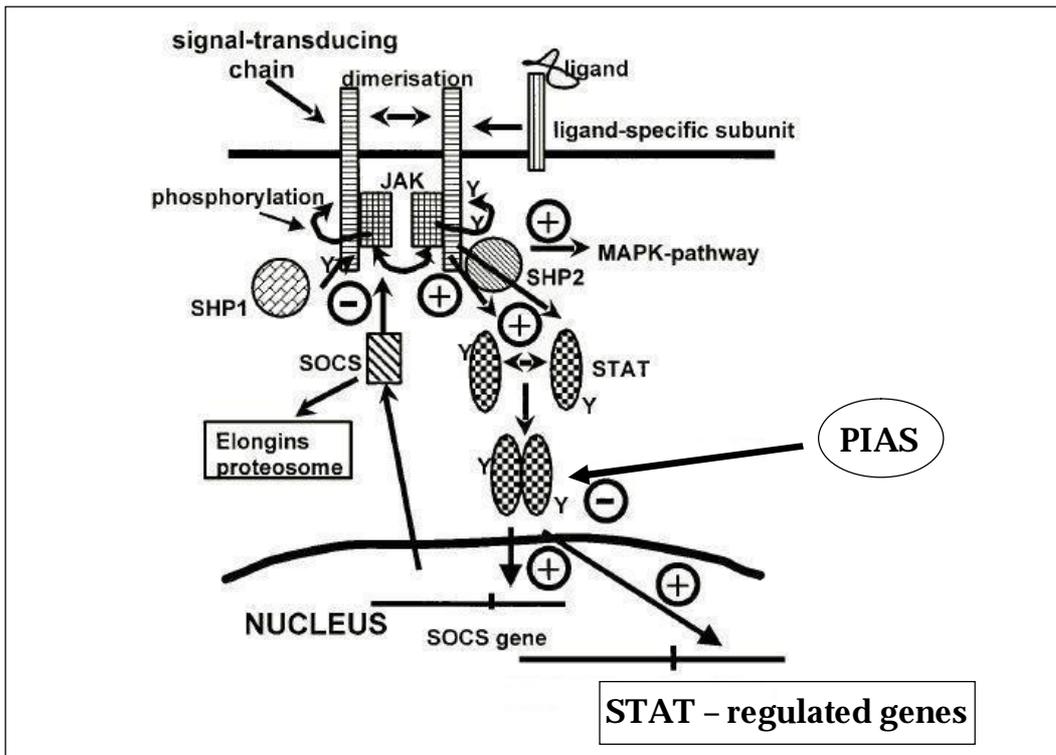


Abbildung 6: Hemmende Einflüsse auf die STAT-Aktivierung (modifiziert nach Igaz et al. 2001, S. 436, Fig. 1)

Sie greifen auf diese Weise indirekt in die STAT-abhängige Regulation von Zellwachstum und -differenzierung ein und gelten in diesem Zusammenhang als Tumorsuppressoren.²⁰⁶ Durch ihre besondere molekulare Struktur

²⁰⁴ Vgl. Betz et al. 2001; Chung et al. 1997; Liu et al. 1998; Liu und Shuai 2001; Moilanen et al. 1999.

²⁰⁵ Vgl. Liu et al. 1998; Liu und Shuai 2001; Moilanen et al. 1999.

²⁰⁶ Vgl. Betz et al. 2001.

(Zinkfinger-Proteine) sind sie vermutlich in der Lage, selbstständig Gene zu aktivieren und Zellprozesse zu beeinflussen.²⁰⁷ Für alle PIAS-Mitglieder konnte eine STAT-unabhängige proapoptische Ausrichtung, wenn auch in verschiedenen Ausmaßen, gezeigt werden.²⁰⁸ Im Ovar allerdings scheint PIAS 3 nötig, um eine Follikelatresie zu verhindern.²⁰⁹ Die Rolle von PIAS X im Organismus ist immer noch weitgehend unklar.²¹⁰ Microarray-Untersuchungen ergaben Veränderungen in der Expression von PIAS X in erkrankten Ovarien.²¹¹ Weitere Hinweise deuten auf PIAS X als spezifischen Inhibitor von STAT 4 nach IL-12 Kontakt.²¹² Im OMIM-Register (NCBI) wird es derzeit jedoch als Protein Inhibitor of Activated STAT 2 geführt. In Rattenhoden wurde ein Protein (ARIP 3) nachgewiesen, das wahrscheinlich PIAS X α entspricht und als Teil von Multienzymkomplexen Genregulationsmechanismen beeinflusst.²¹³

²⁰⁷ Vgl. Chung et al. 1997; Liu et al. 1998; Moilanen et al. 1999.

²⁰⁸ Vgl. Liu und Shuai 2001.

²⁰⁹ Vgl. Russel und Richards 1999.

²¹⁰ Vgl. Arora et al. 2003; Liu und Shuai 2001.

²¹¹ Microarray-Untersuchungen in Kooperation mit der Schering Deutschland GmbH, Berlin; Daten werden an anderer Stelle veröffentlicht.

²¹² Vgl. Arora et al. 2003.

²¹³ Vgl. Moilanen et al. 1999.

VII. Zweiter Teil: Materialien und Methoden

A. Grundlegendes

1. Überlegung zur Vorgehensweise

Die durch Mikroarray-Analyse (Schering Deutschland GmbH, Berlin) und verschiedene Mausmodelle gewonnenen Hinweise über die Kandidatengene FOXO 3a, STAT 3 und PIAS X sollten anhand von quantitativen Expressionsstudien verifiziert werden. Dazu wurden zunächst Gewebeproben von Patientinnen mit POF oder Endometriose und „gesunden“ Probandinnen zusammengetragen. Diese Gruppe der Kontrollen (gesunde Ovarien, 19 Proben) rekrutierte sich aus intraoperativ unauffällig dargestellten Anteilen nach Ovarienentfernung/PE bei:

- Mamma-Ca/Endometrium-Ca,
- benigne Ovarialzyste,
- Zyst-/adeno-/fibrom,
- Hysterektomie mit Adnexen bei Uterus myomatosus und postmenopausalen Blutungen,
- Teratom,
- Transsexualität.

In der klinisch diagnostizierten POF-Gruppe (< 40. LJ, FSH-Erhöhung wiederholt > 40 IE/l, Sonographie) gab es vier Proben. Die zehn Proben der Endometriose-Patientinnen (Endometriosis genitalis externa, Endometriosis extragenitalis) stammten aus makroskopisch unauffälligen Anteilen des Ovars. Am Ende der Untersuchung soll eine quantitative Aussage über die differentielle Expression der Kandidatengene des Patientinnenkollektivs im Vergleich zur Kontrollgruppe getroffen werden. Dazu musste die Anzahl

der Kopien der mRNA des jeweiligen Gens in einem bestimmten Volumen mittels Real-Time PCR bestimmt werden.

2. Allgemein benötigte Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien

In den anschließenden Tabellen sind Materialien aufgeführt, die bei mehreren Arbeitsschritten benötigt wurden und zum allgemeinen Laborbedarf gehören. Sie werden in den nachstehenden Abschnitten nicht einzeln aufgeführt.

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Mikro 22R Zentrifuge und Universal 32 Zentrifuge	Hettich, BRD
Pipetten Typ Research & Reference	Eppendorf AG, BRD
Pipetboy acu	IBS, BRD
pipetus akku	Hirschmann, BRD
Vortex Reax 2000	Heidolph, BRD
Vortex Genie 7	Scientific Industries, INC Bohemia, USA

Tabelle 4: Laborgeräte

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
2 ml Reaktionsgefäße biopur	Eppendorf AG, BRD
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, BRD
Multiply µStripPro 0,2 ml-4erKette	Sarstedt, BRD
Vinyl 2000PF Einmalhandschuhe	Meditrade, BRD
NitraTex powder free	Ansell GmbH, BRD
Biosphere Filter Tips (10, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt, BRD
PP Röhrchen 50 ml steril	Greiner, BRD
Stabpipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt, BRD
Parafilm	American National Can, USA
ep T.I.P.S. Filter 0,1-10 µl S	Eppendorf A, BRD

Tabelle 5: Verbrauchsartikel

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
DEPC Serra	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, BRD
HPLC	Merck KGaA, BRD
Ethanol	Merck KGaA, BRD

Tabelle 6: Laborchemikalien

B. RNA Extraktion

1. Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Abluftanlage	Köttermann, BRD
Ultra-Turax T25	Jahnke&Kunkel, IKA Labortechnik, BRD
Biofuge fresco	Heraeus, BRD
Photometer Typ Helios gamma	Unicam, USA
Präzisionsküvette	Hellma, BRD
Drucker EPSON LQ-300	
UF85-360T (-80 °C)	Colora Messtechnik GmbH, BRD

Tabelle 7: Gerätebedarf für die RNA Extraktion

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
disposable scalpel No. 22 feather	pfm AG, Köln, BRD
Tissue culture plate 6-well fall bottom with lid, steril	Sarstedt, USA

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien zur RNA Extraktion

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, BRD
2-Mercaptoethanol	Serva, Boehring Ingelheim Bioproducts Partnership, BRD
RNase-Free DNase Set	Qiagen, BRD
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, BRD

Tabelle 9: Reagenzien für die RNA Extraktion

2. Methodik

Die verwendeten Ovarialgewebe waren zum Großteil in flüssigem Stickstoff bei -180 °C gefroren. Während des Prozesses hinzukommende Gewebeproben aus dem Operationssaal wurden direkt in RNAlater überführt und weiterverarbeitet. Nach dem Zuschneiden der Gewebestücke ($< 0,5\text{ cm}$ Dicke, ca. 20 bis 30 mg) erfolgte die Homogenisierung in RLT Puffer (pro 1 ml RLT Puffer je $10\text{ }\mu\text{l}$ β -ME addiert) mit dem Rotorstab über einige Sekunden. Bei Zerkleinerung mehrerer Proben nacheinander wurde der Rotorstab dazwischen mit DEPC Wasser zweifach gespült. Anschließend erfolgte die Überführung der Probe in ein Reaktionsgefäß und die Zentrifugation (3 min bei 13.000 rpm). Nach Abpipettieren des Überstands und Mischung mit Ethanol wurde die Probe auf die Eluationssäule gegeben und ein weiteres Mal (ggf. in zwei Fraktionen) zentrifugiert (15 s bei 10.000 rpm). Daraufhin fand der erste Waschgang mit RW1 Puffer statt (15 s bei 10.000 rpm). Es schloss sich eine fünfzehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur mit DNase (Stammlösung + RDD Puffer) an. Der zweite Waschgang mit RW1 Puffer (15 s bei 10.000 rpm) und zwei weitere Waschgänge mit RPE Puffer folgten (15 s bei 10.000 rpm, 2 min bei 10.000 rpm). Im Anschluss wurde die Säule über eine Minute bei 13.000 rpm getrocknet und die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert (1 min bei 10.000 rpm). Die Proben wurden auf Eis zwischengelagert. Zur Ermittlung der Reinheit und der erhaltenen RNA-Menge war es notwendig, 1:50 Verdünnungen mit HPLC Wasser herzustellen und anschließend photometrisch auszuwerten. Proben mit einer unzureichenden Reinheit ($< 1,500$) oder Menge ($< 0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden verworfen (A). Die gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwertung bei -80 °C aufbewahrt.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge in μl</i>
RLT Puffer	650
Ethanol	600
RW 1 Puffer	350 x 2
DNase I Stammlösung	10
RDD Puffer	70
RPE Puffer	500 x 2
RNase freies Wasser	30

Tabelle 10: Ansatz für die RNA Extraktion einer Probe

C. cDNA Synthese

1. Geräte, Reagenzien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
PTC-200 Petier Thermal Cycler	MJ Research, USA
Oligo (dT) 12-18 Primer (0,5 μ g/ μ l)	Invitrogen GmbH, BRD
Desoxynucleotide Solution Mix, 10mM each dNTP	NEB, USA
RNaseOUT Recombinant	Invitrogen GmbH, BRD
Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)	
SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, BRD

Tabelle 11: Geräte und Reagenzien für die cDNA Synthese

2. Methodik

Die RNA Proben und alle weiteren Reagenzien (vgl. Tabelle 12) lagerten zunächst auf Eis, um ein langsames Auftauen zu gewährleisten. Entsprechend der photometrisch ermittelten RNA-Konzentration in μ g/ μ l war es zunächst nötig, für alle Proben die benötigten Volumina zu berechnen, um 1 μ g RNA einsetzen zu können (vgl. Anhang XII. A.). Daraufhin wurden

Oligo(dT)Primer, RNA, dNTP und ein entsprechender Teil HPLC Wasser zusammenpipettiert und für fünf Minuten in einem PCR Cycler auf 65 °C erwärmt. Anschließend wurden First-Strand Puffer, DTT und RNaseOUT dazugegeben, die Probe kurz zentrifugiert und wiederum erwärmt (42 °C über 2 min). Nach Zugabe von SuperScriptII RT lief die eigentliche Reaktion 50 min bei 42 °C ab. Zur Inaktivierung wurden die Proben für 15 min auf 70 °C erhitzt. Zwischen den einzelnen Protokollschritten verblieben die Proben ständig auf Eis. Einzelne Negativkontrollen ohne SuperScriptII RT bzw. ohne RNA wurden mitgeführt. Allerdings war dies aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden RNA-Menge nicht für alle Proben möglich. Eine Positivkontrolle lag in Form einer gekauften getesteten RNA (total RNA human ovary, BioChain Institute Inc., USA) ebenfalls vor. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Reagenz	Menge in μl (Summe 20 μl)
Oligo(dT)12-18 (500 μ g/ml)	1
dNTP Mix (10 mM each)	1
RNA	entsprechend 1 μ g
HPLC Wasser	auffüllend auf 12 μ l
5x First Strand Buffer	4
0.1 M DTT	2
RNaseOUT (40 U/ μ l)	1
SuperScriptII RT	1

Tabelle 12: Ansatz für die cDNA Synthese einer Probe

D. Qualitative konservative PCR

1. Geräte, Reagenzien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
T personal (PCR Maschine)	Biometra, BRD
clean air Werkbank	BRD
taq DNA Polymerase(5000 U/ml)	NEB, USA
ThermoPol Buffer 10x	NEB, USA
Deoxynucleotide Solution Mix, (10 mM each dNTP)	NEB, USA

Tabelle 13: Geräte und Reagenzien für die konservative PCR

2. Methodik

Mithilfe der konservativen PCR und der anschließenden Gelelektrophorese sollte der Erfolg der cDNA Synthese überprüft werden. Die PCR Kettenreaktion dient der enzymatischen exponentiellen Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen aus kleinen Mengen vorhandener DNA²¹⁴. Um die dafür benötigten Oligonucleotid-Primer generieren zu können, muss die Nucleotid-Sequenz des Zielabschnittes der DNA bekannt sein. Diese konnten durch Internetrecherche verschiedener Genomprojekte und Primerbanken (vgl. Anhang XII. D.) ermittelt werden. Für die Auswahl geeigneter Primerpaare (vgl. Anhang XII. E.) ergaben sich folgende fakultative Kriterien:

- Länge der Oligonucleotid-Primer ca. 20 bp,
- Verhältnis GC:AT ca. 1:1,
- G oder C am 3' Ende,

-
- keine repetitiven Sequenzen,
 - annähernd gleiche Annealing-Temperatur und Schmelztemperatur (T_m),
 - Länge der Zielsequenz ≤ 250 bp.

Nach Etablierung der verschiedenen Primerpaare anhand der gekauften umgeschriebenen RNA wurden alle weiteren Proben mittels eines Housekeeping-Gens²¹⁵ kontrolliert. Damit war sichergestellt, dass vorhandene cDNA in den Proben nachgewiesen und gleichzeitig jegliche Fremdkontamination anhand der Negativkontrollen (Negativkontrollen aus der cDNA Synthese ohne SuperScriptII RT bzw. ohne RNA und Negativkontrolle der PCR ohne cDNA) ausgeschlossen werden konnte. Als entsprechende Housekeeping-Gene dienten TBP²¹⁶ und SDHA²¹⁷. Der PCR Ansatz bestand aus den aufgeführten Reagenzien (vgl. Tabelle 14), z. T. wurden auch doppelte Ansätze (50 μ l) benötigt.

²¹⁴ Vgl. Knippers 2001.

²¹⁵ Housekeeping-Gene werden dadurch definiert, dass sie in (fast) allen Geweben gleichstark zur Expression kommen.

²¹⁶ Das TATA Box-bindende Protein (TBP) ist die DNA-bindende Untereinheit des Transkriptionsfaktors D für die RNA-Polymerase II, die für die Expression der meisten Protein-codierenden Gene notwendig ist.

²¹⁷ Die Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase (SDHA) gehört zum Komplex II der ubiquitär vorhandenen Atmungskette.

Reagenz	Menge in μl
taq DNA Polymerase	0,25
dNTP	0,5
Primer Mix (10mM)	2
10x Thermo PCR Puffer	2,5
HPLC Wasser	18,75
cDNA	1
Absolutes Volumen	25

Tabelle 14: PCR Ansatz für eine Probe

Nach sorgfältigem Zusammenfügen der Substanzen in einem sterilen PCR Reaktionsgefäß verlief die Reaktion in einem PCR Cyclyer nach folgendem Protokoll:

- a) 94 °C für 3 min,
- b) 94 °C für 30 s (Denaturierung),
- c) 60 °C für 45 s (Annealing),
- d) 72 °C für 45 s (Synthese),
- e) Wiederholung der Schritte b) bis d) in 35 Zyklen,
- f) 72 °C für 10 min,
- g) Kühlung auf 4 °C.

Auch die Primerpaare (E) der drei Kandidatengene (FOXO 3a, STAT 3, PIAS X) wurden so gewählt, dass alle PCR Reaktionen unter diesem Protokoll ablaufen konnten.

E. Gelelektrophorese

1. Geräte, Reagenzien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Spannungsgeber Typ Power Pac 300	Bio Rad, BRD
Sartorius basic (Gelkammern mit Kämmen)	BRD
UV-Scanner	MWG Biotech, BRD
Fotoapparat Typ Quick-Shooter QSP	International Biotechnologies, USA
Polaroid 667 ISO3000/DIN36	Polaroid, The Netherlands

Tabelle 15: Geräte für die Gelelektrophorese

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
GibcoBRL ultra PURE Agarose	Life Technologies
Ethidium bromide solution (10 mg/ml)	invitrogen GmbH, BRD
100bp DNA Ladder (500 µg/ml)	NEB, USA

<i>10xTBE</i>	
<i>Inhalt</i>	<i>Menge für 1 l</i>
0,9M Trisma-Base, Trispuffer	109 g
0,9M Borsäure	55,65 g
0,025M EDTA mit Na (MG: 372,2)	9,3g
Aqua bidest	alle Salze zunächst in 500 ml lösen, anschließend auf 1 l auffüllen

Tabelle 16: Reagenzien für die Gelherstellung, TBE-Ansatz

2. Methodik

Die Identifikation der Zielsequenzen erfolgte anhand ihrer Länge (vgl. Anhang XII. E.) im Vergleich zu einem 100 bp Marker (5 µl). Dafür wurden 20 µl des PCR Produktes mit ca. 5 µl Ladepuffer (vgl. Tabelle 17) versetzt und auf ein einprozentiges Agarose-Gel aufgetragen. Dieses bestand aus 1 g

Agarose, die in 100 ml 1xTBE gelöst und in einer Mikrowelle bei 800 W zwei Minuten aufgekocht wurde. Nach kurzer Abkühlung wurden 7,5 µl EtBr luftblasenfrei untergemischt. Nach Überführung der erstarrten Gelmasse in die mit 1xTBE gefüllte Kammer lief die Elektrophorese bei 120 V über 35 min ab. Durch UV-Licht konnten die entstandenen Banden auf dem Gel sichtbar gemacht und mit einer Spezialkamera fotografiert werden.

Ladepuffer	
Reagenz	Menge für 100 ml
Glycerin 99 %	50 ml
1xTBE	50 ml
SDS	0,2 g
Bromphenolblau	0,05 g
Xylenxanol	0,05 g
EDTA (M= 372,24 g/mol)	3,7224 g (0,1 mM)

Tabelle 17: Zusammensetzung des Ladepuffers

F. Aufreinigung der Zielprodukte und Sequenzierung

1. Aufreinigungsmethode aus dem PCR Ansatz

Nachdem die Gelbanden positiv ausfielen, konnten Reste der PCR Produkte (50 µl Ansatz - 20 µl Gel = 30 µl) mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, BRD) aufgereinigt werden. Es wurden drei PCR Produkte (90 µl) derselben Zielsequenz summiert, um eine höhere Konzentration zu erhalten. Zu einem Teil PCR Produkt wurden fünf Einheiten PB Puffer (gelöst in Ethanol 96 %) gegeben und die Mischung über eine Eluationssäule zentrifugiert (1 min bei 13.000 rpm). Es folgten eine weitere Zentrifugation (1 min bei 13.000 rpm) mit PE Puffer und die anschließende Trocknung (1 min bei 13.000 rpm) der Säule. Danach wurden 30 µl EB Puffer direkt in die Mitte

der Membran pipettiert; nach einer Minute Ruhezeit erfolgte die Eluation (1 min bei 13.000 rpm). Das Ergebnis (5 µl) wurde erneut elektrophoretisch kontrolliert und bei -20 °C zwischengelagert (25 µl).

<i>Reagenz</i>	<i>Menge in µl</i>
PCR Produkt	90
PB Puffer	450
PE Puffer	750
EB Puffer	30

Tabelle 18: Aufreinigungsansatz für eine Probeneinheit

2. Sequenzierung

Die so aufgereinigten Proben der Kandidatengene FOXO 3a, STAT 3 und PIAS X wurden anschließend postalisch ohne Kühlung an die sequenzierende Firma (MWG-BIOTECH AG, BRD) geschickt. MWG übermittelte die Ergebnisse nach einigen Tagen per Email. Anschließend erfolgte der Vergleich der erhaltenen Sequenzen der Amplifikationsprodukte mit den bekannten Sequenzen der entsprechenden Kandidatengene. Dadurch konnte deren Spezifität nachgewiesen und eine Fehlamplifikation widerlegt werden. Bei den etablierten Housekeeping-Genen wurde darauf verzichtet.

G. Quantitative Real-Time PCR

1. Aufreinigung und Herstellung eines Standards

a) Geräte, Reagenzien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Präzisionswaage SBA/SBC	SCALTEC Instruments GmbH Heiligenhafen, BRD
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, BRD
NucleoSpin Extract II	MN, BRD

Tabelle 19: Geräte und Reagenzien für die Gelaufreinigung

b) Aufreinigung aus dem Gel

Für jedes Gen wurden zunächst zwei PCR Ansätze (je 50 µl) gefertigt und davon je vier Banden (4 x 20 µl) auf das Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter dem UV-Scanner wurden diese mit dem Skalpell in Höhe der Zielsequenz fein herausgeschnitten und gemeinsam in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Ermitteln des Probengewichts und entsprechender Zugabe von NT Puffer folgte die Erwärmung auf 50 °C für ca. zehn min bis zur vollständigen Auflösung der Gelmasse. Alle zwei bis drei min wurde die Probe dabei vorsichtig gevortext, danach auf die Eluationssäule übertragen und zentrifugiert (1 min bei 11.000 rpm). Eine Waschung der Säule mit NT 3 Puffer (1 min bei 11.000 rpm) und ihre Trocknung (2 min bei 11.000 rpm) schlossen sich an. Zuletzt erfolgte die Eluation mit auf 70 °C vorgewärmten NE Puffer nach einminütiger Inkuba-

tion der Membran (1 min bei 11.000 rpm). Die erhaltene cDNA-Konzentration wurde mit dem Photometer ermittelt (vgl. Tabelle 21).

Reagenz	Menge in μl
NT Puffer (je 100mg 1%iges Gel)	200
NT 3 Puffer	600
NE Puffer	20

Tabelle 20: Aufreinigungsansatz angepasst je Geleinheit (4 Banden pro Gen)

c) Berechnung des Standards

Zur Durchführung einer absoluten quantitativen PCR ist die Herstellung eines Molekül-Standards unumgänglich. Der Berechnung eines solchen liegt folgende stöchiometrische Gleichung zugrunde:

$$m = \frac{M \cdot N}{N_A}$$

m = Masse (g)

M = molare Masse (g/mol)

N = Teilchenanzahl einer abgeschlossenen Stoffmenge

N_A = (AVOGADRO-Konstante).

Zudem müssen die aufgeführten Angaben gegeben sein:

- Länge der Zielsequenz in bp,
- molare Masse (M) eines bp = 660 g/mol,
- N_A (AVOGADRO-Konstante) = 6,023x10²³ Moleküle/mol,
- N = erwünschte Molekülanzahl im Standard A (z. B. 5.000.000),
- Konzentration der aufgereinigten cDNA in μ g/ μ l.

Die molare Masse (M) einer Zielsequenz ist als Produkt aus molarer Masse eines einzelnen Basenpaares und der Länge der Zielsequenz für jedes Gen verschieden. So ergibt sich aus der o. g. Formel für jedes Gen eine unterschiedliche Masse (m) der im Standard A pro μl vorhandenen cDNA. Dividiert man nun die bekannte Konzentration der aufgereinigten cDNA durch die erwünschte Konzentration (Masse/Volumen) des Standards A so erhält man den nötigen Verdünnungsfaktor:

<i>Gen</i>	<i>Länge der Zielsequenz (bp)</i>	<i>Konzentration 1:10.000 Aufreinigung ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$)</i>	<i>Konzentration 1:10.000 ($\text{pg} / \mu\text{l}$)</i>	<i>Konzentration Standard A ($\text{pg} / \mu\text{l}$)</i>	<i>Verdünnungsfaktor 1:X</i>
TBP	127	0,052	5,2	0,6958	7,47
SDHA	163	0,055	5,5	0,893	6,16
FOXO 3a	187	0,06	6,0	1,024	5,85
STAT 3	222	0,054	5,4	1,216	4,44
PIAS X	266	0,05	5,0	1,457	3,43

Tabelle 21: Berechnung der Standard-Verdünnungsreihe

d) Herstellung des Standards

Es ist praktikabel, vor Erstellung der eigentlichen Verdünnungsreihe aus der aufgereinigten Probe eine 1:10.000 Verdünnung als Ausgangspunkt für die oben beschriebene Berechnung herzustellen. Aus dieser wird mittels Verdünnung²¹⁸ im Verhältnis 1:X (berechneter Verdünnungsfaktor) der Standard A (5.000.000 Moleküle/ μl) gewonnen. Die weiteren Standards B-F (500.000-50 Moleküle/ μl) ergeben sich anschließend jeweils durch 1:10 Ver-

²¹⁸

Vgl. Müller 2001.

dünnungen. Die Standardreihen der verschiedenen Gene wurden durch Real-Time PCR auf ihre Güte hin überprüft (vgl. Abschnitt VIII. D.2.).

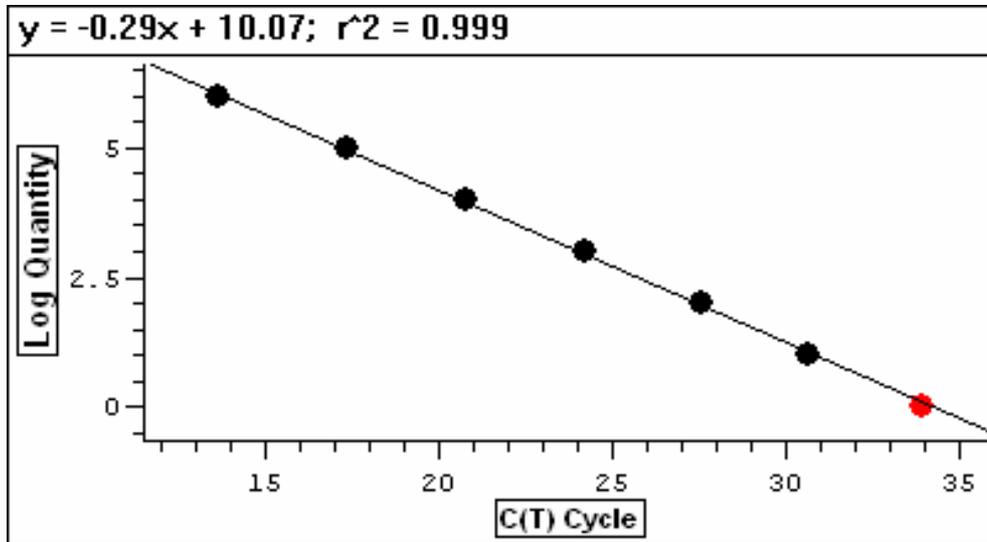


Abbildung 7: Standard Graph SDHA (Housekeeping-Gen)

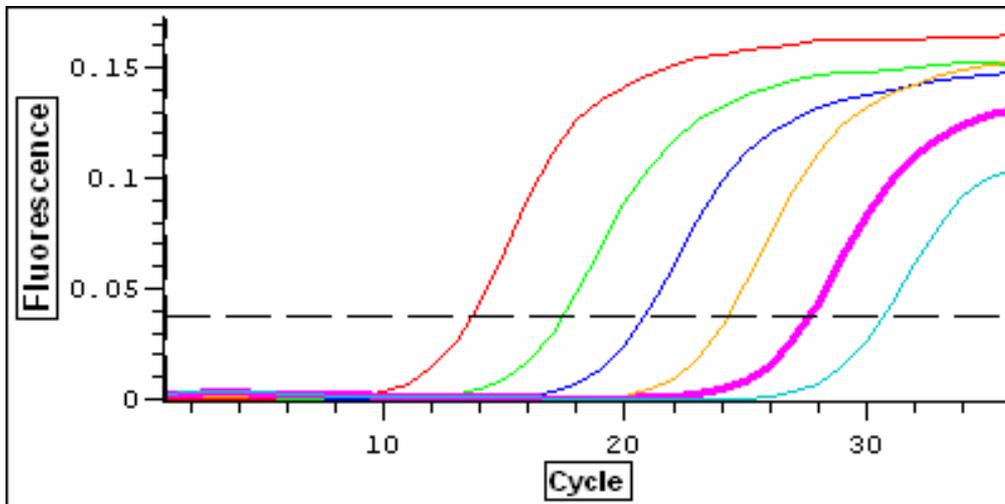


Abbildung 8: Data Graph SDHA, Threshold line manuell = 0,037

2. Quantitatives Real-Time Verfahren

a) Geräte, Verbrauchsmaterial, Reagenz

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
DNA Engine OPTICON 2	MJ Research, USA
PC Netvista, intel pentium 4	IBM
OPTICON Monitor Version 2.02.24	MJ Research, Inc., USA

Tabelle 22: Real-Time PCR Maschine und Auswertungssoftware

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
96 well Multiply-PCR Plate skirted	Sarstedt, BRD
8 strip Low Profile Tubes 0,2 ml	MJ Research, USA
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, BRD

Tabelle 23: Verbrauchsmaterialien für die Real-Time PCR

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG	invitrogen GmbH, BRD

Tabelle 24: Fertigreagenz für die Real-Time PCR

b) PCR Ansatz und Protokoll

Zunächst wurden alle für die Reaktion notwendigen Reagenzien auf Eis aufgetaut und der Master Mix (vgl. Tabelle 25) hergestellt. Die cDNA jeder Probe wurde in Triplikaten (je 1 µl) auf die 96 Well-Platte aufgetragen, der Standard A-F eines Gens in Doppelbestimmung mitgeführt. Außerdem wurden pro Platte mindestens zwei Leerwerte (Master Mix ohne cDNA) zur Reinheitskontrolle verwendet. Für jedes Gen wurden zwei Platten ausge-

wertet: eine mit den Kontrollproben, die andere mit den Proben der Endometriose- und POF-Patientinnen. Nach Zugabe der 24 µl Master Mix je Well wurde die Platte zentrifugiert (1 min bei 1000 rpm). Danach verlief die Reaktion im OPTICON 2 Cycler für alle Gene nach diesem Protokoll:

- a) 50 °C für 2 min,
- b) 94 °C für 3 min,
- c) 94 °C für 30 s (Denaturierung),
- d) 60 °C für 45 s (Annealing),
- e) 72 °C für 45 s (Synthese),
- f) Ablesen des Fluoreszenzsignals (SYBR Green),
- g) Wiederholung der Schritte c) bis f) in 35 Zyklen,
- h) 72 °C für 10 min,
- i) Schmelzkurvenanalyse von 60 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten über 1 s,
- j) Ende.

<i>Master Mix</i>	<i>Menge in µl</i>
SYBR Green Super Mix	12,5
Primer Mix (10µM)	2
HPLC Wasser	9,5
cDNA	1
absolutes Volumen	25

Tabelle 25: Real-Time PCR Ansatz für eine Probe

c) Quantifizierungsverfahren

Das Real-Time PCR Verfahren ermöglicht eine Quantifizierung der gesuchten Zielsequenz-Amplikons noch in der exponentiellen Phase der Reaktion²¹⁹ und bietet hiermit gegenüber der konventionellen PCR, deren Datenerhebung in der Sättigungsphase der Reaktion liegt, einen enormen Genauigkeitsvorteil. Die angewandte optische Methode des SYBR Green-Systems²²⁰ beruht auf der spezifischen Anlagerung von Fluoreszenzmolekülen zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren. Durch kurzwelliges Licht (488 nm) angeregt emittiert die Substanz langwelliges Licht (520 nm), dessen Intensität mit zunehmender Quantität an dsDNA steigt. Die Detektion des emittierten Lichts bzw. die zeitliche Abhängigkeit des Auftretens einer bestimmten Fluoreszenzintensität in jeder Probe ermöglicht also den Rückschluss auf die Ausgangsmenge der eingesetzten Zielsequenz-cDNA.

3. Schmelzkurvenanalyse

Um die Spezifität des Fluoreszenzsignals zu überprüfen (Identifikation des Produktes) und eine Kontamination auszuschließen (Homogenität des Produktes) wurde jede Probe einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Dabei nimmt infolge des Schmelzprozesses die Fluoreszenzintensität ab. Die spezifische Schmelztemperatur (T_m) einer Nukleinsäure hängt unter anderem von ihrer Länge, dem GC-Gehalt und vorhandenen Basen-Mismatches ab. Sie lässt sich in der Funktion $-dI/dT$ als der Punkt darstellen, an dem sich

²¹⁹ Vgl. Müller 2001.

²²⁰ Vgl. Müller 2001.

die Fluoreszenzrate am stärksten verändert (Maximum). Gibt es nur ein Maximum (vgl. Abbildung 9), das für das entsprechende Gen bei allen Proben auf derselben Temperaturhöhe liegt, so ist die Spezifität und Reinheit des Amplifikationsproduktes erwiesen.

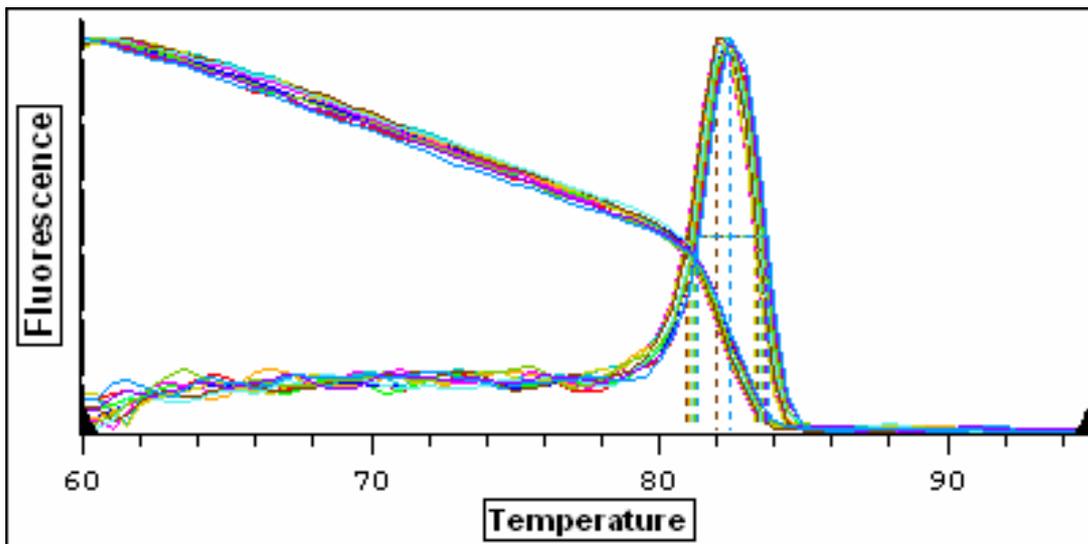


Abbildung 9: Melting Curve Graph PIAS (Kandidatengen, POF-Patientinnen)

VIII. Dritter Teil: Auswertung und Ergebnisse

A. RNA Extraktion

Nach der RNA-Gewinnung aus den zur Verfügung stehenden Ovargeweben wurde deren Güte mittels Gelelektrophorese (Agarose-Gel 1 %) kontrolliert. Die typischen Doppelbanden (vgl. Abbildung 10) sollten bei identischer eingesetzter Menge (1 µg, vgl. Anhang XII. A.) möglichst gleichmäßig sein.²²¹ Da das Verfahren problemlos funktionierte, konnte im Folgenden auf diesen Kontrollschritt verzichtet werden.

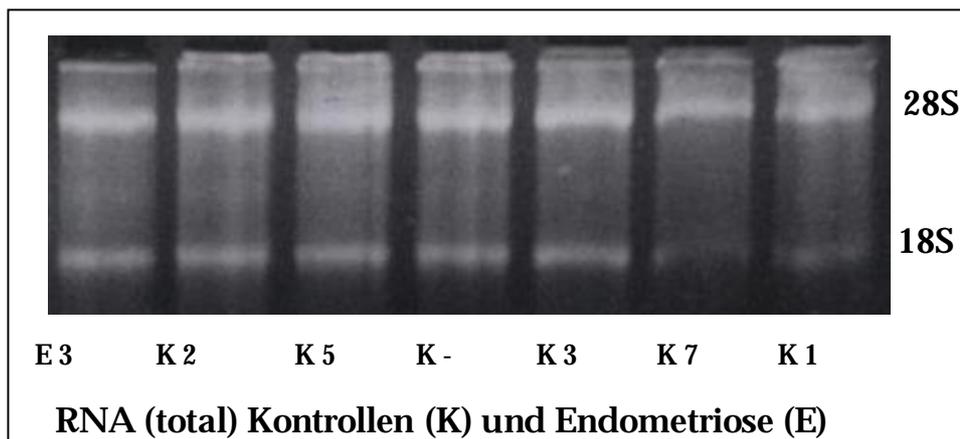


Abbildung 10: RNA (total) von Kontroll (K)- und Endometriose (E)-Proben nach RNeasy Mini Kit Extraktion

²²¹

Bei der Elektrophorese kann rRNA nachgewiesen werden. Sie ist ein Bestandteil der Ribosomen, wobei die 28 S rRNA der größeren Untereinheit (60 S), die 18 S rRNA der kleineren Untereinheit (40 S) zugeordnet ist. Der Sedimentationskoeffizient (S) richtet sich nach Molekulargewicht und Form. Vgl. Strachan und Read 1996.

B. cDNA Synthese und konservative PCR

1. Kontrolle der cDNA Synthese

Die RNA wurde in cDNA umgewandelt und die erfolgreiche Umschreibung mittels PCR mit den Primern eines Housekeeping-Gens geprüft (vgl. Abbildung 11). Damit konnte bewiesen werden, dass alle Negativkontrollen (PCR ohne cDNA Einsatz, cDNA Umschreibung ohne SuperScriptII RT und ohne RNA Einsatz) sauber waren und keine Kontamination vorlag. Eine Positivkontrolle (umgeschriebene gekaufte ovarielle RNA) wurde ebenfalls mitgeführt.

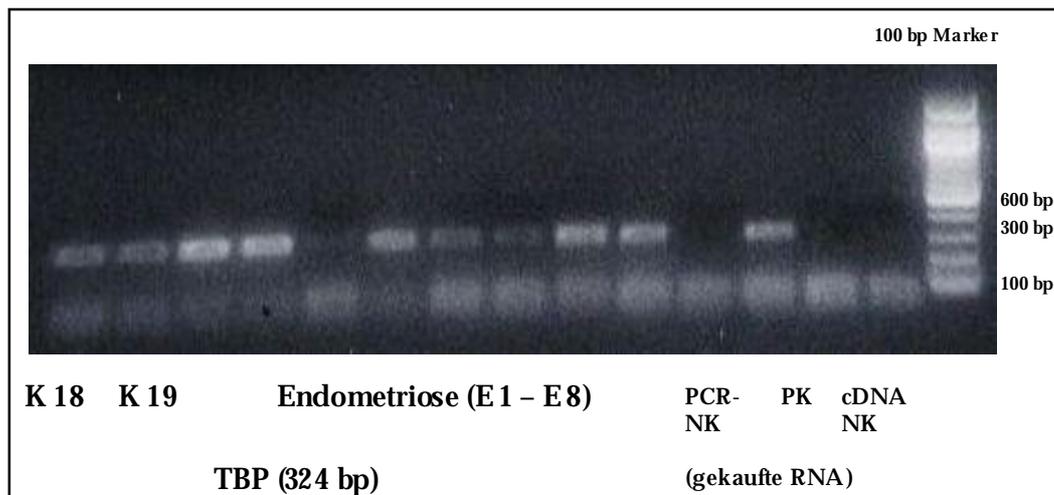


Abbildung 11: Kontrolle der cDNA Synthese mittels Housekeeping-Gen (TBP)

2. Nachweis der Kandidatengene

Daraufhin musste der Beweis erbracht werden, dass auch alle Kandidatengene im Ovargewebe exprimiert (vgl. Abbildung 12) werden und geeignete

Primerpaare zu deren Untersuchung vorhanden waren (vgl. Anhang XII. E.). Um kein Patientinnenmaterial zu verschwenden, wurde der Nachweis allein anhand gekaufter ovariellen RNA geführt. Es wurden mehrere gleiche Ansätze zur anschließenden Aufreinigung erfasst, um das Ergebnis mithilfe einer Sequenzierung nochmals verifizieren zu können. Zur Überprüfung der fehlerlos ablaufenden PCR wurden zusätzlich eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mit dem Housekeeping-Gen β -Actin mitgeführt.

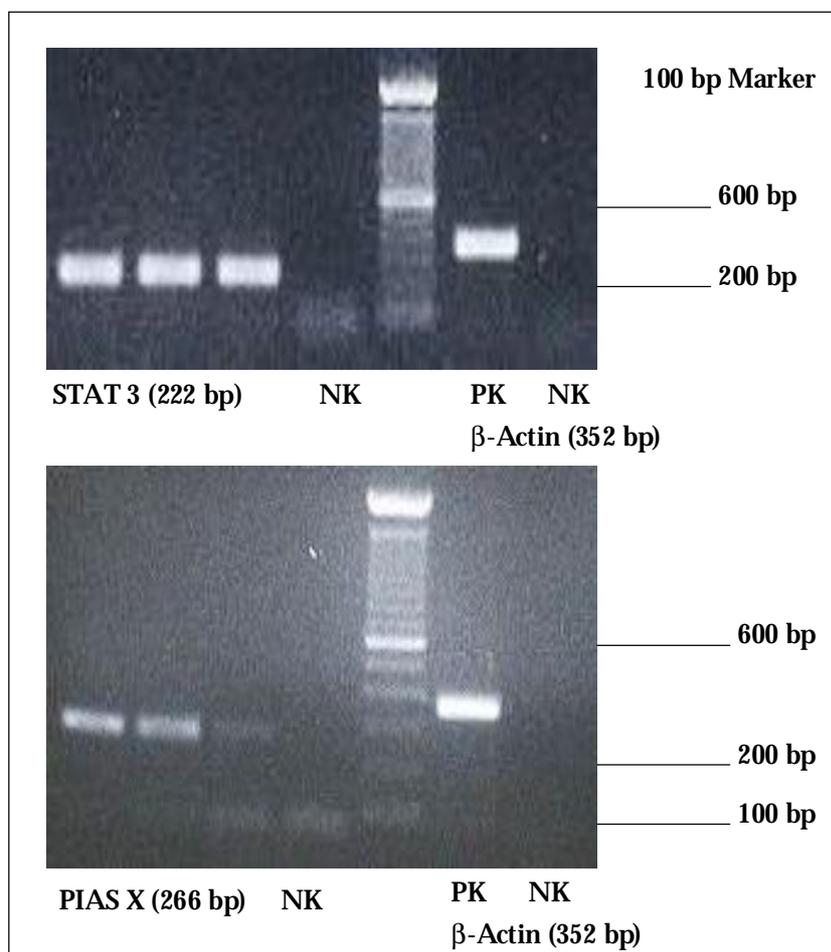


Abbildung 12: Nachweis der Kandidatengene im Ovar (qualitativ)

C. Sequenzierungsergebnisse

Die Ergebnisse der extern durchgeführten Sequenzierung (vgl. Tabelle 26) wurden mit den bekannten Sequenzen der Kandidatengene verglichen (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>, align two sequences) und eine valide Deckungsgleichheit aufgezeigt. Ein falscher Amplifikationsstart durch die gewählten Primer wurde ausgeschlossen und so ihre Spezifität bewiesen.

Zielgen	Länge (bp)	Sequenz
FOXO 3a	32-147 (115bp)	AGC CAG CCT GTC ACC TTC AGT AAG CAA GCC GTG CAC GGT GGA ACT GCC ACG GCT GAC TGT ATG GCA GGC ACC ATG AAT CTG AAT GAT GGG CTG ACT GAA AAC CTC ATG GAC GAC
STAT 3	36-168 (132bp)	AAC ATG CTG ACC AAC AAT CCC AAG AAT GTA AAC TTT TTT ACC AAG CCC CCA ATT GGA ACC TGG GAT CAA GTG GCC GAG GTC CTG AGC TGG CAG TTC TCC TCC ACC ACC AAG CGA GGA CTG AGC ATC GAG CAG
PIAS X	13-218 (205bp)	GTT ATT GAT CTT ACA ATA GAA AGC TCT TCT GAC GAA GAG GAA GAC CCT CCT GCC AAA AGG AAA TGC ATC TTT ATG TCA ACC AAA GGG GTT CTC ATG TAT CAG CCA TCT TCT GAT AGG GTG CCC AGT GTG ACT TCG GTT GAT CCT GCT GCT ATT CCG CCT TCA TTA ACA GAC TAC TCA GTA CCA TTC C

Tabelle 26: Sequenzierungsergebnisse der Kandidatengene (MWG)

Bei den verwendeten Housekeeping-Genen (TBP, SDHA) genügte der Nachweis einer entsprechenden Bande des Amplifikationsproduktes in der Gelelektrophorese (vgl. Abbildung 13).

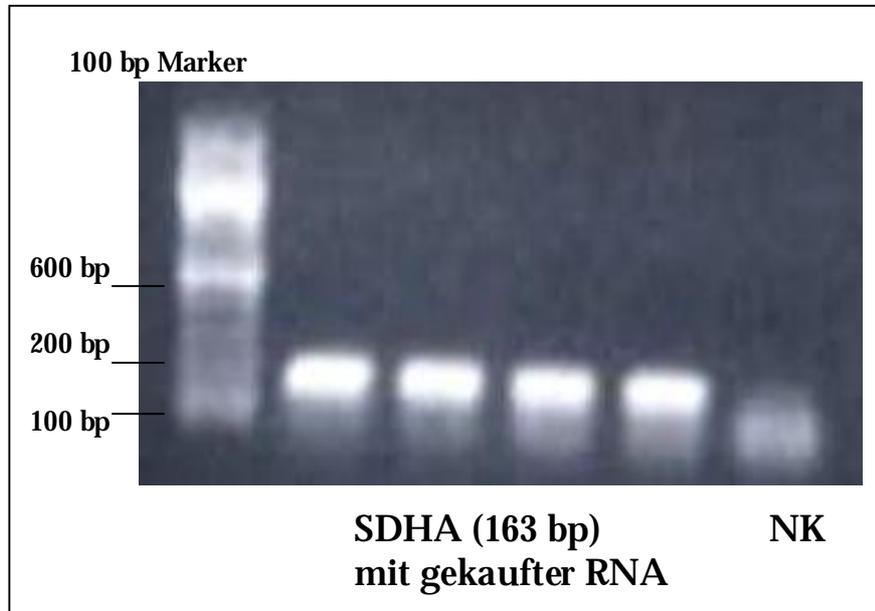


Abbildung 13: Nachweis eines Housekeeping-Gens (SDHA)

D. Standardkontrollen

1. Aufreinigung

Für alle Gene wurden mehrere PCR Ansätze gefertigt und je vier Banden der Gelelektrophorese für die Aufreinigung ausgewählt (vgl. Abbildung 14). Die entsprechenden Negativkontrollen wurden immer mitgeführt. Die Konzentrationsermittlung der aufgereinigten cDNA erfolgte mit dem Photometer (vgl. Tabelle 21). Die Berechnung und Herstellung der Standardverdünnungsreihe schloss sich an.

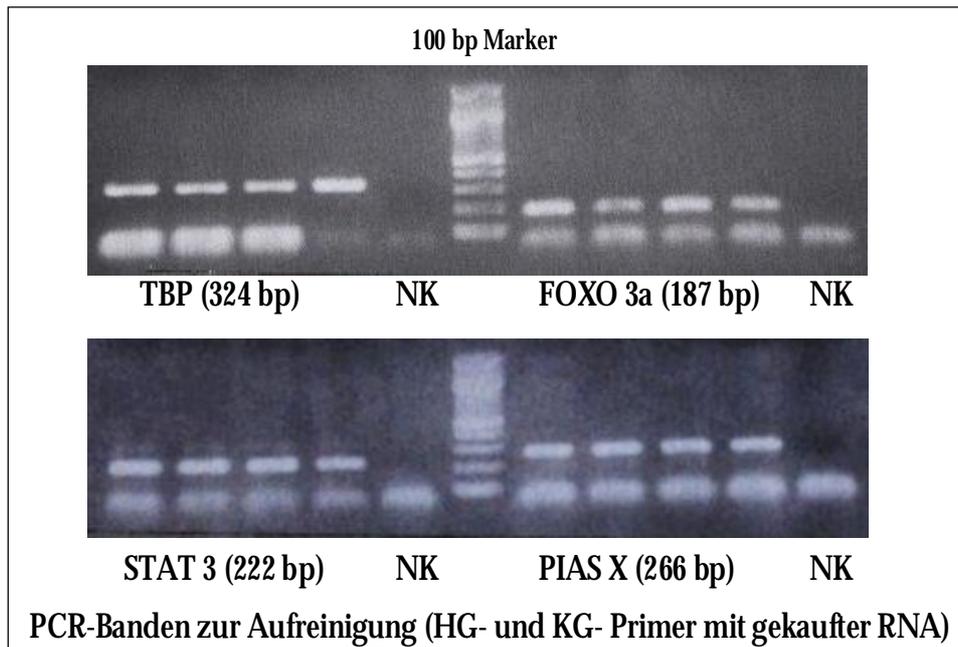


Abbildung 14: Banden zur Aufreinigung aus dem Gel zur Standardherstellung

2. Real-Time Kontrolle

Jede Verdünnungsreihe wurde mittels Real-Time PCR in Doppelbestimmung überprüft, um das Auftreten auffälliger Abweichungen auszuschließen. Die gewünschte Präzision ist vorhanden, wenn im Data Graph alle Kurven parallel zu einander und mit dem gleichen Abstand zur nächst geringeren Verdünnung verlaufen (vgl. Abbildung 8). Im Standard Graph (vgl. Abbildung 7, Abbildung 15 und Abbildung 16) wird die Amplifikation in Form einer linearen Gleichung $f(x) = y = m \cdot x + n$ dargestellt. Eine idealtheoretische Verdopplung des Fragments während jedes Zyklus ist dabei durch eine Steigung $m = -0,30$ gekennzeichnet. Die Funktion ist u. a. abhän-

gig von der Lage des Threshold (manuell = 0,037). Einzelne abweichende Werte wurden von der Berechnung ausgeschlossen.

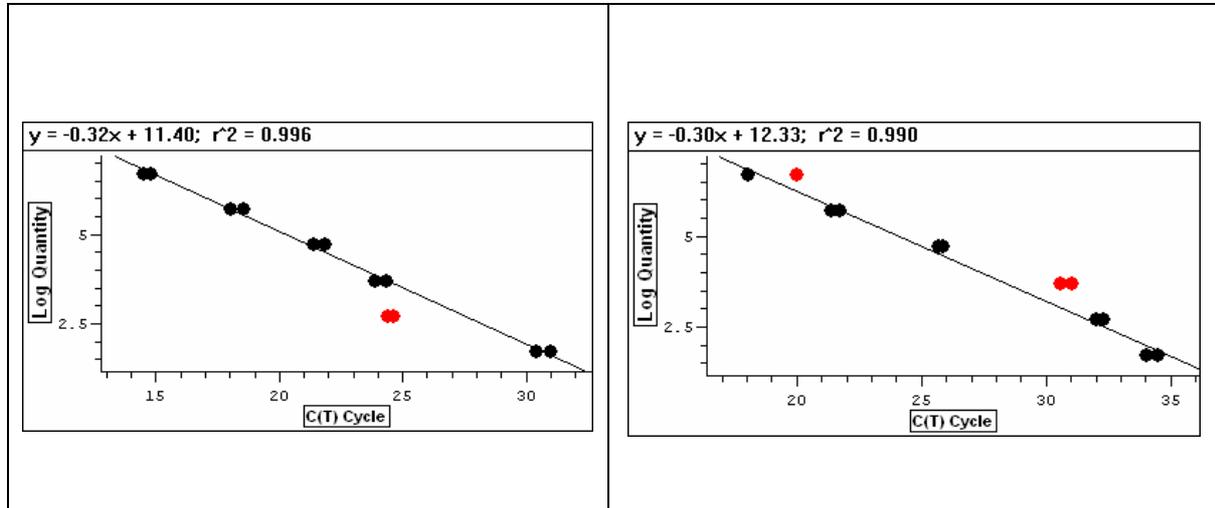


Abbildung 15: Standardreihen von PIAS X (links) und TBP (rechts)

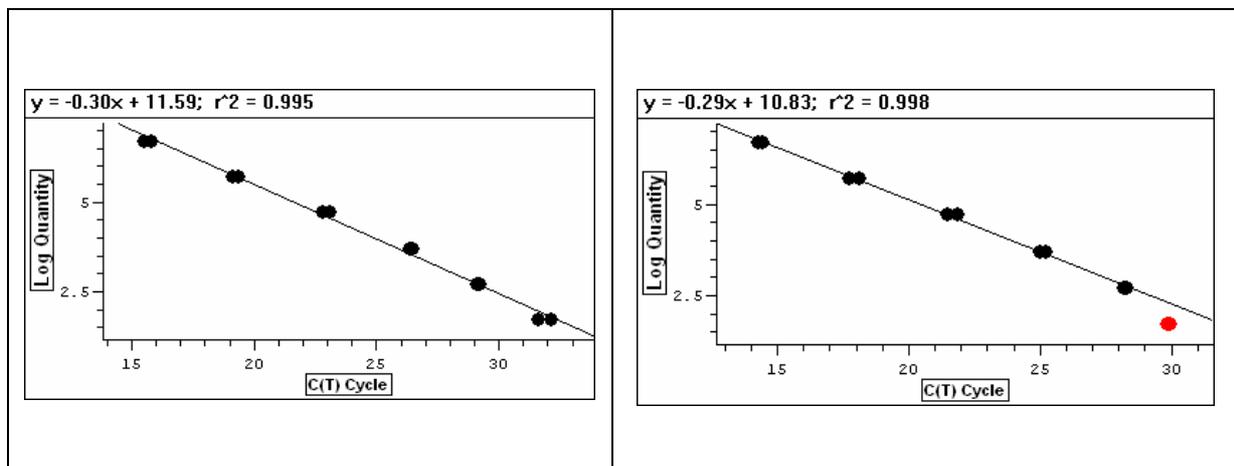


Abbildung 16: Standardreihen von FOXO 3a (links) und STAT 3 (rechts)

Schließlich wurde kontrolliert, ob die Konzentration der zu untersuchenden cDNA Proben im Bereich der Verdünnungsreihe lag. Dazu wurde aus mehreren Proben ein Pool gebildet und dieser mit dem SDHA Standard in Vergleich gesetzt (vgl. Abbildung 17). Die Graphiken zeigen die Lage des Pools

nahe dem Standard C (50.000 Moleküle). Auch in den folgenden Versuchen lagen die Einzelproben nie unterhalb des Standards F.

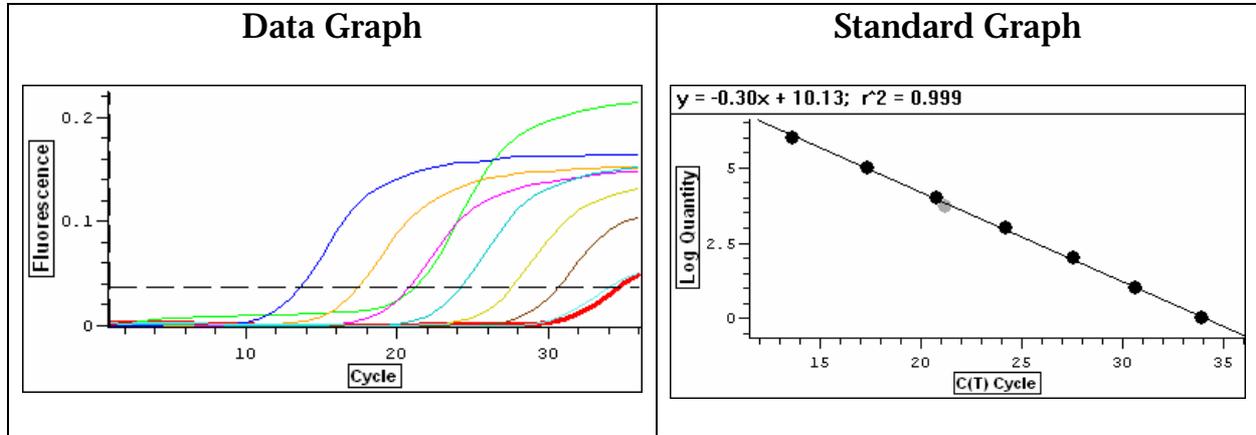


Abbildung 17: Amplifikation cDNA Pool mit SDHA Standard

E. Real - Time PCR

1. Voraussetzungen und Überlegungen zur Auswertung

Das Wesen der Genexpressionsstudien mithilfe der Real-Time PCR²²² besteht in dem Vergleich der Kandidatengene mit einer externen oder internen Referenz. Diese wird häufig durch die definierten Housekeeping-Gene dargestellt. Inzwischen ist bekannt, dass auch Housekeeping-Gene einer Regulation unterliegen und in verschiedenen Geweben unterschiedlich zur Expression kommen. Daher wird empfohlen, entsprechende Daten gegen mehr als ein Referenzgen zu normalisieren.²²³ Die vorliegende Arbeit unter-

²²² Die Datenerhebung und Auswertung erfolgte nach den Vorgaben der DNA Engine Opticon® 2 System / Operations Manual Software Version 2.02.

²²³ Vgl. Wiedemann et al. 2004.

sucht eine homogene Gewebsgruppe von Ovarien, deshalb genügte die Auswahl zweier Housekeeping-Gene (SDHA und TBP). Die Eignung der gewählten Housekeeping-Gene lässt sich durch ähnliche C (t)-Werte aller Proben feststellen. Diese belegen, dass das entsprechende Gen im Ovar keiner nennenswerten Regulation unterliegt und zu Vergleichen herangezogen werden kann²²⁴. Die meisten Proben erreichten gleichmäßig bei beiden Housekeeping-Genen zwischen Standard C und D (SDHA 22.-25. Zyklus, TBP 26.-30. Zyklus) den Threshold (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 19).

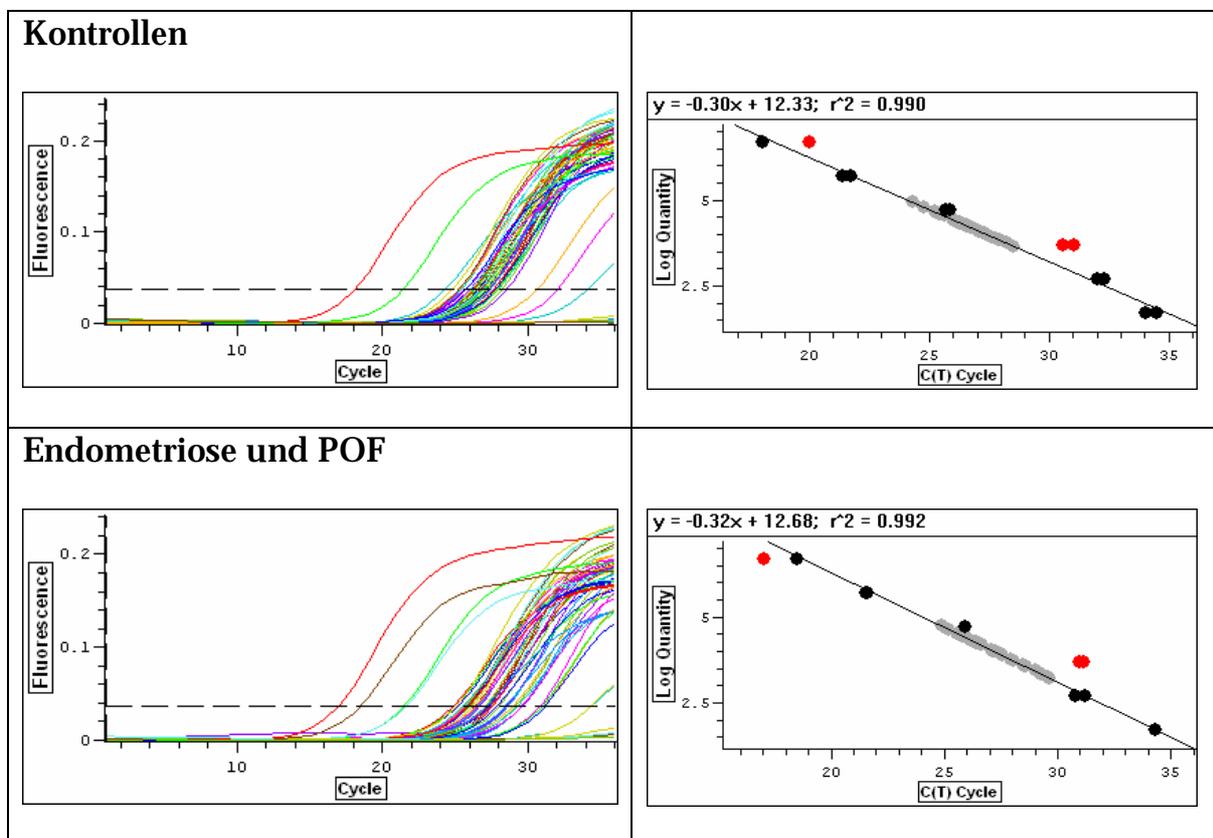


Abbildung 18: Probenverteilung i. V. zum TBP Standard

224

Vgl. Bustin 2000.

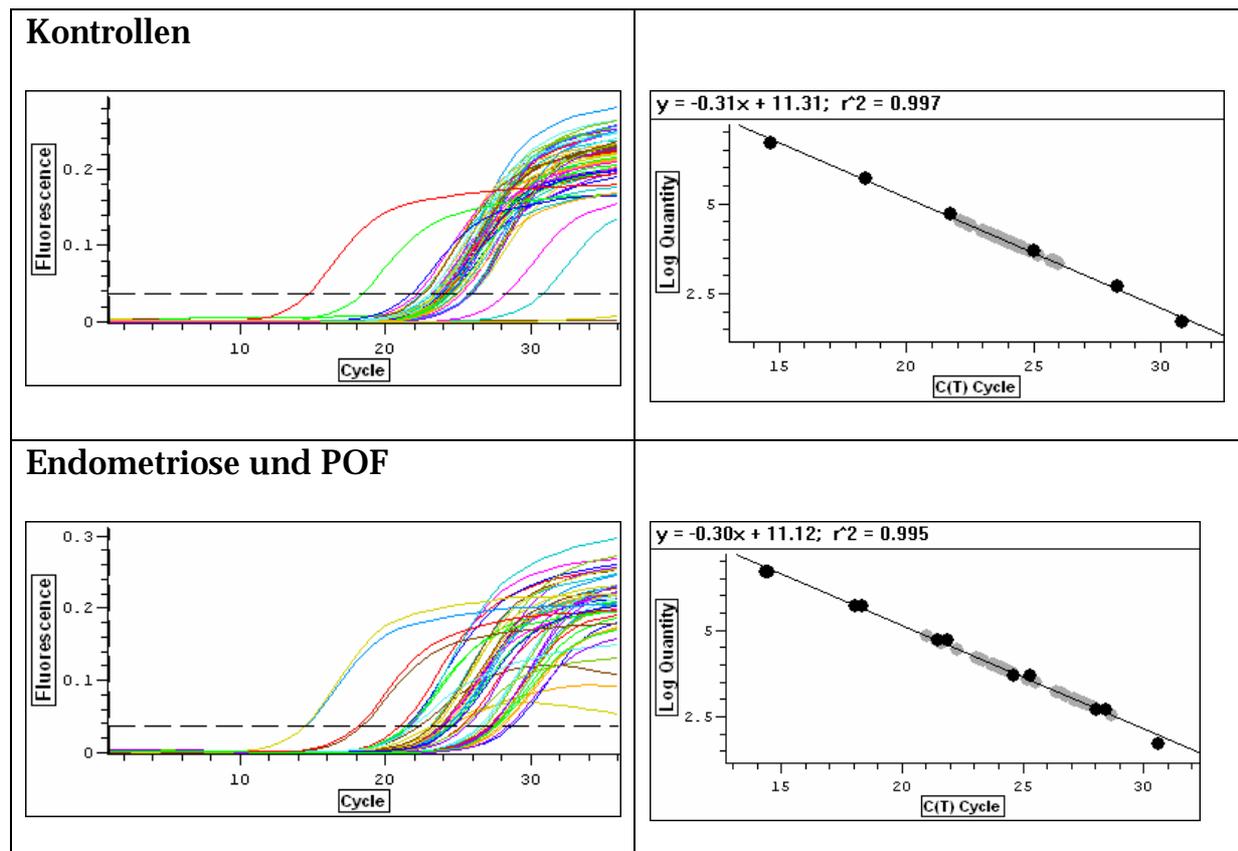


Abbildung 19: Probenverteilung i. V. zum SDHA Standard

Die beste Lage des Threshold wird mithilfe der beiden Graphen (Data Graph: Fluoreszenzintensität gegen Zyklusnummer, Standard Graph: Logarithmus der Molekülausgangsmenge gegen C (t)) bestimmt. Nach der Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenzintensität des Systems von der ermittelten Datenmenge (subtract baseline, global minimum) wird der Threshold an der Stelle des Data Graphen positioniert, wo das Fluoreszenzsignal der Proben signifikant ansteigt. Dabei ist im Standard Graphen darauf zu achten, dass der Steigungskoeffizient (r^2 , r-square) möglichst hoch ist. Dieser kann Werte zwischen 0 (0 %) und 1 (100 %) annehmen und zeigt an, mit welcher Genauigkeit die errechnete lineare Funktion die ermittelten Datenpunkte wiedergibt (vgl. Abbildung 20). Beide Voraussetzungen wurden in allen Versuchen bei einem manuell gesetzten Threshold von 0,037 erfüllt.

Mit der Festlegung des Threshold sind automatisch alle C (t)-Werte der Proben bekannt. Der C (t)-Wert (Cycle of threshold, auch CP-Wert von Crossing Point) einer Probe entspricht der Anzahl von PCR Zyklen, die benötigt werden, um ein definiertes Fluoreszenzniveau (Threshold) zu erreichen²²⁵ und ist damit direkt von der Ausgangsmenge an Zielprodukt abhängig. Je größer diese ist, desto schneller wird der Schwellenwert erreicht und desto geringer ist die dazu benötigte Zyklusanzahl.²²⁶ Mithilfe der Standardreihe kann ausgehend von den C (t)-Werten die Ausgangszahl von Molekülen in jeder Probe extrapoliert werden. Die erhaltenen Rohdaten an C (t)-Werten und initialen Molekülanzahlen für alle Proben finden sich im Anhang (vgl. Anhang XII.B. und C.).

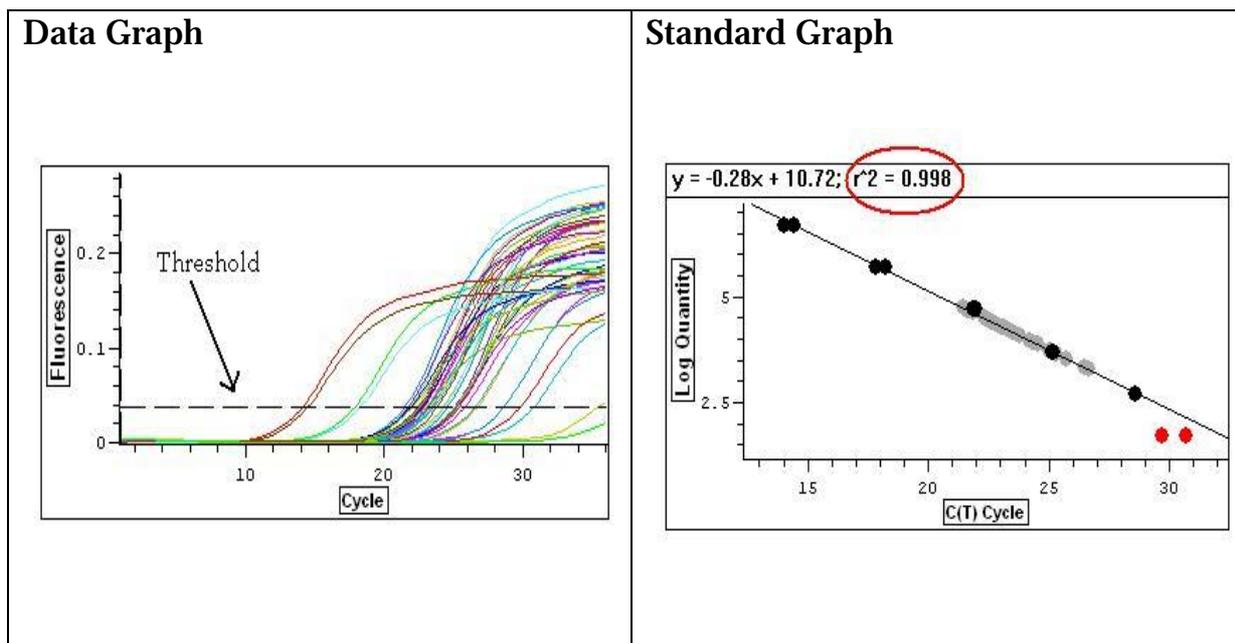


Abbildung 20: STAT Endometriose-Gruppe

²²⁵ Vgl. Dorak 2004; Pfaffl 2004.

²²⁶ Vgl. Bustin 2000.

2. Angewandte Methoden

Ziel der Arbeit ist es, eine relative Aussage über die Mehr- oder Minderepression der Kandidatengene (FOXO 3a, STAT 3, PIAS X) in den beiden Erkrankungskollektiven (Endometriose, POF) zu treffen. Grundsätzlich gibt es zwei gebräuchliche Auswertungsmethoden von Real-Time PCR Daten, die absolute und die relative Variante, jeweils mit verschiedenen Untergruppen. Die in Abbildung 21 markierten Möglichkeiten führen beide zur gewünschten Aussage und waren mit den zur Verfügung stehenden Mitteln gut zu realisieren.

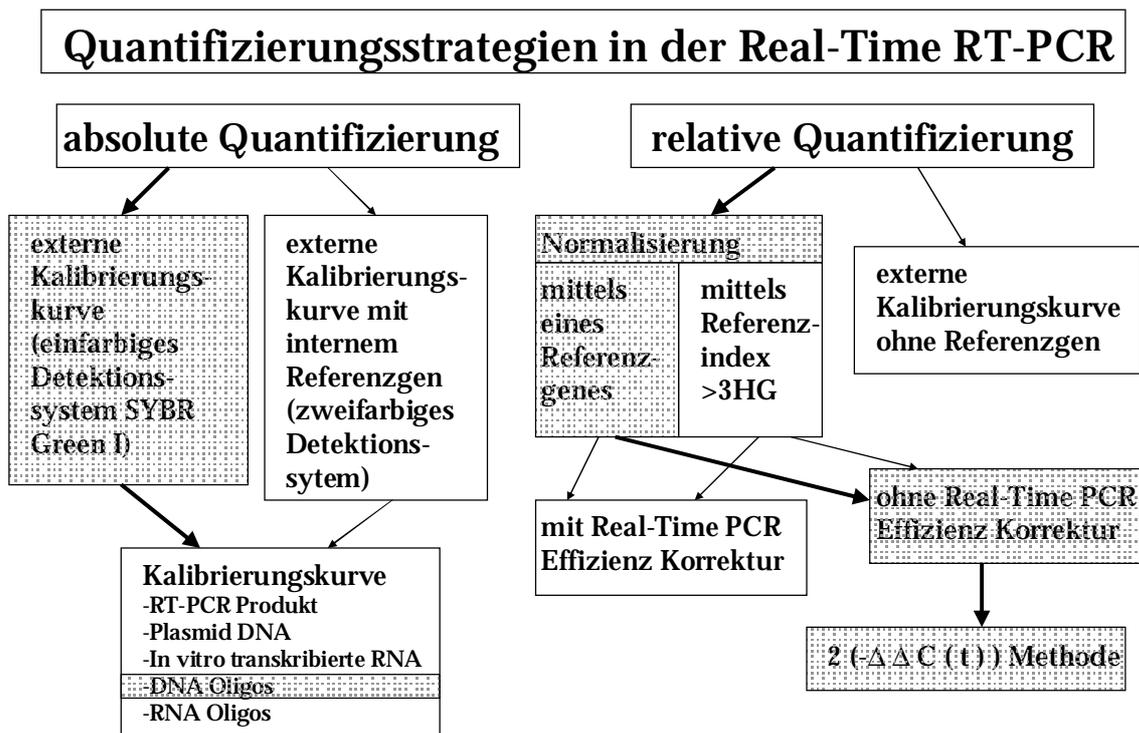


Abbildung 21: Übersicht über die Quantifizierungsstrategien der Real-Time PCR (modifiziert nach Pfaffl 2004, S. 92, Abb. 1)

a) **Absolute Auswertung**

Die absolute Auswertung arbeitet mit den aus der Standardverdünnungsreihe abgeleiteten initialen Molekülanzahlen²²⁷. Für jede Probe wurden drei Werte bestimmt, die zunächst gemittelt wurden. Selten musste ein Wert aufgrund grober Abweichung ausgeschlossen werden (vgl. Anhang XII. B. und C.). Für jede Probe wurde der Quotient aus Molekülanzahl des Kandidatengens und Molekülanzahl des Housekeeping-Gens berechnet und somit eine Normierung (Normalisierung)²²⁸ auf die vorhandene Gesamtmenge an cDNA erreicht. Anschließend wurde aus den so berechneten Verhältnissen für alle Proben einer Gruppe der Mittelwert gebildet. Dabei diente der erhaltene Gesamtmittelwert der gesunden Kontrollgruppe als 100%-Wert, zu dem die Gesamtmittelwerte der erkrankten Gruppen in Vergleich gesetzt wurden (vgl. Tabelle 27 und Tabelle 28). Am Ende dieses Verfahrens steht eine relative Aussage über die n-fache Expression eines Kandidatengens in einer erkrankten Gruppe im Vergleich zur gesunden. Zusammenfassend errechneten sich die Ergebnisse nach folgender Formel:

$$\text{n - fache Expression(KG)} = \frac{\text{Mittelwert (Moleküle KG/HG) krank}}{\text{Mittelwert (Moleküle KG/HG) gesund}}$$

Auf diese Weise wurden die erhaltenen Real-Time PCR Daten mit beiden Housekeeping-Genen (SDHA und TBP) getrennt verrechnet.

²²⁷ Vgl. Bustin 2000; Dorak 2004.

²²⁸ Vgl. Bustin 2000; Wiedemann et al. 2004.

SDHA			KG
	Molekülanzahl KG/HG	Mittelwert krank/gesund	
Kontrollen	2.33	1	FOXO 3a
	2.41	1	STAT 3
	0.323	1	PIAS X
Endometriose	2.09	0.896	FOXO 3a
	4.77	1.979	STAT 3
	0.639	1.978	PIAS X
POF	2.14	0.917	FOXO 3a
	2.24	0.93	STAT 3
	0.311	0.963	PIAS X

Tabelle 27: Berechnung absolute Auswertung (HG: SDHA)

TBP			KG
	Molekülanzahl KG/HG	Mittelwert krank/gesund	
Kontrollen	1.158	1	FOXO 3a
	1.018	1	STAT 3
	0.119	1	PIAS X
Endometriose	0.84	0.725	FOXO 3a
	1.979	1.944	STAT 3
	0.236	1.98	PIAS X
POF	1.48	1.278	FOXO 3a
	1.432	1.407	STAT 3
	0.192	1.61	PIAS X

Tabelle 28: Berechnung absolute Auswertung (HG: TBP)

b) Relative Auswertung

Diese Art der Auswertung verzichtet auf eine Standardreihe und arbeitet ausschließlich mit den durch den Threshold festgelegten C (t)-Daten in der

exponentiellen Phase der Reaktion. Die folgenden Berechnungen entsprechen der in der Literatur viel beschriebenen $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Methode.²²⁹ Voraussetzung für deren Anwendung ist eine optimale Effizienz der PCR Reaktion (Verdopplung der cDNA Menge in jedem Zyklus), die bei allen zu vergleichenden Genen annähernd identisch sein muss. Durch ähnliche Steigungswerte ($m \approx -0.30$) in allen Standardreihen wird diese Bedingung erfüllt (vgl. Abbildung 7, Abbildung 15 und Abbildung 16). Es wurde zunächst aus den Triplikaten je Probe der Mittelwert gebildet. Für jede Probe errechnete sich der $\Delta C(t)$ aus der Differenz der zugehörigen $C(t)$ -Werte von Kandidatengen und Housekeeping-Gen (Normalisierung). Anschließend wurde der mittlere $\Delta C(t)$ jeder Gruppe bestimmt und durch Subtraktion der Kontrollgruppe von der jeweiligen Erkrankungsgruppe der $\Delta\Delta C(t)$ gebildet. Durch Berechnung der Formel $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ergab sich die n-fache Expression des jeweiligen Kandidatengens in dem entsprechenden Patientinnenkollektiv (vgl. Tabelle 29 und Tabelle 30). Zusammenfassend wurden drei Berechnungsschritte vollzogen:

$$\Delta C(t) = C(t) \text{ Kandidatengen} - C(t) \text{ Housekeeping-Gen}$$

$$\Delta\Delta C(t) = \Delta C(t) \text{ Erkrankung} - \Delta C(t) \text{ Kontrollen}$$

$$\text{Ratio} = \text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C(t)}$$

²²⁹

Vgl. Livak und Schmittgen 2001; vgl. auch Dorak 2004; Pfaffl 2004.

SDHA				KG
	$\Delta C (t)$	$\Delta \Delta C (t)$	$2^{-\Delta \Delta C (t)}$	
Kontrollen	0.148			FOXO 3a
	-0.808			STAT 3
	1.662			PIAS X
Endometriose	0.5	0.352	0.783	FOXO 3a
	-1.578	-0.77	1.706	STAT 3
	0.234	-1.428	2.69	PIAS X
POF	0.168	0.02	0.986	FOXO 3a
	-0.879	-0.072	1.051	STAT 3
	1.187	-0.476	1.391	PIAS X

Tabelle 29: Berechnung relative Auswertung (HG: SDHA)

TBP				KG
	$\Delta C (t)$	$\Delta \Delta C (t)$	$2^{-\Delta \Delta C (t)}$	
Kontrollen	-2.582			FOXO 3a
	-3.45			STAT 3
	-0.849			PIAS X
Endometriose	-1.642	0.941	0.521	FOXO 3a
	-3.72	-0.27	1.206	STAT 3
	-1.91	-1.06	2.084	PIAS X
POF	-2.67	-0.087	1.062	FOXO 3a
	-3.717	-0.267	1.203	STAT 3
	-1.651	-0.802	1.74	PIAS X

Tabelle 30: Berechnung relative Auswertung (HG: TBP)

3. Ergebnisse

a) Ergebnisse der absoluten Auswertung

Deutlichstes Ergebnis sowohl im SDHA- als auch im TBP-Vergleich ist die Verdopplung der Expression der Kandidatengene STAT 3 und PIAS X bei

den Endometriose-Patientinnen (vgl. Abbildung 22 und Abbildung 23). In der Untersuchung gegen SDHA sind keine weiteren nennenswerten Veränderungen zu verzeichnen. Im Gegensatz hierzu sind im TBP-Versuch zusätzliche Trends einer leicht verstärkten Expression aller drei Kandidatengene (PIAS X > STAT 3 > FOXO 3a) in der POF-Gruppe, sowie eine ange deutete Verminderung von FOXO 3a in der Endometriose-Gruppe zu erkennen.

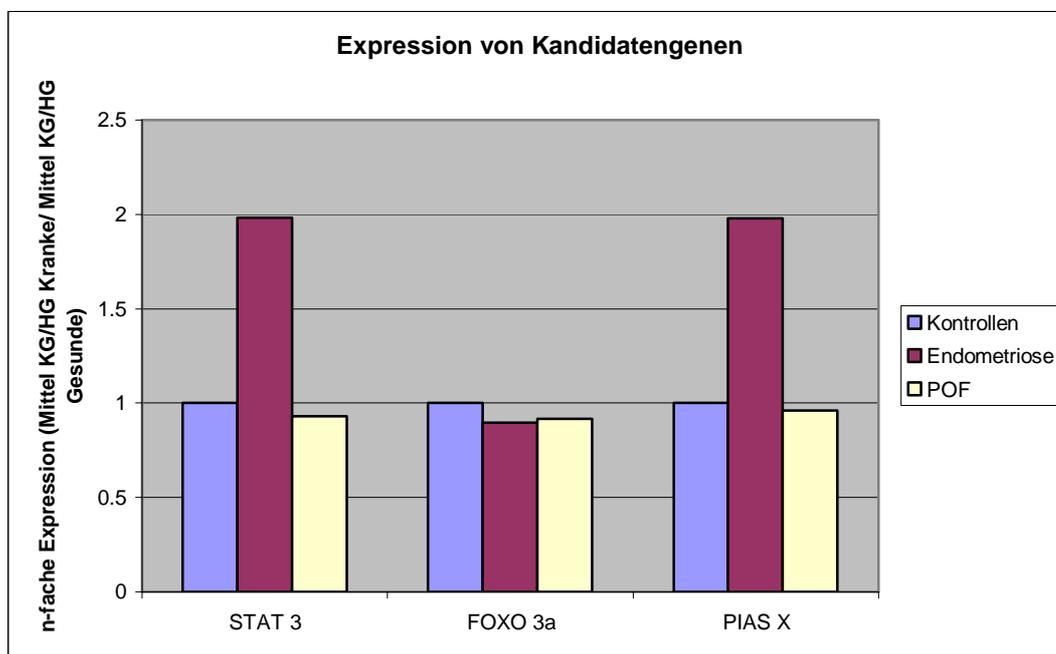


Abbildung 22: Ergebnisse absolute Auswertung (HG: SDHA)

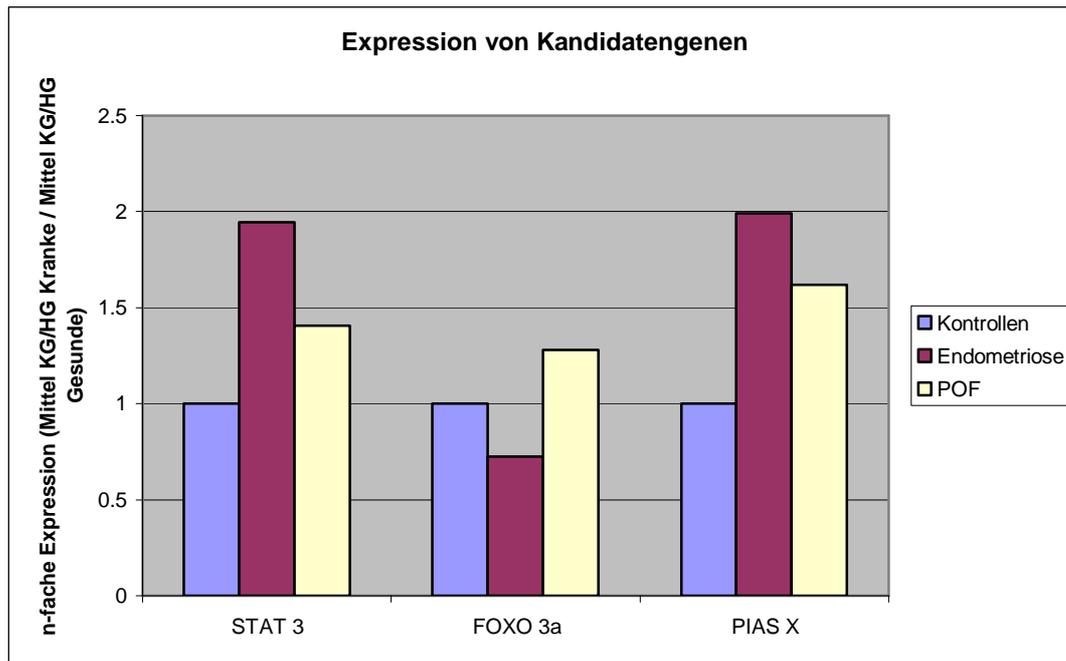


Abbildung 23: Ergebnisse absolute Auswertung (HG: TBP)

b) Ergebnisse der relativen Auswertung

Beim Vergleich mit SDHA ist wiederum eine Expressionssteigerung in der Endometriose-Gruppe nachweisbar. Während bei PIAS X eine Verstärkung über das 2,5fache zu eruieren ist, wird STAT 3 nunmehr 1,7fach vermehrt gefunden. Im TBP-Vergleich lässt sich nur die Verdopplung von PIAS X bestätigen. Des Weiteren finden sich hier ebenfalls eine Verstärkung von PIAS X in der POF-Gruppe (1,74fach) und eine Halbierung der Expression von FOXO 3a (0,5fach) bei den Endometriose-Patientinnen. Beide Effekte sind im SDHA-Versuch nur angedeutet.

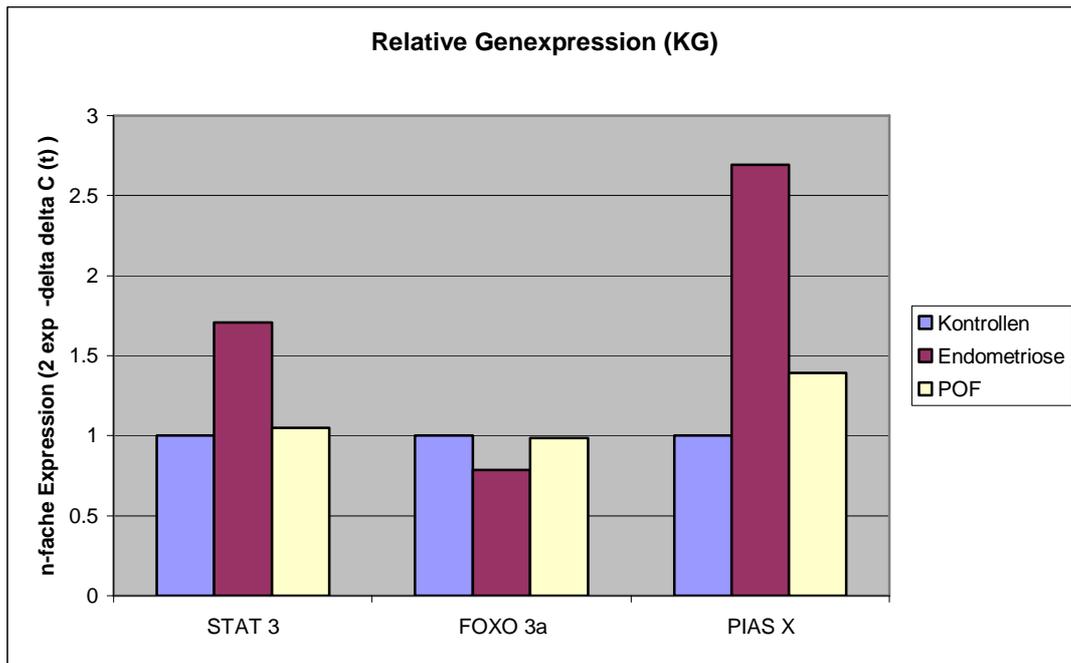


Abbildung 24: Ergebnisse relative Auswertung (HG: SDHA)

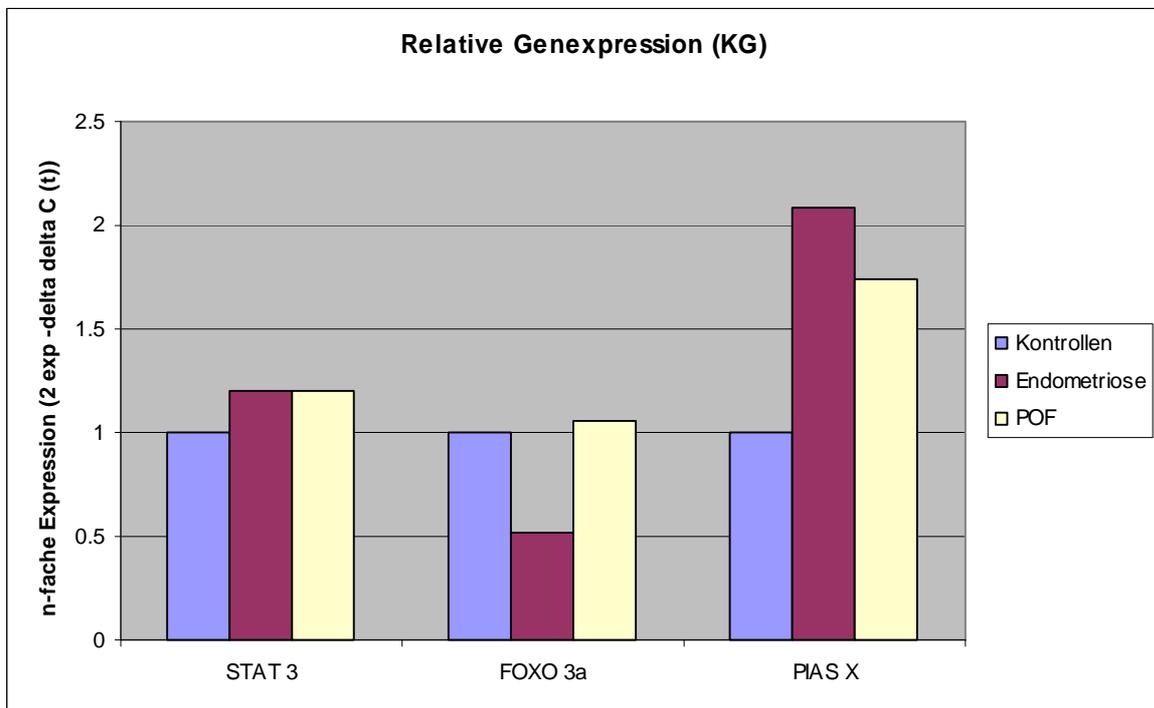


Abbildung 25: Ergebnisse relative Auswertung (HG: TBP)

c) Zusammenfassung der Expressionsergebnisse

In der Zusammenschau aller Versuchsansätze konnte die Verdopplung der Expression der Kandidatengene STAT 3 und PIAS X in der Endometriose-Gruppe nachgewiesen werden. Hinweisende Trends bestehen außerdem in einer verminderten Expression von FOXO 3a, ebenfalls in der Endometriose-Gruppe, sowie einer erhöhten Expression von PIAS X bei den POF-Patientinnen.

4. Statistische Kontrolle der Ergebnisse

Trotzdem aufgrund der Studienkonzeption als erste Grundlagenerforschung die Fallzahlen der verschiedenen Patientinnengruppen nur gering sind, sollten die in der absoluten und relativen Auswertung erhaltenen Ergebnisse auf ihre statistische Aussagekraft hin untersucht werden. Dazu wurden die Daten je auf Ebene der Normalisierung (absolut: Molekülzahl KG/HG; relativ: $\Delta C(t)$) verwendet und je der Gruppe „gesunde Kontrollen“ oder „Krankheit POF“ bzw. „Krankheit Endometriose“ zugeordnet. Die statistische Berechnung erfolgte mit der Software SPSS 13.0 für Windows.²³⁰ Dabei wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene nicht normalverteilte Stichproben angewandt. Dieser ist geeignet für den Vergleich zweier stetig wachsenden Datenreihen deren Verteilungsmuster un-

²³⁰

Zur Anwendung kam das Statistikprogramm SPSS 13.0 für Windows (Version 13.0.1, 20.Nov.2004) Copyright© SPSS Inc.1989-2004. Alle Rechte Teile dieses Produktes wurden erstellt unter Verwendung von LEADTOOLS© 1991-2000, LEAD Technologies, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Lizenz: Gynäkologie Uni Lübeck SYSMEX DEUTSCHLAND GMBH 9952446.

bekannt ist. Zudem ist er gegenüber Ausreißern unempfindlich und bietet sich daher bei geringen Fallzahlen an. Als Maß für eine statistische Signifikanz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgesetzt. Diese konnte aber nur in einigen Fällen erreicht werden, wie Tabelle 31 zeigt. Sowohl die Ergebnisse zwischen absoluter und relativer Auswertung mittels eines Housekeeping-Gens, als auch der Vergleich zwischen beiden Housekeeping-Genen fällt nicht immer übereinstimmend aus. Mit TBP treten erheblich häufiger statistische Signifikanzen auf. Diese Ergebnisse unterstreichen die in Abschnitt VII. E. 1. und 2. angeführten Überlegungen.

	SDHA		TBP	
	absolute A.	relative A.	absolute A.	relative A.
POF				
STAT 3	0,725	1	0,032	0,35
FOXO 3a	0,969	0,907	0,703	0,785
PIAS X	0,725	0,409	0,032	0,045
Endometriose				
STAT 3	0,027	0,069	0,088	0,832
FOXO 3a	0,636	0,429	0,03	0,005
PIAS X	0,138	0,006	0,049	0,001

Tabelle 31: p-Werte der statistischen Auswertung

Des Weiteren ist zu beachten, dass aufgrund der geringen Fallzahl ein hohes Risiko für einen Fehler 2. Art (Beibehalten der Nullhypothese obwohl eigentlich die Alternativhypothese zutrifft) besteht. In diesem Fall hieße das, dass eine in der Realität vorhandene signifikante Änderung in der Expression der Kandidatengene bei den erkrankten Personen aufgrund der geringen Probenanzahl nicht erkannt wurde. Um einen fundierten statistischen Beweis zu führen sind demnach umfassendere Studien notwendig.

IX. Vierter Teil: Diskussion

Die vorliegende Grundlagenstudie befasst sich mit der differentiellen Genexpression potenzieller Kandidatengene im Ovar an Endometriose oder vorzeitiger Ovarialinsuffizienz erkrankter Frauen. Beide Krankheiten können zur ungewollten Kinderlosigkeit führen und werden bei Kinderwunsch-Patientinnen häufig angetroffen (vgl. Abschnitt VI. A.). Die der Sterilität zugrunde liegenden genetischen Veränderungen konnten bisher nur unzureichend aufgedeckt werden. In Mausmodellen und Microarray-Untersuchungen werden immer wieder neue Kandidatengene entdeckt, die mit dem Phänomen einer verminderten Ansprechbarkeit des Ovars assoziiert werden. In diesem Zusammenhang waren die Gene FOXO 3a, STAT 3 und PIAS X besonders aussichtsreich und wurden nun einer Expressionsstudie am Originalgewebe unterzogen (vgl. Abschnitt VI. C.). Eine Untersuchung anhand von Zellkulturen sollte bewusst unterbleiben, da bei diesem Verfahren eine Beeinflussung des Systems mit genetischer Induktion unumgänglich und somit die Wahrscheinlichkeit einer Ergebnisverfälschung erhöht ist. Mit dem Ziel der Untersuchung an Ovargeweben ergab sich zunächst das Problem der Rekrutierung gesunder und erkrankter Frauen. Bereits vorhandene tief gefrorene Gewebe wurden nach intensivem Aktenstudium in die Untersuchung aufgenommen und den entsprechenden Gruppen zugeteilt. Außerdem gaben einige neue Patientinnen nach ärztlicher Aufklärung ihre Zustimmung zu einer Probenentnahme bei einer anstehenden Operation. Trotz aller Bemühungen konnte nur eine kleine Anzahl von Proben zusammengetragen werden (gesunde Kontrollen: 19, Endometriose: 10, POF: 4). Bei dem Krankheitsbild POF ist einer der Hauptgründe für die geringe Ausbeute sicherlich die per se niedrige Prävalenz in der Gesamtbevölkerung (vgl. Abschnitt VI. B.1.a)). Zusätzlich entscheiden sich nur weni-

ge der diagnostizierten Frauen für eine Laparoskopie mit ovarieller Biopsie zum histologischen Beweis, da diese aus Mangel an therapeutischer Relevanz heute nicht mehr zur Standardbehandlung zählt. Wenngleich die Endometriose eine vergleichsweise häufige Erkrankung ist (vgl. Abschnitt VI. B.2.a)), bestand hierbei die Schwierigkeit, nicht direkt befallenes Ovargewebe zu erhalten. Die Expressionsstudien wurden auf RNA-Ebene durchgeführt, wozu zunächst alle Gewebeproben nacheinander einer Extraktion der totalen RNA und Umschreibung in cDNA unterzogen wurden. Anschließend wurde mittels konservativer PCR zunächst der qualitative Nachweis der Genexpression im Ovargewebe geführt. Bei der darauf folgenden quantitativen Auswertung durch Real-Time PCR wurden drei Messungen je Probe analysiert, um anhand der Werte Fehlbestimmungen, die bei Verfahren mit hoher Sensitivität regelmäßig auftreten, leichter erkennen zu können. Die Ergebnisse wurden zur größeren Konstanzsicherheit gegen zwei verschiedene Housekeeping-Gene normalisiert (vgl. Abschnitt VII. und VIII.). Gleichzeitig konnten so Unterschiede in der Expression der Housekeeping-Gene erkannt werden, die entgegen der landläufigen Meinung ebenfalls einer Regulation unterliegen. Anfangs wurden daraufhin sieben verschiedene Housekeeping-Gene mit einer käuflichen ovariellen RNA getestet. Eine Reduktion auf zwei Vergleichsgene war infolge der Materialknappheit notwendig. In diesem Bereich wäre idealtheoretisch eine weitere Verbesserung der Methodik durch die Anwendung eines Referenzgenindex (> 3 HG) und Effizienz-Korrektur-Programms möglich (vgl. Abbildung 21). In realiter waren diese Forderungen durch die zur Verfügung stehenden Gerätschaften und die gebotene Sorgfalt mit dem begrenzten Probenmaterial jedoch nicht umsetzbar. Bei allen Proben musste die Expression jedes Gens überprüft werden. Obwohl die dazu nötigen Real-Time PCR-Verfahren unverzüglich nacheinander durchgeführt wurden, kann eine ge-

ringfügige Verschlechterung der cDNA-Qualität durch die mehrfachen Auftauvorgänge nicht ausgeschlossen werden. Die gewonnenen Daten weisen aber nicht auf eine solche Veränderung hin. Trotz aller aufgeführten Widersprüche wurde den Anforderungen an diese Grundlagenstudie genüge getan. In der Expression der drei Kandidatengene (FOXO 3a, STAT 3, PIAS X) konnten signifikante und tendenzielle Veränderungen bei den verschiedenen Erkrankungsgruppen festgestellt werden, die im Weiteren erläutert werden sollen.

A. Differentielle Expression von FOXO 3a

Im Hinblick auf die Sterilität durch eine reduzierte ovarielle Reserve besteht bei FOXO 3a begründete Aussicht einen kausalen Zusammenhang zu finden. An Mausmodellen konnte bereits reproduzierbar gezeigt werden, dass weibliche Tiere, deren Ovarien FOXO 3a inaktiv sind, einen Phänotyp entwickeln, der dem Krankheitsbild POF vergleichbar ist.²³¹ In dieser Studie konnte leider keine Korrelation zwischen der Expression von FOXO 3a und dem Auftreten eines POF-Syndroms gefunden werden. Allein die sehr geringe Fallzahl ist eine sehr wahrscheinliche Begründung hierfür. Weitere ausgedehnte Forschungen mit diesem Kandidatengen sind daher wünschenswert. Allerdings gelang es in der Endometriose-Gruppe einen deutlichen Trend zur verminderten Genexpression von FOXO 3a im Ovar aufzuzeigen. Die in der Literatur vielfach erwähnte entscheidende Rolle des Gens an den Checkpoints des Zellzyklus unterstreicht eine mögliche Sterilität

²³¹

Vgl. Castrillon et al. 2003; Hosaka et al. 2004.

durch FOXO 3a-Verminderung. Es kann dabei die Prozesse einer Zelle sowohl in Richtung der fortgesetzten Proliferation als auch genau entgegengesetzt zu Arrest und Apoptose führen.²³² Somit liegt eine Funktion des Gens bei der gesteuerten Ausreifung und Arrestierung der einzelnen Follikel im Ovar nahe. Bei den entsprechenden FOXO 3a-knockout-Mäusen kam es zur ungeordneten Hyperaktivierung der Ovarreserve und anschließendem kompletten Funktionsverlust mit Sterilität.

B. Differentielle Expression von STAT 3

Die Expression von STAT 3 ist im Ovar an Endometriose erkrankter Frauen deutlich gesteigert. Die Untersuchungen zeigten eine Verdopplung der für STAT 3 kodierenden RNA. Es ist bekannt, dass in der Peritonealflüssigkeit dieser Frauen erhöhte Mengen vieler verschiedener immunologischer Botenstoffe (IL, IFN usw.) und Wachstumsfaktoren vorkommen (vgl. Abschnitt VI. B.2.b)). Da das Ovar praktisch direkt in diesem immunologisch aktiven Milieu schwimmt, liegt es nahe, dass die verschiedenen Liganden auf die Zelloberflächenrezeptoren des Gewebes einwirken können. Über den IL-6 Rezeptor oder andere spezielle Rezeptortyrosinkinasen kann so auch STAT 3 vermehrt aktiviert und seine Transkription induziert werden (vgl. Abschnitt VI. C.2.). Welche Rolle STAT 3 bei der Regulierung des Zellzyklus spielt, hängt sowohl von dem betrachteten Gewebe und dessen Rezeptorausstattung als auch von der Mischung der einwirkenden Liganden ab. Auf diese Weise können pro- oder antiapoptotische Schritte eingeleitet

²³²

Vgl. Alvarez et al. 2001; Brunet et al. 2004; Kops et al. 2002; Nemoto und Finkel 2002; Tran et al. 2002.

werden.²³³ Im Ovar wurden während der verschiedenen Follikelentwicklungsstufen unterschiedliche STAT 3-Aktivitätsgrade in den Granulosazellen festgestellt. In unreifen aber auch in atretischen kleinen Follikeln ist STAT 3 konstitutiv aktiviert, während es in reifen präovulatorischen Follikeln reduziert ist. Um eine vollständige Ausreifung bis zum Graaf'schen Follikel zu erreichen, muss STAT 3 anscheinend gehemmt werden.²³⁴ Seine erhöhte Expression im Ovar bei Endometriose könnte deshalb eine Subfertilität erklären. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Gonadotropine und Steroide STAT 3 negativ beeinflussen, wodurch der mögliche Erfolg einer hormonellen Stimulationsbehandlung erklärbar wird.²³⁵ Bei vorzeitiger Ovarialinsuffizienz konnten keine eindeutigen Veränderungen in der STAT-Expression festgestellt werden. Im Vergleich gegen SDHA ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede; gegen TBP zeigte sich eine geringfügig erhöhte STAT-Menge im Ovar.

C. Differentielle Expression von PIAS X

Die Aufgaben von PIAS X sind immer noch weitgehend ungeklärt, da noch nicht einmal ihre Spezifität gegenüber einem Mitglied der STAT-Familie zufrieden stellend aufgedeckt werden konnte (vgl. Abschnitt VI. C.3.). Von PIAS 3 ist bekannt, dass es STAT 3 spezifisch hemmt und dadurch wahrscheinlich die Ausreifung der Follikel im Ovar bis zur Ovulation ermög-

²³³ Vgl. Bowman et al. 2000; Chapman et al. 1999; Darnell Jr. 1997; Igaz et al. 2001; Ihle 2001; Maritano et al. 2004; Russel und Richards 1999; Takeda et al. 1997; Yuang et al. 2005.

²³⁴ Vgl. Russel und Richards 1999.

licht.²³⁶ Eine Verminderung von PIAS 3 im Ovar könnte also auch ein Grund für Sterilität sein, wurde jedoch in dieser Studie nicht untersucht. PIAS X ist allerdings im Ovar von Frauen mit Endometriose signifikant erhöht. In den Ovarien der POF-Patientinnen konnte ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung von PIAS X ermittelt werden. Die bereits oben erläuterte gleichzeitige Erhöhung von STAT 3 spricht für eine unabhängige Regulation der beiden Gene PIAS X und STAT 3. Für alle bisher bekannten Mitglieder der PIAS-Familie konnte in Zellkulturen eine proapoptotische (STAT-unabhängige) Ausrichtung nachgewiesen werden.²³⁷ Möglicherweise ist dies ein Ansatzpunkt für die mit einer PIAS X Erhöhung einhergehende Sterilität bei beiden Erkrankungen. Dennoch ist der Klärungsbedarf gerade bei den Mechanismen um PIAS X noch immer sehr groß.

D. Ausblick für weitere Forschungsziele

Die vorliegende Arbeit konnte die vorhandenen Hinweise über die drei Kandidatengen (FOXO 3a, STAT 3 und PIAS X) in Bezug auf eine mögliche Beteiligung an einer ovariellen Sterilität verdichten und unterstützen. Dennoch wäre eine größere Fallzahlstudie erstrebenswert, um besonders bei vorzeitiger Ovarialinsuffizienz und FOXO 3a genauere Aussagen treffen zu können. Zudem ist es sinnvoll die hier auf RNA-Ebene erhaltenen Informationen auf Protein-Basis (z. B. mittels Westernblotting) zu verifizieren. Eine

²³⁵ Vgl. Russel und Richards 1999.

²³⁶ Vgl. Betz et al. 2001; Chung et al. 1997; Liu et al. 1998; Liu und Shuai 2001; Moilanen et al. 1999 i. V. m. Russel und Richards 1999.

²³⁷ Vgl. Liu und Shuai 2001.

vernünftige Einordnung der entsprechenden veränderten Genexpression wird erst möglich sein, wenn die physiologischen Verhältnisse im Ovar während seiner Entwicklungsphasen aufgeklärt sind. Dazu kann auch eine Untersuchung der Kandidatengene an gesunden Ovarien jeweils im präpubertären, reproduktiven und postmenopausalen Stadium beitragen. Ebenso wichtig ist es festzustellen, in welcher Zyklusphase des Ovars das jeweilige Kandidatengen in welcher Zellart mit welcher Intensität gebildet wird. Eine geeignete Methode dazu ist z. B. die Immunhistochemie-Technik an histologischen Schnitten. Zügige Antworten versprechen Untersuchungen an reproduktiv aktiven Individuen mit vergleichsweise kurzem Lebenszyklus wie z. B. Mäusen. Spezifische Mutationen in den Genen können deren Expressionsmuster und Aktivitätsgrade gegenüber der Normalform verändern. Die Suche und Analyse von Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen kann solche Mutationen aufdecken und Hinweise auf deren Rolle bei der Entstehung von Krankheiten erbringen. Bis zur vollständigen Auflösung aller Mechanismen um die ovarielle Sterilität ist noch ein langer Forschungsweg zu beschreiten.

X. Fünfter Teil: Zusammenfassung

Etwa jedes 6. Paar in Deutschland leidet an ungewollter Kinderlosigkeit. Die noch junge Disziplin der Reproduktionsmedizin gibt ihnen durch angepasste Stimulationsprotokolle und neue Verfahren wie IVF und ICSI Hoffnung auf ein eigenes Kind. Obwohl durch Maßnahmen der „künstlichen“ Befruchtung mit 20-25% Schwangerschaftsraten erreicht werden können, die nahe der natürlichen liegen, gibt es immer wieder Begrenzungen. So ist bei einem Teil der Patientinnen die Sensitivität der Eierstöcke auf eine hormonelle Stimulation herabgesetzt. Der Östrogenspiegel und die Ausbeute an reifen, qualitativ hochwertigen Eizellen - und damit die Chance auf eine Schwangerschaft - sind bei diesen Frauen sehr gering. In der Literatur wird dieses Phänomen als „low response“ bezeichnet. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei Krankheitsbildern, die Frauen dieser Problemgruppe häufig betreffen. Zum einen mit der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz (POF, premature ovarian failure), bei der es zum verfrühten Erliegen der Ovarfunktionen und des daraus resultierenden menopausenähnlichen Zustands mit hohen FSH-Spiegeln kommt, zum anderen mit der weitaus häufiger auftretenden Endometriose, bei der sich Endometrialgewebe außerhalb des Uterus in der Bauchhöhle manifestiert und ein neues immunologisches Milieu schafft. Ziel der Untersuchung ist es, neue genetische Ursachen aufzudecken, die einer verminderten ovariellen Ansprechbarkeit zugrunde liegen könnten. In dieser Grundlagenstudie wurde die differentielle Expression dreier vielversprechender Kandidatengene (FOXO 3a, STAT 3 und PIAS X) im kranken und gesunden Ovar auf RNA-Ebene untersucht. FOXO 3a gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind. Homozygot FOXO 3a-defiziente Mäuse zeigen reproduzierbar ein POF-homologes Bild. Auch STAT-Proteine

sind Transkriptionsfaktoren, die aktiviert durch eine Vielzahl von Liganden auf Prozesse des Zellwachstums, der Proliferation, Differenzierung und Apoptose einwirken. STAT 3 nimmt dabei eine zentrale Stellung bei der Koordination im Immunsystem ein und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Neoplasien. Außerdem befindet sich STAT 3 in Abhängigkeit des Follikelreifungsgrades in den Granulosazellen des Ovars. Dabei ist es in kleinen, unreifen Follikeln in höheren Konzentrationen vorhanden, während es präovulatorisch physiologisch supprimiert wird. PIAS-Moleküle sind STAT-spezifische Transkriptionshemmer. Es konnte aber auch eine STAT-unabhängige proapoptotische Wirkung aller vier Genfamilienmitglieder, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, nachgewiesen werden.

Die Untersuchung wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (SYBR Green-System) an insgesamt 34 Ovargewebeproben durchgeführt. Neben den drei Kandidatengen wurden zur Normalisierung zwei Housekeeping-Gene (SDHA und TBP) erfasst. Für alle Proben wurden drei Messung pro Gen parallel bestimmt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte sowohl absolut, durch Ermittlung der initialen Molekülanzahl, als auch relativ nach der $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ – Methode.

In der Zusammenschau der Ergebnisse beider Verfahren können die gleichen stabilen Expressionsmuster erkannt werden. Eine Beteiligung von FOXO 3a an der Entstehung des POF-Syndrom beim Menschen, ähnlich wie bei Mäusen, konnte nicht bestätigt werden. Dennoch ist eine Assoziation der verminderten Fruchtbarkeit zu einer FOXO 3a-Reduktion wahrscheinlich, denn bei Endometriose-Patientinnen wird es tendentiell weniger exprimiert. Darüber hinaus ist eine abschließende Beurteilung in der POF-Gruppe nicht möglich, da die Anzahl der Patientinnen nur gering war. Bei

Endometriose unterliegen sowohl STAT 3 als auch PIAS X einer Verdoppelung der Expression. In wieweit diese Veränderungen abhängig voneinander verlaufen bleibt unklar. Hingegen findet sich bei POF eine PIAS X-Vervielfachung ohne gleichsinnige STAT-Veränderung.

Die bisherigen Ergebnisse unterstreichen eine mögliche Beteiligung aller drei Kandidatengene bei der Entstehung der ovariellen Sterilität. Die Bedeutung der beobachteten abweichenden Genexpressionen bei Endometriose und POF kann allerdings erst dann beurteilt werden, wenn die physiologischen Vorgänge in der Entwicklung und Alterung des Ovars besser verstanden werden. Dahingehend sind weitere Untersuchungen z. B. an Knock-out Mäusen und die Verifizierung der entsprechenden Ergebnisse auf RNA- und Proteinebene am Menschen notwendig.

XI. Literaturverzeichnis

A. Literaturstellen aus Büchern

Brinsden, P. R.: Oocyte recovery and embryo transfer techniques for in vitro fertilization. In: Brinsden, P. R. (Hrsg.): A textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction-The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. 2nd edition, 171-184, The Parthenon Publishing Group, New York/London, 1999

Brosens, I.: Endometriosis: pathophysiological and diagnostic considerations. In: Shoham, Z. /Howles, C. M. /Jacobs, H. S. (Hrsg.): Female Infertility Therapy Current Practice, 1. Auflage, 347-354, Martin Dunitz Ltd., London, 1999

Elder, K. T.: Laboratory techniques: oocyte collection and embryo culture. In: Brinsden, P. R. (Hrsg.): A textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction-The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. 2nd edition, 185-201, The Parthenon Publishing Group, New York/London, 1999

Kennedy, S.: Genetic factors in endometriosis. In: Shoham, Z. /Howles, C. M. /Jacobs, H. S. (Hrsg.): Female Infertility Therapy Current Practice. 1. Auflage, 363-371, Martin Dunitz Ltd., London, 1999

Knippers, R.: Molekulare Genetik. 8. Aufl., 476, Thieme, Stuttgart, 2001

Koninckx, P. R., Barlow, D.: Principles of management of endometriosis: surgical treatment. In: Shoham, Z. /Howles, C. M. /Jacobs, H. S. (Hrsg.): Female Infertility Therapy Current Practice. 1. Auflage, 373-389, Martin Dunitz Ltd., London, 1999

Macnamee, M. C., Brinsden, P. R.: Superovulation strategies in assisted conception. In: Brinsden, P. R. (Hrsg.): A textbook of In Vitro Fertilization and

Assisted Reproduction-The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. 2nd edition, 91-102, The Parthenon Publishing Group, New York/London, 1999

Marcus, S. F., Brinsden, P. R.: Oocyte donation. In: Brinsden, P. R. (Hrsg.): A textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction-The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. 2nd edition, 343-354, The Parthenon Publishing Group, New York/London, 1999

Müller, H-J.: PCR Polymerasekettenreaktion. 1. Auflage, 58-71, Spektrum, Heidelberg/Berlin, 2001

Rabe, T., Diedrich, K., Eberhardt, I., Al-Hasani, S.: In Vitro Fertilization. In: Rabe, T. /Diedrich, K. /Strowitzki, T. (Hrsg.): Manual on Assisted Reproduction. 2nd updated Edition, 389-447, Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 2000

Smith, S. K.: Endometriosis and infertility: pathogenesis and work-up. In: Shoham, Z. /Howles, C. M. /Jacobs, H. S. (Hrsg.): Female Infertility Therapy Current Practice. 1. Auflage, 355-362, Martin Dunitz Ltd., London, 1999

Strachan, T., Read, A. P.: Molekulare Humangenetik. 1. Auflage, 23, Spektrum, Heidelberg/Berlin/Oxford, 1996

Strowitzki, T.: Wenn das Wunschkind ausbleibt: Ursachen, Diagnose und Behandlungsmöglichkeiten. 1. Auflage, 11-15, 28-35, 49, 71-77, 93-95, Hüthig, Heidelberg, 1998

Urbancsek, J., Rabe, T., Strowitzki, T.: Ovarian Stimulation for In Vitro Fertilization: Past and Present. In: Rabe, T. /Diedrich, K. /Strowitzki, T. (Hrsg.): Manual on Assisted Reproduction. 2nd updated Edition, 165-195, Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 2000

B. Zeitschriftenartikel

Akande, V. A., Keay, S. D., Hunt, L. P., Mathur, R. S., Jenkins, J. M., Cahill, D. J.: The Practical Implications of Raised Serum FSH and Age on the Risk of IVF Treatment Cancellation Due to a Poor Ovarian Response. Journal of Assisted Reproduction and Genetics Vol. 21 No. 7, 257-262 (2004)

Alvarez, B., Martínez-A., C., Burgering, B. M. T., Carrera, A. C.: Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. Nature Vol. 413, 744-747 (2001)

American Society of Reproductive Medicine: Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertility and Sterility Vol. 67 No. 5, 817-821 (1997)

Antczak, M., Blerkom van, J.: Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. Molecular Human Reproduction Vol. 3 No. 12, 1067-1086 (1997)

Arici, A., Duleba, A., Oral, E., Olive, D., Bukulmez, O., Jones, E. E.: The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. Fertility and Sterility Vol. 65 No. 3, 603-607 (1996)

Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., Shuai, K.: PIASx Is a Transcriptional Co-repressor of Signal Transducer and Activator of Transcription 4. The Journal of Biological Chemistry Vol. 278 No. 24, 21327-21330 (2003)

Augustin, H. G., Kuhn sen., W.: Zyklische Angiogenese-Prozesse im Ovar. *Der Gynäkologe* 32, 582-589 (1999)

Bals-Pratsch, M., Diedrich, K.: Assistierte Reproduktion bei Frauen mit einer beginnenden Perimenopause. *Journal für Fertilität und Reproduktion* 1, 24-35 (2001)

Bancsi, L. F. J. M. M., Broekmans, F. J. M., Eijkemans, M. J. C., de Jong, F. H., Habbema, J. D. F., te Velde, E. R.: Predictors of poor response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertility and Sterility* Vol. 77 No. 2, 328-336 (2002)

Barnhart, K., Dunsmoor-Su, R., Coutifaris, Ch.: Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* Vol. 77 No. 6, 1148-1155 (2002)

Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A. W. K., Wang, Y., Banks, A. S., Lavery, H. J., Haq, A. K., Maratos-Flier, E., Neel, B. G., Schwartz, M. W., Myers Jr., M. G.: STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* Vol. 421, 856-859 (2003)

Betterle, C., Volpato, M.: Adrenal and ovarian autoimmunity. *European Journal of Endocrinology* 138, 16-25 (1998)

Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W., Darnell Jr., J. E.: A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proceedings of the National Academy of Science* Vol. 98, 9563-9568 (2001)

Bondy, C. A., Nelson, L. M., Kalantaridou, S. N.: The Genetic Origins of Ovarian Failure. *Journal of Women's Health* Vol. 7 No. 10, 1225-1229 (1998)

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R.: STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488 (2000)

Brucker, C.: Medikamentöse Therapie der Endometriose. *Der Gynäkologe* 37, 353-365 (2004)

Brunet, A., Sweeney, L. B., Strugill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H-L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., Greenberg, M. E.: Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science* Vol. 303, 2011-2015 (2004)

Bustin, S. A., Review: Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193 (2000)

Cahill, D. J., Hull, M. G. R.: Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Human Reproduction* Vol. 6 No. 1, 56-66 (2000)

Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., DePinho, R. A.: Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a. *Science* Vol. 301, 215-218 (2003)

Causio, F., Fischetto, R., Leonetti, T., Schonauer, L.M.: Ovarian Stimulation in a Woman with Premature Ovarian Failure and X-Autosome Translocation. *Journal of Reproductive Medicine* Vol. 45 No. 3, 235-239 (2000)

Chan, K. S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda, J., Di-Giovanni, J.: Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and promotion stages of epithelial carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* Vol. 114 No. 5, 720-728 (2004)

Chapman, R. S., Lourenco, P. C., Tonner, E., Flint, D. J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A. R., Watson, Ch. J.: Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes & Development* 13, 2604-2616 (1999)

Christin-Maitre, S., Vasseur, C., Portnoi, M., Bouchard, P.: Genes and premature ovarian failure. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145, 75-80 (1998)

Chung, Ch. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K.: Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3. *Science* Vol. 278, 1803-1805 (1997)

Dabrosin, Ch., Gyorffy, S., Margetts, P., Ross, C., Gauldie, J.: Therapeutic Effect of Angiostatin Gene Transfer in a Murine Model of Endometriosis. *American Journal of Pathology* Vol. 161 No. 3, 909-918 (2002)

Darnell Jr., J. E.: STATs and Gene Regulation. *Science* Vol. 277, 1630-1635 (1997)

De Baere, E., Dixon, M. J., Small, K. W., Jabs, E. W., Leroy, B. P., Devriendt, K., Gillerot, Y., Mortier, G., Meire, F., van Maldergem, L., Courtens, W., Hjalgrim, H., Hunag, S., Liebaers, I., van Regemorter, N., Touraine, P., Praphanphoj, V., Verloes, A., Udar, N., Yellore, V., Chalukya, M., Yelchits, S., de Paepe, A., Kuttann, F., Fellous, M., Veitia, R., Messiaen, L.: Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype-phenotype correlation. *Human Molecular Genetics* Vol. 10 No. 15, 1591-1600 (2001)

De Geyter, Ch.: Therapeutische Strategien bei relativer hypergonadotroper Ovarialinsuffizienz. *Journal für Fertilität und Reproduktion* 2, 7-14 (2003)

Dines, M., Ebner, Th., Wiesinger, R., Moser, M., Tews, G.: Die geburtshilflichen und neonatologischen Ergebnisse von 134 Schwangerschaften, entstanden mittels assistierter Reproduktionmedizin an der LFK Linz in den Jahren 1995-1997. *Journal für Fertilität und Reproduktion* 2, 8-16 (2000)

Donnez, J., Smoes, P., Gillerot, S., Casanas-Roux, F., Nisolle, M.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Human Reproduction* Vol. 13 No. 6, 1686-1690 (1998)

Ebert, A. D., Starzinski-Powitz, A.: Aromatase und Cyclooxygenase-2-neue Ansätze in der Endometriosetherapie?. *Der Gynäkologe* 35, 250-254 (2002)

Erdem, M., Erdem, A., Gursoy, R., Biberoglu, K.: Comparison of Basal Clomiphene Citrate Induced FSH and Inhibin B, Ovarian Volume and Antral Follicle Counts as Ovarian Reserve Tests and Predictors of Poor Ovarian Response in IVF. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* Vol. 21 No. 2, 37-45 (2004)

Essers, M. A. G., de Vries-Smits, L. M. M., Barker, N., Polderman, P. E., Burgering, B. M. T., Korswagen, H. C.: Functional Interaction Between β -Catenin and FOXO in Oxidative Stress Signaling. *Science* Vol. 308, 1181-1184 (2005)

Eyster, K. M., Boles, A. L., Brannian, J. D., Hansen, K.: DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis. *Fertility and Sterility* Vol. 77 No. 1, 38-42 (2002)

Falsetti, L., Scalchi, S., Villani, M. T., Bulgari, G.: Premature ovarian failure. *Gynecological Endocrinology* 13, 189-195 (1999)

Felberbaum, R. E.: Das Deutsche IVF-Register (DIR). *Reproduktionsmedizin* 15, 249-253 (1999)

Feldman, B., Seidman, D. S., Levron, J., Bider, D., Shulman, A., Shine, S., Dor, J.: In vitro fertilization following natural cycles in poor responders. *Gynecological Endocrinology* 15, 328-334 (2001)

Finas, D., Friedrich, M., Diesing, D., Köster, F., Schultze-Mosgau, A., Diedrich, K., Hornung, D.: Endometriose Molekularbiologische Untersuchungs-

methoden führen zu neuen Behandlungskonzepten. *Der Gynäkologe* 37, 116-122 (2004)

Fogli, A., Rodriguez, D., Eymard-Pierre, E., Bouhour, F., Labauge, P., Meaney, B. F., Zeesman, S., Kaneski, C. R., Schiffmann, R., Boespflug-Tanguy, O.: Ovarien Failure Related to Eukaryotic Initiation Factor 2B Mutations. *American Journal of Human Genetics* 72, 1544-1550 (2003)

Fox, H.: The pathology of premature ovarian failure. *Journal of Pathology* 167, 357-363 (1992)

Gazvani, R., Templeton, A.: Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 123, 217-226 (2002)

Greb, R. R., Löbbecke, K., Paletta, J. R. J., Kiesel, L.: Immunmodulation der Endometriose. *Der Gynäkologe* 35, 238-242 (2002)

Hazzard, T. M., Molskness, T. A., Chaffin, C. L., Stouffer, R. L.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotropin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Molecular Human Reproduction* Vol. 5 No. 12, 1115-1121 (1999)

Ho, H.-Y., Lee, R. K.-K., Hwu, Y.-M., Lin, M.-H., Su, J.-T., Tsai, Y.-C.: Poor Response of Ovaries with Endometrioma Previously Treated with Cystectomy to Controlled Ovarian Hyperstimulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* Vol. 19 No. 11, 507-511 (2002)

Hohlagschwandtner, M., Pöhl, M., Dewald, Th., Krischker, U., Feichtinger, W.: Prädiktive Faktoren für die erfolgreiche Durchführung von IVF-Behandlungen. *Journal für Fertilität und Reproduktion* 4, 7-12 (1999)

Hosaka, T., Biggs III, W. H., Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K., Arden, K. C.: Disruption of forkhead transcription factor (FOXO)

family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Science* Vol. 101 No. 9, 2975-2980 (2004)

Hwangbo, D. S., Gersham, B., Tu M-P., Palmer, M., Tatar, M.: *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* Vol. 429, 562-566 (2004)

Hsu, A-L., Murphy, C. T., Kenyon, C.: Regulation of Aging and Age-Related Disease by DAF-16 and Heat-Shock Factor. *Science* Vol. 300, 1142-1145 (2003)

Igaz, P., Tóth, S., Falus, A.: Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflammation Research* 50, 435-441 (2001)

Ihle, J. N.: The Stat family in cytokine signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 211-217 (2001)

Jenab, S., Morris, P.: Differential Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 and STAT-1 Transcription Factors and c-fos Messenger Ribonucleic Acid by Interleukin-6 and Interferon- γ in Sertoli Cells. *Endocrinology* Vol. 137 No. 11, 4738-4743 (1996)

Jenab, S., Morris, P.: Transcriptional Regulation of Sertoli Cell Immediate Early Genes by Interleukin-6 and Interferon- γ Is Mediated through Phosphorylation of STAT-3 and STAT-1 Proteins. *Endocrinology* Vol. 138 No. 7, 2740-2746 (1997)

Jenab, S., Morris, P.: Testicular Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and LIF Receptor Mediate Phosphorylation of Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 and STAT-1 and Induce c-fos Transcription and Activator Protein-1 Activation in Rat Sertoli But Not Germ Cells. *Endocrinology* Vol. 139 No. 4, 1883-1890 (1998)

Jenkins, J. M., Davies, D. W., Devonport, H., Anthony, F. W., Gadd, S. C., Watson, R. H., Masson, G. M.: Comparison of „poor“ responders with „good“ responders using a standard buserelin/human menopausal gonadotrophin regime for in-vitro fertilization. *Human Reproduction* Vol. 6 No. 7, 918-921 (1991)

Jünger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Végh, M., Radimerski, T., Greenberg, M. E., Hafen, E.: Article 20. *Journal of Biology* Vol. 2 Issue 3, 20.1-20.17 (2003)

Kao, L. C., Germeyer, A., Tulac, S., Lobo, S., Yang, J. P., Taylor, R. N., Os-teen, K., Lessey, B. A., Giudice, L. C.: Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility. *Endocrinology* 144, 2870-2881 (2003)

Kligman, I., Rosenwaks, Z.: Differentiating clinical profiles: predicting good responders, poor responders, and hyperresponders. *Fertility and Sterility* Vol. 76 No. 6, 1185-1190 (2001)

Kops, G. J. P. L., Dansen, T. B., Polderman P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W. A., Coffey, P. J., Huang, T-T., Bos, J. L., Medema, R. H., Burgering, B. M. T.: Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* Vol. 419, 316-321 (2002)

Kovacs, P., Witt, B. R.: Day 6 Estradiol Level Predicts Cycle Cancellation Among Poor Responder Patients Undergoing In Vitro Fertilization-Embryo Transfer Cycles Using a Gonadotrophin-Releasing Hormone Agonist Flare Regimen. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* Vol. 19 No. 7, 349-353 (2002)

Kressin, P., Diedrich, K., Malik, E.: Endometriose und Angiogenese. *Der Gynäkologe* 35, 224-231 (2002)

Küpker, W., Schultze-Mosgau, A., Diedrich, K.: Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Human Reproduction Update* 1998 Vol.4 No. 5, 719-723 (1998)

Küpker, W., Felberbaum, R., Malik, E., Diedrich, K.: Medikamentöse Therapie der Endometriose mit GnRH-Antagonisten. *Der Gynäkologe* 35, 243-249 (2002a)

Küpker, W., Schröer, A., Diedrich, K.: Die vorzeitige Ovarialinsuffizienz. *Der Gynäkologe* 35, 951-957 (2002b)

Laml, T., Schulz-Lobmeyr, I., Obruca, A., Huber, J. C., Hartmann, B. W.: Premature ovarian failure: etiology and prospects. *Gynecological Endocrinology* 14, 292-302 (2000)

Lass, A., Skull, J., McVeigh, E., Margara, R., Winston, R. M. L.: Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. *Human Reproduction* Vol. 12 No. 2, 294-297 (1997)

Layman, L. C.: Human gene mutations causing infertility. *Journal of Medical Genetics* 39, 153-161 (2002)

Leyendecker, G., Kunz, G., Wildt, L., Beil, D., Deininger, H.: Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Human Reproduction* Vol. 11 No. 7, 1542-1551 (1996)

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., Shuai, K.: Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Science* Vol. 95, 10626-10631 (1998)

Liu, B., Shuai, K.: Induction of Apoptosis by Protein Inhibitor of Activated Stat1 through c-Jun NH₂-terminal Kinase Activation. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 276 No. 39, 36624-36631 (2001)

Livak, K. J., Schmittgen, T.D.: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methodes* 25, 402-408 (2001)

Luborsky, J.: Ovarian Autoimmune Disease and Ovarian Autoantibodies. *Journal of Women's Health & Gender -Based Medicine* Vol. 11 No. 7: 585-599 (2002)

Ludwig, M., Rabe, T., Geithövel, F.: Empfehlungen für die Beratung von Kinderwunschaaren. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 4, 295-298 (2004)

Machado-Ferreira, M. C., Costa-Lima, M. A., Boy, R.T., Esteves, G. S., Pimentel, M. M. G.: Premature ovarian failure and FMR1 premutation cosegregation in a large Brazilian family. *International Journal of Molecular Medicine* 10, 231-233 (2002)

Malik, E., Kressin, P., Buchweitz, O., Diedrich, K.: Endometriose und Aktivität. *Der Gynäkologe* 35, 232-237 (2002)

Margreiter, M., Weghofer, A., Feichtinger, W.: In-vitro Fertilization in Women of Advanced Reproductive Age. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 1, 5-12 (2005)

-
- Maritano, D., Sugrue, M. L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X. P., Tait, V. M., Chiarle, R., Poli, V.: The STAT3 isoforms α and β have unique and specific functions. *Nature Immunology* Vol. 5 No. 4, 401-409 (2004)
- Martinez, F., Barri, P. N., Coroleu, B., Tur, R., Sorsa-Leslie, T., Harris, W. J., Groome, N. P., Knight, P. G., Fowler, P. A.: Women with poor response to IVF have lowered circulating gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous and stimulated cycles. *Human Reproduction* Vol. 17 No. 3, 634-640 (2002)
- Martínez-Román, S., Balasch, J., Creus, M., Fábregues, F., Carmona, F., Vilella, R., Vanrell, J. A.: Immunological factors in endometriosis-associated reproductive failure : studies in fertile and infertile women with and without endometriosis. *Human Reproduction* Vol. 12 No. 8, 1794-1799 (1997)
- Matsuoka, T., Tahara, M., Yokoi, T., Masumoto, N., Takeda, T., Yamaguchi, M., Tasaka, K., Kurachi, H., Murata, Y.: Tyrosine Phosphorylation of STAT 3 by Leptin through Leptin Receptor in Mouse Metaphase 2 Stage Oocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256, 480-484 (1999)
- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B. M., Milbrandt, J.: FOXO Proteins Regulate Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand Expression. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 277 No. 49, 47928-47937 (2002)
- Moilanen, A.-M., Karvonen, U., Poukka, H., Yan, W., Toppari, J., Jänne, O. A., Palvimo, J. J.: A Testis-specific Androgen Receptor Coregulator That Belongs to a Novel Family of Nuclear Proteins. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 274 No. 6, 3700-3704 (1999)
- Nelson, L. M.: Spontaneous premature ovarian failure: young women special needs. *Menopause Management* Vol. 10 No. 4, 2-6 (2001)

Nemoto, S., Finkel, T.: Redox Regulation of Forkhead Proteins Through a p66shc-Dependent Signaling Pathway. *Science* Vol. 295, 2450-2452 (2002)

Nemoto, S., Fergusson, M. M., Finkel, T.: Nutrient Availability Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway. *Science* Vol. 306, 2105-2108 (2004)

Pellicer, A., Ballester, M. J., Serrano, M. D., Mir, A., Serra-Serra, V., Remohi, J., Bonilla-Musoles, M.: Aetiological factors involved in the low response to gonadotrophins in infertile woman with normal basal serum follicle stimulating hormone levels. *Human Reproduction* Vol. 9 No. 5, 806-811 (1994)

Pfaffl, M. W.: Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakteren mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1, 92-95 (2004)

Pfeffer, L. M., Mullerman, J. E., Pfeffer, S. R., Murti, A., Shi, W., Yang, C. H.: STAT3 as an Adapter to Couple Phosphatidylinositol 3-Kinase to the IFNAR1 Chain of the Type I Interferon Receptor. *Science* Vol. 276, 1418-1420 (1997)

Prueitt, R. L., Ross, J.L., Zinn, A.R.: Physical mapping of nine Xq translocation breakpoints and identification of XPNEP2 as a premature ovarian failure candidate gene. *Cytogenetics and Cell Genetics* 89, 44-50 (2000)

Prueitt, R. L., Zinn, A. P.: A fork in the road to fertility. *Nature Genetics* 27, 132-134 (2001)

Reis dos, R. M., Corrêa, I. L. A., De Ângelo, A. G., Manetta, L. A., de Moura, M. D., Ferriani, R. A.: In Vitro Fertilization in Patients with Ovarian Endometrioma. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* Vol. 21 No. 8, 311-314 (2004)

Runnebaum, B., Rabe, T.: Vorzeitige Ovarialinsuffizienz. *Reproduktionsmedizin* 15, 343-347 (1999)

Russel, D. L., Richards, J. S.: Differentiation-Dependent Prolactin Responsiveness and Stat (Signal Transducer and Activators of Transcription) Signaling in Rat Ovarian Cells. *Molecular Endocrinology* Vol. 13 No. 12, 2049-2064 (1999)

Salobir, B., Prezelj, J., Meden-Vrtovec, H., Kocijancic, A., Osredkar, J.: Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) serum concentrations and ovarian responsiveness in in-vitro fertilization. *Human Reproduction* Vol. 11 No. 10, 2208-2210 (1996)

Sator, M. O., Walch, K., Fischl, F.: Vorteile für das Kinderwunschpaar in einem IVF-Zentrum am Beispiel der Universitätsfrauenklinik Wien. *Journal für Fertilität und Reproduktion* 4, 40-42 (2003)

Schlessinger, D., Herrera, L., Crisponi, L., Mumm, S., Percesepe, A., Pellegrini, M., Pilia, G., Forabosco, A.: Genes and Translocations Involved in POF. *American Journal of Medical Genetics* 111, 328-333 (2002)

Schröer, A., Küpker, W., Diedrich, K.: Molekulargenetische Aspekte der prämaturnen Ovarialinsuffizienz. *Der Gynäkologe* 37, 140-146 (2004)

Schweppe, K.-W.: Therapie der Endometriose unter Berücksichtigung der Aktivitätsgrade. *Der Gynäkologe* 35, 255-261 (2002)

Shifren, J. L., Tseng, J. F., Zaloudek, Ch. 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Vol. 8 No. 8, 3112-3118 (1996)

Sillem, M., Teichmann, A. T.: Patientinnenzentrierte Aspekte der Endometriose. *Der Gynäkologe* 36, 41-52 (2003)

Sonntag, B., Kiesel, L., Nieschlag, E., Behre, H. M.: Association of Inhibin B Serum Levels with Parameters of Follicular Response in a Randomized Controlled Trial Comparing GnRH Agonist Versus Antagonist Protocols for Ovarian Hyperstimulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* Vol. 21 No. 7, 249-255 (2004)

Strowitzki, T.: Ovarielle Stimulation bei low Respondern im Rahmen der Sterilitätstherapie. *Reproduktionsmedizin* 15, 100-107 (1999)

Strowitzki, T.: Indikationsbereiche IVF vs. ICSI. *Der Gynäkologe* 33, 777-781 (2000)

Strowitzki, T., Vogt, P. H.: Genetik des Premature-ovarian-failure-Syndroms. *Gynäkologische Endokrinologie* 1, 128-134 (2003)

Subramaniam, P. S., Torres, B. A., Johnson, H. M.: So many ligands, so few transcription factors: A new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* Vol. 15 No. 4, 175-187 (2001)

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S.: Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Science* Vol. 94, 3801-3804 (1997)

Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T., Akira, S.: Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice. *Journal of Immunology* 161, 4652-4660 (1998)

Tibiletti, M.G., Testa, G., Vegetti, W., Alagna, F., Taborelli, M., Dalprà, L., Bolis, P. F., Crosignani, P. G.: The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Human Reproduction* Vol. 14 No. 11, 2731-2734 (1999)

Toner, J. P., Philput, C. B., Jones, G. S., Muasher, S. J.: Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertility and Sterility* Vol. 55 No. 4, 784-791 (1991)

Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace Jr., A. J., DiStefano, P. S., Chiang, L. W., Greenberg, M. E.: DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein. *Science* Vol. 296, 530-534 (2002)

Turkson, J., Jove, R.: STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19, 6613-6626 (2000)

Ulrich, U., Dorn, C., Schmolling, J., van der Ven, H.: Prämatüre Menopause-eine Übersicht. *Journal für Menopause* 1, 7-15 (2002)

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., Dalton, W., Jove, R., Pardoll, D., Yu, H.: Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature Medicine* Vol. 10 No. 1, 48-54 (2004)

Welte, T., Zhang, S. S. M., Wang, T., Zhang, Z., Hesslein, D. G. T., Yin, Z., Kano, A., Iwamoto, Y., Li, E., Craft, J. E., Bothwell, A. L. M., Fikrig, E., Koni, P. A., Flavell, R. A., Fu, X.-Y.: STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of STAT3 in innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Science* Vol. 100 No. 4, 1879-1884 (2003)

Wiedemann, Ch., Schulz, H., Weber, B.: Quantitative Real-Time PCR- Eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum* 1, 99-102 (2004)

Wirthner, D., Germond, M., de Grandi, P.: Die prämatüre Menopause. *Journal für Menopause* 1, 14-20 (2000)

-
- Wieacker, P.: Genetische Ursachen der primären Ovarialinsuffizienz. *Reproduktionsmedizin* 18, 124-130 (2002)
- Wieser, F., Wenzl, R., Taylor, R. N., Diedrich, K., Hornung, D.: Genetik der Endometriose. *Der Gynäkologe* 37, 676-680 (2004)
- Wu, M-Y., Ho, H-N.: The Role of Cytokines in Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology* Vol. 49, 285-296 (2003)
- Wülfig, P., Kiesel, L.: Aromataseinhibitoren zur Therapie der Endometriose?. *Der Gynäkologe* 38, 326-332 (2005)
- Yoo, J.-Y., Huso, D. L., Nathans, D., Desiderio, S.: Specific Ablation of Stat3β Distorts the Pattern of Stat3-Responsive Genes Expression and Impairs Recovery from Endotoxic Shock. *Cell* Vol. 108, 331-344 (2002)
- Yuang, Z.-l., Guan, Y.-j., Chatterjee, D., Chin, Y. E.: Stat3 Dimerization Regulated by Reversible Acetylation of a Single Lysine Residue. *Science* Vol. 307, 269-273 (2005)
- Ziegler de, D., Meldrum, D. R.: Kontroverse Hormontherapie-von In-Vitro-Fertilisation (IVF) zur Menopause: von der IVF mit Spenderei adaptierte physiologische Hormonsubstitution ist vielleicht die beste Option in der Hormontherapie. *Journal der Menopause* 1, 35-37 (2005)
- Zollner, U., Steck, T.: „Lowresponder“ in der In-vitro-Fertilisation Vorhersage der vorzeitigen Menopause?. *Gynäkologische Endokrinologie* Vol. 1 No. 3, 108-114 (2003)

C. Internetseiten

Dorak, M. T.: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>, page 1-10, Stand 08.12.2004

Novosad, J. A., Kalantaridou, S. N., Tong, Z., Nelson, L. M.: Ovarian antibodies as detected by indirect immunofluorescence are unreliable in the diagnosis of autoimmune premature ovarian failure: a controlled evaluation. <http://www.biomedcentral.com/1472-6874/3/2>, page 2-8 (2003)

D. Leitlinien und Gesetze

AWMF-Leitlinien online Register Nr. 015/ 038:

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) Konsens mit dem Berufsverband der Frauenärzte: Konsensusempfehlung zur Hormontherapie (HT) im Klimakterium und in der Postmenopause. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/015-038.htm>, Stand 25.02.2005

AWMF-Leitlinien online Register Nr. 016/ 003:

Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Psychosomatische Frauenheilkunde und Geburtshilfe (DGPFH), Deutsche Gesellschaft für Psychotherapeutische Medizin (DGPM), Deutsche Gesellschaft für Psychoanalyse, Psychotherapie, Psychosomatik und Tiefenpsychologie (DGPT), des Deutschen Kollegium für Psychosomatische Medizin (DKPM) und der Allgemeinen Ärztlichen Gesellschaft für Psychotherapie (AÄGP): Psychosomatisch orientierte Diagnostik und Therapie bei Fertilitätsstörung. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/pggyn0003.htm> , Stand 17.02.2003

Embryonenschutzgesetz 1990:

Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz-EschG), in der Fassung der Bekanntmachung vom 13. Dezember 1990-BGBl. I S. 2747, § 1, <http://www.bba.de/gentech/eschg.htm>, Stand 11.10.2005

XII. Anhänge

A. Photometrische Konzentrationsbestimmung RNA

Gruppe	Probe	Konzentration $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	x μl (~ 1 μg)
Kontrollen	1	0.366	2.78
	2	0.758	1.32
	3	0.764	1.32
	4	0.33	3.04
	5	0.21	4.77
	6	0.474	2.11
	7	0.22	4.55
	8	0.198	5.06
	9	0.528	1.92
	10	0.18	5.56
	11	0.368	2.78
	12	0.546	1.85
	13	0.596	1.68
	14	0.778	1.29
	15	0.18	5.56
	16	1.152	8.68 (1:10)
	17	0.122	8.2
	18	0.304	3.3
	19	0.346	2.9
Endometriose	1	0.33	3.04
	2	0.354	2.83
	3	0.558	1.8
	4	0.166	6.03
	5	0.602	1.67
	6	0.11	9.1
	7	0.14	7.15
	8	0.092	10.87
	9	0.106	9.44
	10	0.098	10.2
	11	0.13	7.7
POF	1	0.234	4.28
	2	0.312	3.21
	3	0.116	8.62
	4	0.727	4.28

B. Rohdaten Real-Time PCR (Housekeeping-Gene)

Gruppe	Probe	SDHA		TBP	
		C(t)	Moleküle	C (t)	Moleküle
Kontrollen	1	23.6940	10357.4000	27.382	10131.6
		23.9310	8778.2400	27.085	12474.2
		23.7240	10143.6000	27.138	12019.6
	2	24.5610	5651.0400		
		23.6050	11022.2000		
		23.7390	10034.6000		
	3	29.7410	151.7000		
		None	N/A		
		30.0250	124.4410		
	4	23.3400	13264.4000	25.419	40045.5
		23.6660	10561.8000	25.282	44076.1
		23.4310	12445.1000	25.411	40262.9
	5	24.1220	7680.5700	27.232	11247.7
		24.0460	8100.4300	26.653	16879
		30.8100	71.8769	26.641	17014.4
	6	22.5150	23596.6000	26.278	21952.5
		22.1480	30495.6000	26.204	23118.7
		22.4050	25478.2000	26.186	23409.7
	7	23.5120	11763.6000	26.647	16948.2
		23.8790	9102.6900	26.805	15169.1
		23.6850	10419.2000		
	8	24.3660	6479.0000	26.548	18160.2
		24.3370	6609.7900	26.126	24408.1
		24.4830	5969.3100	25.987	26908.8
	9	24.8380	4658.6300	27.927	6913.57
		25.2160	3578.1000	27.913	6984.49
		24.8660	4568.9200	27.75	7827.77
	10	25.9830	2094.1400	28.212	5665.73
		25.7400	2480.2200	28.235	5574.9
		25.9660	2117.9900	28.515	4582.05
	11	23.8850	9062.9200	26.254	22324.5
		23.8860	9058.0800	26.296	21675.4
		23.9990	8369.4600	26.044	25843.7
	12	23.7710	9811.9400		
		24.1790	7382.9900		
		23.8780	9109.9700		
13	23.0030	16779.4000			

	23.1630	15006.5000		
	23.1720	14912.5000		
14	22.4850	24090.3000		
	22.5560	22928.4000		
	23.0440	16309.4000		
15	24.2430	7057.5400		
	24.4190	6241.6300		
	24.3350	6618.7100		
16	24.0720	7952.1200	26.806	15166.4
	24.4970	5909.9900	26.75	15770.5
	24.0480	8086.5000	26.611	17376.1
17	24.0400	8135.7200	26.474	19127.7
	23.7160	10198.3000	26.594	17586.1
	23.7670	9840.1800		
18	23.3660	13022.5000	26.919	14009
	23.6040	11031.8000	27.323	10559.3
	23.5800	11218.9000	27.39	10072.6
19	25.7950	2388.0200	27.612	8622.8
	25.9170	2193.1100	27.925	6925.44
	25.7000	2551.6700	27.753	7813.19

Endometriose	1	23.88	9285.44	25.728	29966.1
		23.803	9786.75	25.73	29926.9
		23.86	9414.08	25.738	29754.8
	2	23.071	16214.8	26.184	21442
		23.09	16005.9	26.341	19103.6
		23.194	14898	26.507	16909.5
	3	27.516	756.805	29.215	2317.35
		27.387	827.304	29.639	1697.83
		27.162	966.422	29.545	1817.88
	4	24.514	5997.76	27.171	10386.5
		25.201	3733.02	27.511	8091.15
		24.457	6236.22	27.264	9701.81
	5	24.049	8262.78	26.385	18504.5
		24.095	8006.18	26.439	17780.5
		23.78	9942.16	26.574	16100.6
	6	24.289	7000.8	27.506	8125.68
		23.381	13089.5	27.375	8941.45
		23.732	10281.8	27.548	7874.33
	7	26.416	1615.91	28.061	5406.03
		26.794	1244.85	28.543	3795.63
		25.54	2956.54	28.619	3588.48

8	27.13	987.925	27.583	7679.46
	27.128	988.886	27.919	5999.09
	27.516	756.935	27.95	5866.21
9	28.691	336.7	29	2712.62
	27.907	578.109	29.572	1782.19
	27.624	702.593	29.297	2180.96
10	30.296	111.359	31.743	362.239
	30.244	115.467	31.365	478.104
	30.259	114.296	32.207	257.573

POF	1	22.344	20461	25.028	33906.2
		22.526	18055.1	25.043	33552.4
		22.342	20488.6	25.53	23967.8
	2	21.8	29778.2	25.293	28221.9
		22.317	20847.3	26.92	9164.04
		21.784	30113.1	25.499	24474.4
	3	23.233	14504.5	25.059	48946.9
		22.263	28297	25.831	27787.2
		4.572	5.60E+09	25.982	24875
	4	24.133	7794.65	26.014	24290.2
		24.564	5793.28	26.637	15369.1
		24.303	6932.85	27.094	10992.1

(Werte ausgeschlossen)

C. Rohdaten Real-Time PCR (Kandidatengene)

Gruppe/ Probe	FOXO 3a		STAT 3		PIAS X	
	C (t)	Moleküle	C (t)	Moleküle	C (t)	Moleküle
Kontrollen						
1	24.554	12641.6	24.192	8358.13	26.987	777.961
	24.938	9652.34	23.434	13758	27.232	650.967
	24.2	16206.1	24.192	8358.51	27.017	761.083
2	24.489	13232.9	24.827	6235.34	26.667	634.017
	24.039	18148.3	25.278	4092.66	27.883	405.741
	24.494	13181.5	25.396	4326.71	27.665	475.468
3	28.112	1040.45	27.532	929.858	28.134	210.497
	28.951	720.344	27.921	855.802	28.441	167.21
	28.404	847.239	27.383	1025.6	28.431	168.493
4	22.669	47475.4	21.688	43349	24.28	5557.01
	23.551	25557.9	21.65	44442.1	24.554	4551.78
	23.778	21798.4	21.841	39205.9	24.118	6248.46
5	24.083	17600.8	24.466	6978.96	26.87	846.682
	25.03	9049.78	23.524	12961.1	26.974	785.472
	24.957	9528.38	24.205	8284.85	26.932	809.705
6	23.702	22990.4	22.805	20798.7	25.723	1948.6
	23.368	29058.1	22.228	30395.2	25.422	2424.44
	23.298	30538.8	22.481	25741.5	25.594	2139.46
7	22.716	45920.9	23.119	16921.7	25.69	1994.83
	23.682	23318.3	22.965	18721.1	26.341	1243.54
	23.202	32660.9	22.766	21336.6	25.481	2322.1
8	24.694	11456.4	23.273	15292.4	26.069	1515.32
	23.625	24267.5	22.69	22432.4	25.84	1790.05
	24.4	14087.8	23.141	16681.3	25.873	1747.35
9	26.025	4500.14	24.819	5533.88	28.075	352.998
	25.959	4713.27	24.984	4964.13	27.48	543.843
	25.088	8689.34	None	N/A	27.612	494.009
10	26.088	4305.3	25.165	4408.48	27.159	686.794
	25.024	9087.15	25.416	3738	26.614	1019.98
	25.174	8180.61	25.323	3973.34	26.589	1038.73
11	24.653	11796.9	23.589	12419.5	25.162	2928.11
	24.076	17680.6	23.444	13661.9	24.753	3941.15
	23.788	21649.9	22.479	25760.7	24.982	3335.67
12	23.971	19034.2	23.295	15066.8	24.952	3409.34

	23.804	21401.4	23.165	16417.9	25.503	2284.96
	23.607	24576.3	22.806	20787.2	25.2	2848.78
13	24.155	16733.3	22.46	26086.6	25.604	2123.57
	24.402	14068.4	23.191	16132.6	25.679	2011.15
	24.254	15605.2	23.065	17526.3	25.46	2358.58
14	23.692	23158.1	21.248	57896	23.722	8334.22
	24.417	13921	20.294	108357	24.08	6425.81
	24.02	18385.3	20.412	100299	23.721	8336.01
15	23.754	22172.9	22.373	27620.3	24.528	4640.05
	23.814	21257.5	22.834	20405.1	24.508	4706.77
	23.968	19078.5	22.199	30972.3	24.842	3693.56
16	24.282	15300.3	22.46	26090.8	25.193	2862.85
	24.767	10887.7	22.903	19500.5	25.024	3236.9
	24.243	15724.6	22.292	29133.9	24.894	3557.36
17	23.84	20861.2	22.908	19438.7	25.866	1755.88
	23.167	33477.7	23.188	16174	25.437	2397.18
	21.909	80954.5	23.086	17292.6	25.644	2063.91
18	24.158	16692.2	23.245	15572.8	25.988	1607.17
	23.655	23768.7	23.047	17738	25.409	2447.97
	23.291	30675.3	22.831	20441.4	25.254	2739.42
19	25.268	7655.66	24.454	7032.37	26.728	939.32
	25.229	7869.14	24.305	7757.35	27.041	748.13
	25.153	8299.28	23.549	12749.1	26.59	1038.26

Endometriose

1	24.407	15938.8	23.076	19175.2	24.472	3297.03
	24.744	12666.5	23.059	19392.1	24.442	3371.43
	24.489	15071.8	23.36	15978.8	24.242	3918.73
2	23.838	23477.7	22.311	31338.2	24.592	3012.73
	24.11	19510.8	22.388	29824.9	24.627	2935.66
	24.177	18634.9	21.871	41565.4	24.474	3292.48
3	27.832	1544.94	25.225	4827.1	27.996	233.572
	28.105	1282.67	25.086	5279.48	27.407	363.435
	27.962	1414.01	24.539	7498.97	27.292	396.423
4	25.946	5582.45	22.798	22930.9	25.422	1614.96
	25.955	5550.7	22.638	25404	25.38	1666.4
	25.93	5645.03	22.681	24710.5	25.348	1707.51
5	24.512	14834.6	23.412	15462	25.518	1502.11
	24.556	14399	23.104	18833.4	25.099	2057.84
	24.402	15985.4	23.517	14451	25.169	1953.69
6	26.238	4576.96	24.215	9230.77	25.483	1543.09

	26.038	5245.6	23.803	12031.6	25.241	1850.7
	26.258	4515.35	24.308	8700.58	25.342	1715.35
7	25.454	7804.54	22.485	28035	25.916	1114.41
	25.461	7768	22.546	26946.6	25.811	1206.1
	25.425	7965.55	23.142	18387.5	25.886	1139.32
8	27.33	2174.85	25.31	4571.47	26.896	533.838
	27.528	1900.35	25.03	5473.48	27.175	432.784
	26.973	2773.74	25.199	4909.33	26.904	530.585
9	28.68	866.635	26.65	1935.04	27.404	364.255
	27.812	1566.08	25.727	3499.56	27.496	340.027
	28.381	1062.51	26.464	2180	27.611	312.016
10	29.302	567.393	28.405	626.987	29.281	88.926
	29.624	455.463	28.768	496.705	26.372	791.154
	29.545	480.719	27.548	1087.11	28.729	134.718

POF

1	22.514	40896.1	21.463	48210.5	23.878	6008.06
	22.527	40555.1	21.983	34713.4	23.89	5955.22
	22.736	35268.8	21.952	35391.5	24.255	4570.8
2	21.943	59854.4	21.406	49985.3	23.957	5674.61
	22.04	56092.4	21.51	46806	24.349	4267.53
	22.104	53741	21.687	41841.5	24.253	4577.17
3	22.549	56520.8	21.256	61686.6	23.631	6202.73
	22.324	65893.5	21.661	47576.2	23.205	8538.68
	22.139	74702.5	21.61	49142.1	23.033	9716.79
4	25.322	8541.75	23.222	17464	24.859	2464.49
	25.092	9992.84	23.021	19872.6	24.604	2986.4
	25.077	10094.6	23.033	19717.2	24.681	2818.22

(Werte ausgeschlossen)

D. Internetrecherche

<i>Homepage</i>	<i>Funktion</i>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Genomrecherche Sequenzvergleiche Nucleotididentifizierung Literaturrecherche
http://pga.mgh.harvard.edu	Primerbank
http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi	Primerbank
http://www.metabion.com	Primerbestellung/-lieferung
https://ecom.mwgdna.com	Sequenzierung

E. Primersequenzen

<i>Gen</i>	<i>Name</i>	<i>Chromosom</i>	<i>Nucleotid</i>	<i>Richtung</i>	<i>Primersequenz 5' ® 3'</i>	<i>Länge (bp)</i>
TBP	TATA box binding Protein	6q27	NM_003194	for 598-618 rev 704-724 rev 900-921	CCA CTC ACA GAC TCT CAC AAC CTG CGG TAC AAT CCC AGA ACT GAC TGT TCT TCA CTC TTG GCT C	127 324
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A	5p15	NM_004168	for 474-496 rev 616-636	GGT CGA GCT AGA AAA TTA TGG CA TAA GGT GTG CAA TAG CGA GTG	163
FOXO 3a	forkhead in rhabdomyo-sarcoma-like 1	6q21	NM_001455	for 1328-1345 rev 1493-1514	GCA AGC ACA GAG TTG GAT GA CAG GTC GTC CAT GAG GTT TT	187
STAT 3	signal transducer and activator of transcription 3	17q21	NM_139276.1	for 1610-1629 rev 1812-1831	ACT CCT TGC CAG TTG TGG TG TCT CTG CCA GTG TAG TCA GC	222
PIAS X ($\alpha+\beta$)	protein inhibitor of activated STAT X	18q12	BC015190.1	for 1515-1534 rev 1761- 1780	CCT TGT TCA GTG ACT GTA GC ATT GGC GTA TGG TGG AAT GG	266
β - Actin				for rev	GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C	352

F. Danksagung

Nach zwei Jahren experimenteller Arbeit mit vielen Höhen und Tiefen bietet sich mir hier die Gelegenheit, mich für die vielfältige Unterstützung zu bedanken, die mir von den verschiedensten Seiten zuteil wurde.

Zunächst bin ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Klaus Diedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Schleswig-Holstein / Campus Lübeck, für die Annahme des Themas im April 2004, die großzügige Bereitstellung sämtlicher erforderlicher Materialien und Recherchemöglichkeiten sowie den unabhängigen Zugang zu allen Laboratoriumsräumen zu Dank verpflichtet.

Meinem Betreuer, Dr. Andreas Schröder, danke ich besonders herzlich für seine fortwährende Gesprächsbereitschaft, seine konstruktiven Anregungen und die wohlwollende, nachhaltige Förderung.

Sehr verbunden bin ich auch allen meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor für ihre Hilfsbereitschaft und die stets freundliche Atmosphäre, durch die ich in schwierigen Phasen zum Weitermachen motiviert wurde. Besondere Anerkennung gebührt Barbara Nehls für ihre geduldige Bereitwilligkeit, mich in die Eigenheiten des Laborlebens einzuführen, Constanze Siggel, die mir die Methodik der Real-Time PCR näher brachte, Silke Eisenbeiß, deren helfende Hand mir in der heißen Endphase stets zugute kam und Birte Jablonski für die kritische Durchsicht der Arbeit und ihren aufmunternden Zuspruch.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Biometrie und Statistik (Prof. Dr. A. Ziegler) möchte ich mich für die umgehende Beratungsmöglichkeit und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Meinem Freund Thies danke ich für seine tatkräftige Hilfe in Formatierungsfragen. In dieser turbulenten Zeit war er der beständige Ruhepol an meiner Seite und gab mir ermutigenden Rückhalt und Zuversicht, wann immer es nötig war.

Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir nicht nur diese Ausbildung ermöglicht, sondern mich auf meinem Weg voller Fürsorge und Hingabe begleitet haben. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

Christiane Mohr

Lübeck, im April 2006