

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

# **Untersuchungen zur Expression und Regulation der Galektine 1 und 3 im Endometriosegewebe und in Endometriumskarzinomzellen in vitro**

DISSERTATION  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Elisabeth Christina Humpert** [YV"; Y]hYf  
aus  
Wasserburg am Inn  
201,

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: DfcZ"8f"8cf]g'A Umfi  
DfcZ"8f"6^ fb @Ua dY'

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: %%"\$"&\$%

Meinen Eltern gewidmet

## Living Life Curled Up

I'm curled up again.  
With heat on my tummy.  
Not like a slumbering cat  
By a fire.  
But like a wounded animal  
In a trap.

I keep thinking,  
It won't always be this way.  
I see strong women.  
Doing the things I wish I could.  
For now, though,  
It has to be enough.  
To do the things I can.  
Living life curled up  
With heat on my tummy.

"In its worst stages, this disease affects the well-being of the female patient totally and adversely, her whole spirit is broken, and yet she lives in fear of still more symptoms such as further pain(...)"<sup>1,2</sup>

Louis Brotherson, schottischer Arzt, 1776

„Millionen Frauen leiden weltweit in ihren fruchtbaren Jahren unter einer gutartigen Krankheit mit eindeutigen Tumoreigenschaften, die das Leben und die Träume einer Frau, ihre Partnerschaft oder ihre Familie, die Sexualität und die berufliche Entwicklung durch Schmerzen und Unfruchtbarkeit überschatten und auch zerstören kann.“<sup>3,4</sup>

Aus „Endometriose – ein Wegweiser für die Praxis“, 2014

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Hinführung zum Thema .....	1
1.2	Definition der Endometriose .....	1
1.3	Epidemiologie .....	3
1.4	Geschichte .....	4
1.5	Pathogenese .....	5
1.5.1	Implantationstheorie nach Sampson .....	5
1.5.2	Metaplasietheorie nach Meyer .....	7
1.5.3	Archimetra-Konzept .....	8
1.5.4	Theorie von Denervierung und Reinnervation .....	11
1.5.5	Umwelt- und genetische Faktoren .....	12
1.6	Symptome .....	12
1.7	Diagnostik .....	13
1.7.1	Diagnostische Maßnahmen .....	13
1.7.2	Stadieneinteilung .....	14
1.8	Therapieansätze .....	14
1.8.1	Konservativ .....	14
1.8.2	Operativ .....	15
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
3.1	<b>Immunhistochemie: Detektion von Galektin-1 und Galektin-3 im Endometriosegewebe, Ovarstroma und Endometrium</b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Vorbemerkung .....	18
3.1.2	Gewebeproben .....	18
3.1.3	Reagenzien und Materialien .....	20
3.1.4	Methode: Herstellung und Färbung der Gewebepreparate .....	22
3.2	<b>Zellkultur und Immunzytochemie: Stimulation von Endometriumskarzinomzellen in vitro mit Corticotropin Releasing Factor (CRF) und anschließende Detektion von Galektin-1</b> .....	<b>28</b>
3.2.1	Modellzelllinien .....	28
3.2.2	Reagenzien und Materialien .....	29

3.2.3	Methode: Zellkultur, Stimulation mit CRF und immunzytochemische Färbung.....	32
<b>3.3</b>	<b>Evaluation und statistische Auswertung .....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistochemie: Downregulation von Galektin-1 im Endometriosegewebe.....</b>	<b>38</b>
4.1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	38
4.1.2	Expression von Galektin-1 im Endometriosegewebe.....	39
4.1.3	Expression von Galektin-1 im Ovarstroma .....	40
4.1.4	Expression von Galektin-1 im Endometrium .....	41
4.1.5	Expression von Galektin-3 im Endometriosegewebe.....	42
4.1.6	Expression von Galektin-3 im Ovarstroma .....	44
4.1.7	Expression von Galektin-3 im Endometrium .....	44
<b>4.2</b>	<b>Zellkultur und Immunzytochemie: CRF als Regulator der Galektin-1-Expression von Endometriumskarzinomzellen in vitro .....</b>	<b>47</b>
4.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	47
4.2.2	Galektin-1-Expression der Ishikawa-Zellen nach CRF-Stimulation .....	47
4.2.3	Galektin-1-Expression der HEC-1B-Zellen nach CRF-Stimulation .....	49
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung der Versuche .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2</b>	<b>Überblick über die Molekülgruppe der Galektine .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Galektin-1 und auffällige Immunparameter bei Endometriose .....</b>	<b>56</b>
5.3.1	Überblick .....	56
5.3.2	Reifestörung der Dendritischen Zellen .....	56
5.3.3	Veränderte Makrophagen .....	58
5.3.4	T-Lymphozyten im Bereich der Endometrioseläsionen.....	60
5.3.5	Relative Zunahme regulatorischer T-Lymphozyten.....	61
5.3.6	Verminderte Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen.....	63
<b>5.4</b>	<b>Galektin-3 und Endometriose .....</b>	<b>65</b>
<b>5.5</b>	<b>Endometriose und Stress .....</b>	<b>66</b>
5.5.1	Die Bedeutung von Stress für die Entstehung von Krankheiten .....	66
5.5.2	Endometriose als chronischer Stressor.....	67
5.5.3	Stimulation von Modellzellen mit Corticotropin Releasing Factor (CRF).....	68

6	ZUSAMMENFASSUNG .....	71
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	73
8	TABELLENVERZEICHNIS .....	74
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	75
10	LITERATURVERZEICHNIS .....	76
11	CURRICULUM VITAE .....	86
12	DANKSAGUNG .....	87
13	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....	88

## **1 Einleitung**

### **1.1 Hinführung zum Thema**

Seit Jahrzehnten versuchen Wissenschaftler die Pathogenese der Erkrankung Endometriose aufzuklären und effektivere Therapiestrategien zu entwickeln. Als „geheimnisvolle Krankheit“ und „verkanntes Frauenleiden“ wurde die Endometriose dabei immer wieder betitelt. Die dieser Arbeit vorangestellten, teilweise historischen Textpassagen gewähren Einblick in die Krankheitsproblematik. Sie zeigen auch, dass Frauen wohl schon vor Jahrhunderten unter der Erkrankung litten, wenngleich sie erst seit dem 20. Jahrhundert durch die Einführung neuer Untersuchungs- und OP-Techniken sicher zu diagnostizieren ist.

Bei der Versuchsplanung dieser experimentellen Arbeit standen immunologische Überlegungen zur Pathogenese der Endometriose und der Effekt von Stress auf den Krankheitsprozess im Mittelpunkt.

Zunächst wurde die Expression der für Immunprozesse bedeutsamen Proteine Galektin-1 und Galektin-3 im Endometriosegewebe verglichen mit ihrer Expression im Ovarstroma bzw. im eutopen Endometrium nicht erkrankter Frauen. Im zweiten Schritt erfolgte dann anhand geeigneter Modellzelllinien eine Untersuchung zum Einfluss des Stresshormons Corticotropin Releasing Factor (CRF) auf die Galektin-1-Expression von Endometriosezellen.

Die folgende Einleitung gibt einen allgemeinen Überblick über die Krankheit Endometriose.

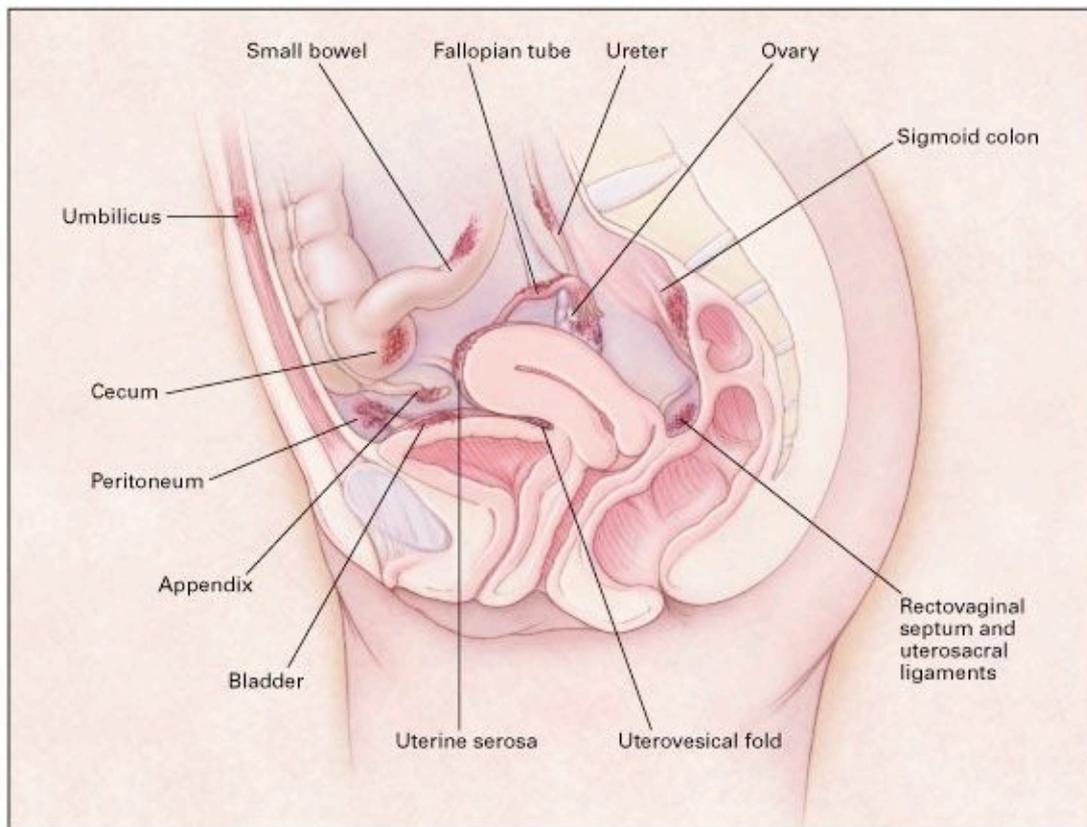
### **1.2 Definition der Endometriose**

„Als Endometriose wird das Vorkommen endometriumartiger Zellverbände außerhalb des Cavum uteri bezeichnet. Leitsymptom ist der Unterbauchschmerz, häufig besteht Sterilität. Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen, die ganz überwiegend in der Geschlechtsreife auftritt und als östrogenabhängig gilt. (...) Die Endometriose verursacht eine bemerkenswerte Morbidität.“<sup>5</sup> – so bringen es die Verfasser der Leitlinie „Diagnostik und Therapie der Endometriose“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) auf den Punkt.

Tritt endometriales Drüsengewebe und Stroma außerhalb der Gebärmutterhöhle und damit an unphysiologischer Stelle auf, so spricht man von Endometriose. Häufige Manifestationsorte sind die Ovarien, das Beckenperitoneum, der Bandapparat, durch den die Gebärmutter in ihrer Lage gehalten wird, sowie das Septum rectovaginale, die bindegewebige Trennwand zwischen Vagina und Mastdarm. Seltener finden sich Endometrioseherde auch auf Darm, Blase, im Bereich der pelvinen Lymphknoten, in Zervix, Vagina, Eileiter oder sogar an so entfernten Organen wie Lunge, Haut, Nieren, Gehirn oder Rückenmark.<sup>6-8</sup> Unter dem Mikroskop imponiert das Gewebe durch Drüsenanteile, die eingebettet sind in endometriumähnliches Stroma.<sup>9</sup> Darüberhinaus finden sich gerade im Fall der tiefinfiltrierenden Endometriose Komponenten glatter Muskulatur<sup>10</sup>, die vermutlich durch Metaplasie (siehe 1.5.2) entstehen. Angiogenese und Neuinnervation sind Phänomene, die sich im Bereich der Erkrankungsherde beobachten lassen.<sup>11,12</sup>

Abhängig von der Lage des unerwünschten Gewebes werden drei Typen der Endometriose unterschieden: <sup>13-15</sup>

- a. ***Endometriosis genitalis externa (ca. 60%)***: Endometrioseherde, die *innerhalb* des kleinen Beckens aber *außerhalb* des Uterus vorkommen. Mögliche Lokalisationen sind neben den Ovarien beispielsweise die Ligamenta sacrouterina, das Peritoneum von Douglasraum und Blase sowie Vagina, Vulva oder Perineum.
- b. ***Endometriosis genitalis interna (ca. 30%)***: Die Endometrioseherde befinden sich innerhalb des Myometriums (Adenomyosis uteri interna) oder der Eileiter (Salpingitis isthmica nodosa).
- c. ***Endometriosis extragenitalis (ca. 5-10%)***: Hierunter fallen alle Endometrioseherde *außerhalb* der Geschlechtsorgane, d.h. in Blase, Ureteren, Darm, Leiste, Nabel, Lunge, Gehirn usw.

**Abbildung 1: Lokalisation abdomineller Endometrioseherde<sup>16</sup>**

Quelle: Olive, D.L. & Pritts, E.A. Treatment of endometriosis. *The New England journal of medicine* 345, 266-275 (2001)

### 1.3 Epidemiologie

In der Literatur finden sich zur Prävalenz der Endometriose meist Angaben von um die 5-15%. Die AWMF beziffert in ihrer Leitlinie die Zahl der Neuerkrankungen allein in Deutschland auf etwa 40.000 pro Jahr.<sup>5</sup> Ca. 100 Millionen Frauen leiden derzeit weltweit an Endometriose.<sup>1</sup> Die volkswirtschaftlich relevanten Kosten der Erkrankung werden deutlich höher angesetzt als die von Morbus Crohn oder Migräne, die bereits sehr viel besser erforscht und verstanden sind.<sup>1</sup> Dennoch ist es nach wie vor schwierig, eine exakte Aussage über die Prävalenz der Endometriose zu treffen. In Abhängigkeit von der jeweiligen Studienpopulation ergeben sich Werte zwischen 4% (asymptomatische Frauen, die sich einer Tubenligatur unterzogen) und 50% (Teenager mit behandlungsresistenter Dysmenorrhoe).<sup>17</sup> Zum Teil liegen den Untersuchungen Gruppen zugrunde, die sich bereits mit entsprechenden Symptomen in einer gynäkologischen Tagesklinik vorstellen, in anderen Fällen

handelt es sich um Populationen mit Infertilitätsproblemen und wieder andere Studien stützen ihre Ergebnisse ausschließlich auf ein Kollektiv asymptomatischer, fertiler Frauen.<sup>17-19</sup> Neben dem Studiendesign besteht ein weiteres Problem der epidemiologischen Aufarbeitung der Endometriose darin, dass die Erkrankung derzeit nur im Rahmen von Laparoskopie oder Laparotomie mit letzter Sicherheit diagnostiziert werden kann. Der Weg vom Erkrankungsverdacht bis zur Durchführung der notwendigen operativen Diagnostik ist meist lang. Weniger invasive Untersuchungen wie Ultraschall und Hysteroskopie, aber auch Laparoskopien mit falsch negativem Befund lassen Zeit verstreichen. Erkrankte Frauen ohne oder mit lediglich unspezifischen Symptomen und konservative Therapieversuche ohne definitive Diagnose verfälschen ebenfalls die Statistik.

Beim Bemühen darum, ein repräsentatives Studiendesign zu wählen, das endlich eine realistische Einschätzung der Prävalenz der Endometriose in der Allgemeinbevölkerung ermöglicht, wurden in den letzten Jahren deutlich niedrigere Werte angegeben als bisher, unter anderem um die 1,5%.<sup>20,21</sup> Eine Kölner Studie aus dem Jahr 2012 kommt gar auf Werte von 0,8% der Frauen im Alter zwischen 15 und 54 Jahren bzw. 1,3% bei den 35- bis 44-jährigen.<sup>22</sup>

In jedem Fall problematisch bleibt die Tatsache, dass die endgültige Diagnose einer Endometriose momentan erst durchschnittlich 9 Jahre nach dem ersten Arztbesuch einer Patientin erfolgt.<sup>21</sup> Im Interesse der betroffenen Frauen wie auch unter volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten werden dringend effektivere Methoden und Abläufe der Diagnosefindung benötigt – zumal mit Fortschreiten der Endometriose eventuelle Langzeitfolgen zunehmen. Die meisten Endometriose-Patientinnen suchen mehr als dreimal ihren Hausarzt auf, bevor dieser sie erstmalig zum Facharzt überweist; und ein Drittel der Betroffenen wird mehr als sechsmal mit den sogenannten Primärsymptomen der Erkrankung (Dysmenorrhoe und/oder tiefe Dyspareunie) vorstellig, bevor schließlich die richtige Diagnose gestellt wird.<sup>21</sup>

#### **1.4 Geschichte**

Moderner Lebensstil, Umweltfaktoren und die industrielle Entwicklung des 20. Jahrhunderts werden gern als mögliche Einflussfaktoren genannt, wenn sich die Frage nach der Entstehung der Endometriose stellt. Wer genauer nachforscht, der erkennt, dass bereits der deutsche Arzt Daniel Shroen im Jahr 1690 eine

Erkrankung beschrieb, die viele Eigenschaften dessen trägt, was wir heute Endometriose nennen.<sup>3,23</sup> Im 18. Jahrhundert folgten weitere Studien zu diesem Phänomen. 1860 beschrieb der Pathologe Carl von Rokitansky den aufsehenerregenden Fall einer ausgeprägten Adenomyosis bei einem jungen Wiener Mädchen.<sup>24</sup> Es folgten sich häufende Berichte namhafter Ärzte und Pathologen, bis der Gynäkologe Cullen zu Beginn des 20. Jahrhunderts schließlich die Gewebeeinseln an unüblicher Stelle eindeutig als endometriale Mukosa identifizierte.<sup>23</sup> Damit legte er den Grundstein für die Haupttheorien über die Pathogenese der Endometriose, die sich in der Folgezeit etablieren sollten.<sup>25</sup>

## **1.5 Pathogenese**

### **1.5.1 Implantationstheorie nach Sampson**

Das heute allgemein am besten akzeptierte Konzept der Endometrioseentstehung ist die sogenannte Implantations- oder Transplantationstheorie. Sie beruht auf der Beobachtung, dass es während der Menstruation physiologischer Weise zum Reflux endometrialen Gewebes durch die Eileiter kommt – man spricht von „retrograder Menstruation“. Auf diesem Weg gelangen Zellen aus dem Inneren der Gebärmutter in die Bauchhöhle und implantieren sich dort – der Theorie folgend - im Peritoneum.<sup>26</sup> Für die Implantationstheorie sprechen mehrere Punkte: So ist der Rückfluss endometrialer Zellen durch die Tuben ein universelles Phänomen, das bei 90% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter während der Menstruation auftritt.<sup>27,28</sup> Zudem konnte gezeigt werden, dass eine mechanische Obstruktion des normalen Menstruationsabflusses (wohl aufgrund eines dadurch vermehrten retrograden Flusses durch die Eileiter) eine Endometriose eindeutig begünstigt.<sup>29,30</sup> Endometriales Gewebe wird im Bauchraum häufiger und in größerem Umfang während der Follikelphase (im Anschluss an die Regelblutung) gefunden als während der Lutealphase.<sup>31</sup> Auch unter Berücksichtigung der genauen Lokalisation peritonealer Endometrioseherde scheinen die Eileiter als zuführender Transportweg plausibel.<sup>32,33</sup> Darüberhinaus beeinflusst die individuelle Beckenanatomie von Patientinnen Verteilung und Häufigkeit der Läsionen im Peritoneum.<sup>34</sup>

Untersucht man abgestoßene Endometriumzellen, die gegen Ende der Menstruation entnommen wurden, so erweisen sich diese als optimal ausgerüstet für eine Implantation im Bauchfell: Sie sind vital, besitzen proliferative Kapazität<sup>25</sup>

und exprimieren an ihrer Oberfläche Integrine, die eine Adhäsion am Peritoneum ermöglichen.<sup>35</sup> Endometriales Gewebe (v.a. die extrazelluläre Matrix), das über die Eileiter in den Bauchraum gewandert ist, exprimiert Metalloproteinasen, die es befähigen, Basalmembran abzubauen.<sup>25</sup> Außerdem produziert es angiogene Faktoren, die für die Neovaskularisation benötigt werden.<sup>25</sup>

Ovarielle Endometriosezysten entstehen nach der Implantationstheorie dadurch, dass retrograd menstruierte Zellen auf dem Ovar haften bleiben. Dort bilden sie über Inversions- und Invaginationsprozesse der Organoberfläche eine intraovarielle Endometrioseläsion, die sich durch zyklische Blutung zur Zyste weiterentwickelt.<sup>36</sup>

Wertvolle Erkenntnisse zur Erklärung tiefinfiltrierender und weit vom Fimbrientrichter entfernter Läsionen liefern Studien aus der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts: Sie führen derartige Formen der Endometriose zurück auf hämatogene und lymphatische Dissemination. So fand bereits Sampson 1927 endometriales Gewebe in den uterinen Venen von Patientinnen mit Adenomyosis<sup>37</sup>; Hobbs gelang es, durch die intravenöse Injektion endometrialer Zellen eine pulmonale Endometriose in Hasen zu induzieren<sup>38</sup>; und Javert wies zu Beginn der 1950er Jahre im Rahmen einer Untersuchung lymphadenektomierter Frauen bei etwa 6% eine Endometriose in den entnommenen Lymphknoten nach.<sup>39</sup> Damit ist die Implantationstheorie ein zufriedenstellendes Konstrukt, um sowohl peritoneale wie ovarielle als auch weit entfernte Endometrioseherde in Lunge und Gehirn nachzuvollziehen. Ebenso wird in ihrem Kontext die seltene Form der Narbenendometriose<sup>40-42</sup> über die Vorstellung von iatrogenen Zellverschleppung oder hämatogener Dissemination verstehbar. Doch bleiben entscheidende Fragen offen: Wenn das Phänomen der retrograden Menstruation bei fast allen Frauen auftritt, weshalb erkranken dann nur vergleichsweise wenige von ihnen an Endometriose? Wieso zeigen einige erkrankte Frauen nur winzige Herde, während andere hauptsächlich unter Zysten leiden und wieder andere bevorzugt tiefinfiltrierende Läsionen aufweisen? Wie entsteht Endometriose bei jungen Mädchen oder Frauen, die (noch) nie menstruiert haben? Wie lässt sich die (äußerst seltene) Endometriose bei Männern erklären? Warum gelang es bis heute nicht, in geeigneten In-vivo-Studien zu zeigen, wie genau man sich die Adhäsion, Proliferation und Gewebeinvasion retrograd menstruiertes Zellen auf mikroskopischer Ebene vorzustellen hat?<sup>43,44</sup> Selbst wenn die retrograde

Menstruation die Grundvoraussetzung für die Entstehung der Endometriose darstellt, so müssen doch in jedem Fall andere Faktoren hinzutreten, die für das „Ob“ und das „Wie“ einer Endometriose (mit)bestimmend sind.

### **1.5.2 Metaplasietheorie nach Meyer**

Der Begriff „Metaplasie“ ist definiert als die Umwandlung eines differenzierten Gewebetyps in einen anderen. Die Metaplasie stellt dabei eine besondere Form der zellulären Anpassung an die Umgebung dar. So führt etwa die chronische Reizung oder Entzündung eines Oberflächenepithels zum Ersatz des vorhandenen Epithels durch ein anderes. Als Beispiel sei genannt der Ersatz des respiratorischen Flimmerepithels durch Plattenepithel bei chronischer Bronchitis. Die Bildung der neuen Zellen geschieht dabei nicht in Form einer direkten „Transdifferenzierung“ der vorhandenen Epithelzellen, sondern durch eine Umstellung des Differenzierungsprogramms der nachwachsenden Zellen und entwickelt sich somit ausgehend von den Stammzellen (Basal- oder Reservezellen) des Epithels.<sup>45</sup>

Die Zölon-Metaplasie-Theorie nach Meyer<sup>46</sup> beruht auf der Vorstellung, dass Zellen, die vom embryonalen Zölon abstammen - wie sie beispielsweise im Uterus, in der Vagina sowie in der mesothelialen Zellschicht von Ovar, Pleura- und Peritonealhöhle zu finden sind - das Potential zur endometrialen Differenzierung in sich tragen. Ausgehend von solchen Zellen könnten sich endometriumartige Zellverbände an unphysiologischer Stelle bilden.<sup>23,47</sup> Auch dieses Modell ist auf peritoneale, ovarielle, tiefinfiltrierende und ungewöhnlich lokalisierte Formen der Endometriose anwendbar. Darüberhinaus bietet es im Gegensatz zur Implantationstheorie die Möglichkeit, präpubertäre<sup>48</sup> Typen und Endometriose bei jungen Mädchen<sup>49</sup> oder bei Frauen zu erklären, die nie menstruiert haben<sup>50,51</sup>. Die wenigen publizierten Fälle von Endometriose bei Männern könnten damit begründet werden, dass aus dem Müllergang zurückgebliebene Zellen unter hormonellem Stimulus eine endometriale Differenzierung erfahren. Wobei zu klären ist, weshalb augenscheinlich sowohl östrogene als auch anti-östrogene Reizsituationen eine solche Endometriose bei Männern auszulösen vermögen.<sup>52,53</sup> Obwohl verschiedene In-vitro- und In-vivo-Studien die Idee der Metaplasie-Induktion unterstützen<sup>54,55</sup>, bleibt offen, welche Stimuli im Einzelnen erforderlich sind, um die pluripotenten Zellen zöloner Abstammung zur endometrialen Ausdifferenzierung anzuregen.

### 1.5.3 Archimetra-Konzept

Das sogenannte Archimetra-Konzept nach Leyendecker et al. sieht eine entscheidende Größe für die Entstehung der Endometriose in intrauterinen Veränderungen<sup>56</sup>. Diese Veränderungen betreffen die innere und phylogenetisch wie ontogenetisch älteste Gebärmutterwandschicht: die Archimetra, bestehend aus Endometrium und der unmittelbar darunterliegenden Muskelschicht, dem Stratum subvasculare.

Abbildung 2: Aufteilung der Uteruswand in Archimetra und Neometra

<b>ENDOMETRIUM</b>	<b>„ARCHIMETRA“</b>
Epithel Stroma	
<b>MYOMETRIUM</b>	
Stratum subvasculare	→ vorwiegend zirkuläre Muskelfasern
	<b>„NEOMETRA“</b>
Stratum vasculare	→ kurze Muskelbündel, dreidimensional angeordnet
Stratum supravasculare	→ vorwiegend in Längsrichtung angeordnet

Die äußere Muskelschicht des Uterus (Neometra) ist nicht-paramesonephrischen Ursprungs. Sie weist während des gesamten Zyklus eine gleichmäßig hohe Expression von Hormonrezeptoren auf und dient vor allem der Expulsion des Fetus beim Geburtsvorgang.<sup>57</sup> Die Archimetra ist paramesonephrischen Ursprungs, d.h. sie entsteht durch ein Verschmelzen der Müllerschen Gänge in der frühen Embryonalentwicklung. Im Verlauf des Zyklus ist sie fundamentalen strukturellen und biochemischen Veränderungen unterworfen.<sup>57,58</sup> Sie erfüllt auf diese Weise wichtige Aufgaben in ganz frühen Phasen der Reproduktion. So lassen sich die Funktionen der Archimetra unter drei Punkten zusammenfassen:

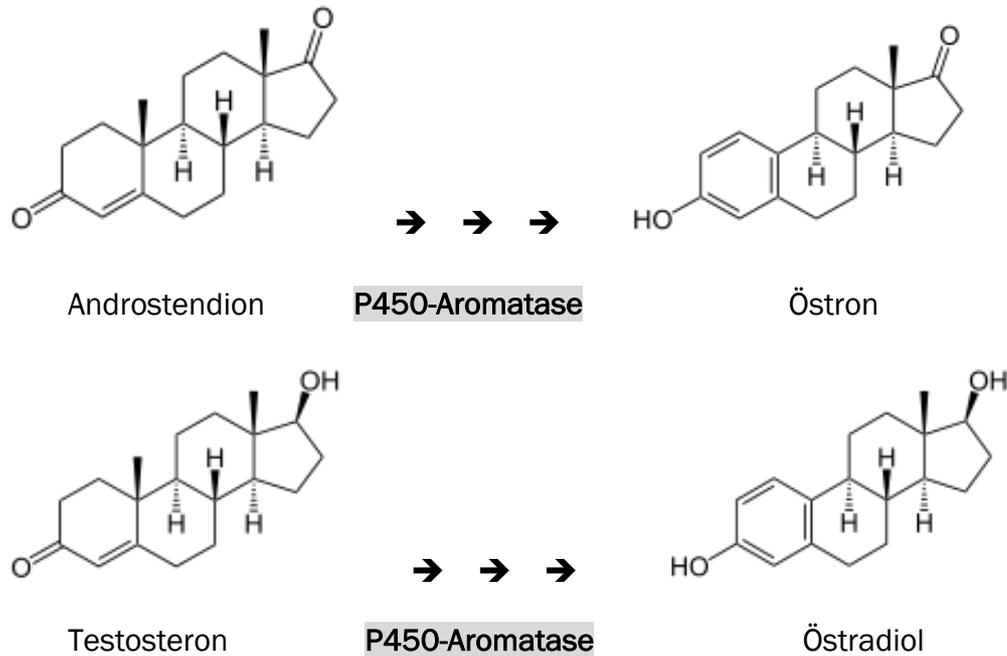
1. Proliferation und Differenzierung des Endometriums in Vorbereitung auf die Implantation des Embryos,
2. uterine Peristaltik zur Unterstützung des gerichteten und schnellen Spermientransports in Richtung der Eileiter und
3. Infektionsabwehr.

Die Endometriose geht einher mit Störungen in jedem dieser drei Bereiche. So kommt es zu

1. proliferativen Prozessen in und außerhalb des Cavum uteri, zu
2. Hyper- und Dysperistaltik der Uteruswand und damit Dysfunktionen im uterinen Spermientransport sowie zu
3. hyperaktiven inflammatorischen Reaktionen auf eutopem wie ektopem Niveau.<sup>56</sup>

Zentraler Punkt des Archimetra-Konzepts ist die Postulierung einer bei Endometriose *lokal* erhöhten Östrogenkonzentration im Gewebe. Nachdem die Erkrankung fast ausschließlich auf die reproduktive Lebensphase von Frauen begrenzt ist und zahlreiche Forschungsergebnisse eine grundsätzliche Östrogenabhängigkeit der Endometriose bestätigen, besteht an der herausragenden Bedeutung dieses Hormons für den Krankheitsprozess kein Zweifel.<sup>59</sup> Zwar unterscheiden sich die Östrogenwerte im Serum von Patientinnen nicht von den Werten gesunder Frauen, doch ist eine zumindest lokale Erhöhung des Hormons anzunehmen: Bei der Endometriose lässt sich eine pathologische Expression der P450-Aromatase im eutopen Endometrium und in ektopen Implantaten beobachten. Dieses Enzym wird im Endometrium gesunder Frauen *nicht* exprimiert.<sup>60,61</sup> Die P450-Aromatase katalysiert die Umwandlung von Androstendion und Testosteron in Östron bzw. Östradiol. Vor diesem Hintergrund und angesichts der Messung erhöhter Östradiol-konzentrationen im Menstruationsblut von Patientinnen mit Endometriose und Adenomyose<sup>62</sup> ist eine lokale Erhöhung der Östrogenkonzentration anzunehmen. Bei gesunden Frauen stößt das vom heranreifenden Follikel produzierte Östrogen in der Archimetra verschiedene Transkriptionskaskaden an, darunter die endometriale Expression von Oxytocin-mRNA und Oxytocin-Rezeptoren.<sup>63</sup> Auf diese Weise unter Östrogeneinfluss freigesetztes Oxytocin bewirkt in der Follikelphase zunehmend hochfrequente und intensive Kontraktionswellen der Archimetra in Richtung des Gebärmutterfundus. Diese Peristaltik erreicht ihr Maximum in der periovulatorischen Phase und unterstützt so den gerichteten Spermientransport zu den Eileiterostien. Während der Lutealphase nimmt die Peristaltik ab und zum Zeitpunkt der Menstruation sind die Kontraktionswellen deutlich in Richtung der Zervix gerichtet, um den Abgang des Menstruationsgewebes zu gewährleisten.<sup>64,65</sup>

Abbildung 3: Von der P450-Aromatase katalysierte Reaktionen



Bei Endometriose-Patientinnen ist dieser physiologische Ablauf gestört: Die Östrogen-Eigenproduktion der Archimetra mithilfe der P450-Aromatase führt über vermehrte Oxytocinfreisetzung zu intensivierter Peristaltik. Hinzu kommt eine Verdickung des Stratum subvasculare bzw. die Infiltration des Stratum vasculare und damit der Neometra durch die Archimetra.<sup>56</sup> Nicht nur die zirkulären Fasern des Stratum subvasculare, sondern auch das kräftige Muskelfasernetz des Stratum vasculare sind nun an den Kontraktionen beteiligt. Eine Erhöhung des basalen intrauterinen Drucks ist die Folge. Hyperperistaltische Bewegungen während der gesamten folliculären Phase gipfeln in der spätfolliculären Phase (unmittelbar vor dem Eisprung) in Dysperistaltik und konvulsiven Kontraktionen des gesamten Uterus, wodurch der gerichtete uterine Spermientransport zusammenbricht.<sup>66,67</sup> Die hyperperistaltischen Wellen der Gebärmutterwand können nach dem Archimetra-Konzept durch erhöhten Transport endometrialer Zellen in die Bauchhöhle eine Endometriose befördern. Zudem ist die Streuung vitaler Zellen in den intraperitonealen Raum hierbei nicht auf eine (möglicherweise gleichzeitig verstärkte) retrograde Menstruation begrenzt, sondern geschieht während des gesamten Zyklus. Die Unterbindung des gerichteten Spermientransports zum Eileiterostium bietet eine mögliche Erklärung für die bei Endometriose gehäuft auftretende Infertilität.

Ergänzend bleibt festzuhalten, dass sich Östrogenstimulus und proliferative wie inflammatorische Prozesse in der Archimetra gegenseitig befördern über die Freisetzung angiogener und anderer Wachstumsfaktoren, Zytokine, Prostaglandine etc. Auch die beschriebene Hyperperistaltik bewirkt durch eine chronische Mikrotraumatisierung des Gewebes proinflammatorische Prozesse - ähnlich jenen Reparaturvorgängen, die nach Schwangerschaft und Geburt in der Archimetra ablaufen.<sup>56</sup>

Die hier vorgestellten Dysfunktionen der Archimetra scheinen wie ein Netz miteinander verwoben – doch den ersten krankheitsauslösenden Schritt lässt auch dieses Pathogenese-Modell vermissen.

#### **1.5.4 Theorie von Denervierung und Reinnervation**

Eine noch relativ neue Theorie zur Entstehung der Endometriose ist die von Denervierung und Reinnervation. Postuliert wird dabei eine primäre Verletzung des Uterus, des ihn unterstützenden Bandapparates bzw. der zuführenden Gefäß-Nerven-Bündel.<sup>68</sup> Diese Gewebsdefekte könnten beispielsweise entstehen beim Geburtsvorgang oder bei wiederholten extremen Valsalva-Manövern (z.B. erschwerte Defäkation). Eine Denervierung der genannten Strukturen sei die Folge. Im Rahmen der Reinnervation komme es dann in den anschließenden 5-10 Jahren zur Proliferation von Nervenfasern im Stroma, zu Mikroneurom-Bildung und perivaskulären Nervenwucherungen. Dieser Reinnervationsvorgang verursache das typische Beschwerdebild mit Dysmenorrhoe, chronischen Unterleibsschmerzen und Subfertilität. Ektope Endometrioseläsionen seien nur ein zusätzliches Phänomen der Erkrankung, welches entstehe, indem sich retrograd menstruierte Zellen auf die Gewebsdefekte gewissermaßen „aufpfropften“<sup>69</sup>. Für die klinische Symptomatik allerdings seien diese ektopen Herde nur von untergeordneter Bedeutung (Blutung in den Peritonealraum). Abhängig vom Entstehungszeitpunkt der intrapelvinen Verletzungen und dem (Nicht-)Vorhandensein retrograder Menstruation während der Heilungsphase komme es zum charakteristischen Bild verschleppten endometrialen Gewebes auf peritonealen Strukturen - oder nicht. Mit diesem Modell ließe sich erklären, weshalb das Ausmaß der ektopen Endometrioseherde und der Schweregrad der Symptome häufig nicht korrelieren.<sup>70</sup>

In ähnlicher Weise vertreten Zhang et al. (2016) mit ihrer Arbeit zur Wirkung aktivierter Thrombozyten auf Endometriosegewebe die These, dass es sich bei Endometrioseherden um Wunden handelt, die einem wiederkehrenden Prozess aus Verletzung und Heilung unterliegen.<sup>71</sup>

### 1.5.5 Umwelt- und genetische Faktoren

Angesichts der komplexen Dysregulationen von östrogenmetabolischen, inflammatorischen und immunologischen Abläufen bei Endometriose stellt sich die Frage, inwiefern Umweltgifte und genetische Faktoren für die Pathogenese der Endometriose relevant sind. Für die in diesem Zusammenhang verdächtigten Dioxine und polychlorierten Biphenyle fehlen nach wie vor geeignete Daten, die eine Verbindung zwischen Stoffexposition und Erkrankung beweisen würden.<sup>72,73</sup> Jedoch zeigen Studien und klinische Erfahrung deutlich eine familiäre Häufung der Endometriose. Auf genetischem Niveau konnte bereits eine Vielzahl von Dysregulationen, etwa in Form von Hyper- oder Hypomethylierung, nachgewiesen werden.<sup>72</sup> Die genetische Komponente und epigenetische Phänomene spielen eine wichtige Rolle im Krankheitsprozess.<sup>74,75</sup>

## 1.6 Symptome

Kardinalsymptome der Endometriose sind **Dysmenorrhoe** (starke prä- und perimenstruelle Schmerzen) und **Dyspareunie** (Schmerzen beim Koitus, v.a. bei Douglas-Endometriose). Fehlt bei einer Patientin die Dysmenorrhoe, sollten andere Differentialdiagnosen genau geprüft werden.<sup>5</sup> Ein Teil der von der Erkrankung betroffenen Frauen ist asymptomatisch. Wie bereits angeklungen korreliert das Stadium der Erkrankung nicht zwangsläufig mit dem Grad der Beschwerden.<sup>76</sup>

Je nach Lokalisation der Endometriose klagen Patientinnen über zyklische Unterbauchschmerzen, Dysurie, Dyschezie, Obstipation, zyklische Hämaturie, blutige Defäkation, prämenstruelle Schmierblutungen, Menorrhagie (Menstrationsdauer > 6 Tage) und Hypermenorrhoe (sehr starke Menstrationsblutung). Große ovarielle und periovarielle Endometriosezysten verursachen persistierende Unterbauchschmerzen. Subfertilität und Sterilität sind zudem Probleme, mit denen sich nicht wenige der erkrankten Frauen konfrontiert sehen. Angesichts der teils unspezifischen Symptomatik ist eine lange Liste möglicher Differentialdiagnosen zu bedenken.

Tabelle 1: Differentialdiagnosen zu Endometriose-typischen Beschwerden

Gynäkologie	Urologie	Gastroenterologie
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prämenstruelles Syndrom</li> <li>- Adnexitis</li> <li>- Verspannung der Beckenbodenmuskulatur</li> <li>- Tumoren der Adnexe, Vulva u.a.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interstitielle Zystitis</li> <li>- Chron. Harnwegsinfekte</li> <li>- Rezidiv./akute Urethritis</li> <li>- Nierensteine</li> <li>- Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie</li> <li>- Urethraldivertikel</li> <li>- Blasenkarzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chronische Appendizitis</li> <li>- Colitis</li> <li>- Divertikulose/Divertikulitis</li> <li>- Colon irritabile</li> <li>- Chron. intermittierende Darmobstruktion</li> <li>- Obstipation</li> <li>- Laktoseintoleranz</li> <li>- Glutenintoleranz</li> <li>- Darmkarzinom</li> </ul>

Entscheidend für die klinischen Beschwerden der Patientin ist der Aktivitätsgrad der Endometriose.

Tabelle 2: Makroskopische Aktivitätskriterien der Endometriose<sup>15</sup>

	Aktiv	Inaktiv
<b>Peritoneale Endometriose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rote Herde</li> <li>- Vesikuläre und polypöse Implantate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schwarzbraune Implantate</li> <li>- Peritonealverdickung</li> </ul>
<b>Ovarielle Endometriose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dünnwandige Zysten mit Begleitentzündung</li> <li>- Livide, eingeblutet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dickwandige fibrotische Zysten</li> <li>- Gelblich, weiß</li> </ul>
<b>Tief infiltrierende Endometriose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffuse Aussaaten</li> <li>- Hypervaskularisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibrotisch, weiß</li> <li>- Nodulär</li> </ul>

## 1.7 Diagnostik

### 1.7.1 Diagnostische Maßnahmen

Aus der großen Zahl von Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik wird ersichtlich, weshalb es häufig so lange dauert, eine Endometriose eindeutig zu erkennen. Umso wichtiger sind geeignete Untersuchungen, mit deren Hilfe an Endometriose erkrankte Frauen rasch identifiziert werden können. Besteht bei einer Frau nach Erhebung der Anamnese der Verdacht auf das Vorliegen einer Endometriose, erfolgt zunächst die vaginale und rektale Untersuchung durch den Gynäkologen. Typisch für die Erkrankung sind dabei schmerzhafte Knoten im Septum rectovaginale und im Douglas-Raum. Ebenso sprechen bläuliche, rote oder braune papilläre Knoten

im hinteren Scheidengewölbe bei der Speculumuntersuchung für eine Endometriose.<sup>77</sup> Definitiv gestellt werden kann die Diagnose nur nach Entnahme einer Gewebeprobe. Bei der diagnostischen Laparoskopie ist mindestens ein Endometriose-typischer Herd zu exzidieren. Die reine Blickdiagnose ohne histologische Sicherung erweist sich in 20-40% („Schokoladenzysten“) bzw. 10-15% (peritoneale Endometrioseherde) als falsch. Die Ultraschalldiagnostik eignet sich *nicht* zur Erkennung kleiner versprengter Erkrankungsherde im Peritoneum. Gut identifizieren lassen sich damit aber die sogenannten „Schokoladenzysten“, deren Inhalt (altes Blut aus endometroider „Menstruation“) sich bei laparoskopischer Eröffnung der Zyste entleert und dabei durch seine charakteristische schokoladenbraune Farbe und sämige Konsistenz besticht.<sup>78</sup>

Gerade bei der tiefinfiltrierenden Endometriose kommen mehr und mehr transvaginaler Ultraschall<sup>79</sup> und Magnetresonanztomografie zum Einsatz. In Abhängigkeit von der Lokalisation der Endometriose können darüberhinaus notwendig werden: Transrektalsonografie<sup>80</sup>, Rektosigmoidoskopie, Zystoskopie, Nierensonografie und i.v.-Urogramm.<sup>3</sup> Ziel ist es, die Erkrankungsherde präoperativ möglichst genau zu lokalisieren und in ihrer Ausdehnung zu begreifen, um den therapeutischen Eingriff optimal planen zu können.<sup>81</sup>

### **1.7.2 Stadieneinteilung**

Am weitesten verbreitet ist die Stadieneinteilung der American Society for Reproductive Medicine, der sogenannte rASRM-Score. In dieses Punktesystem fließen die Endometrioselokalisation im Unterbauch, die Implantatgröße sowie das Ausmaß vorhandener Adhäsionen ein. Es erfolgt eine Einteilung der Erkrankung in 4 Schweregrade (*minimal, mild, moderate* und *severe*).<sup>82</sup>

## **1.8 Therapieansätze**

### **1.8.1 Konservativ**

Die hormonelle Therapie der Endometriose basiert auf der Unterdrückung der östrogenbedingten Proliferation endometrialen Gewebes, der Reduktion der uterosakralen Durchblutung<sup>68</sup> und der Veränderung immunologischer Parameter<sup>83</sup>. So ermöglichen die gängigen konservativen Therapieoptionen für die Endometriose ein zumindest temporäres Zurückdrängen der Schmerzsymptomatik.<sup>84</sup> Zur Anwendung kommen<sup>15,77,85</sup>:

- ⇒ GnRH-Analoga als Kurzzeittherapie (3-6 Monate), evtl. zusätzlich Add-back-Substitutionstherapie mit niedrig-dosiertem Östrogen-Gestagen-Präparat
- ⇒ Ovulationshemmer, am besten gestagenbetont und monophasisch. Für Langzeittherapie geeignet. Einnahme sinnvollerweise bis zum Eintritt von Kinderwunsch, wenigstens aber für 12 Monate.
- ⇒ Alleinige Gestagentherapie
- ⇒ Symptomatische Therapie mit Analgetika

Optimal ist eine auf die Patientin zugeschnittene Kombination analgetischer und hormoneller Präparate.<sup>85</sup>

### **1.8.2 Operativ**

Steht der Verdacht auf eine Endometriose im Raum, empfiehlt sich zu Diagnostik- und Therapiezwecken grundsätzlich die chirurgische Intervention bei Schmerzen, Organdestruktion und/oder Sterilität der Patientin.<sup>5</sup> Im Fall einer vorhandenen Subfertilität bieten operative Verfahren anders als die genannten konservativen Ansätze und ebenso wie Methoden der assistierten Reproduktion die Möglichkeit zu einer eindeutigen Verbesserung der Fertilität.<sup>84</sup> Zu den operativen Therapieoptionen bei Endometriose zählen die laparoskopische Koagulation oder Laservaporisation kleiner Herde sowie die Ausschälung und Exzision größerer Herde oder Zysten, ggf. per Laparotomie.<sup>15</sup> Im Fall der tiefinfiltrierenden Endometriose geben zahlreiche Studien der chirurgischen Therapie den Vorrang vor der medikamentösen.<sup>86</sup> Die radikale Entfernung der Erkrankungsherde ermöglicht hier u.U. auf lange Zeit Beschwerdefreiheit und eine deutliche Verbesserung der Fertilität. Gerade bei minimal-invasiver Technik ist die Durchführung der entsprechenden Eingriffe durch erfahrene Operateure in spezialisierten Zentren essentiell für den Erfolg der Behandlung.<sup>87</sup>

Grundsätzlich gilt: Je nach Erkrankungsstadium und Aktivitätsgrad, Herd-Lokalisation und Familienplanung der Patientin wird ein jeweils individueller Therapieplan entworfen. Ziel ist es derzeit, durch geschickte Kombination hormoneller und operativer Methoden eine möglichst lange Phase der Symptombefreiheit zu erreichen.

## 2 Zielsetzung

Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen.<sup>5</sup> Für viele Patientinnen bedeutet sie eine jahrzehntelang andauernde Einschränkung ihrer Lebensqualität mit häufig bleibenden Folgen. Die gängigen Theorien zur Pathogenese der Endometriose konnten das Rätsel um diese Erkrankung bisher nicht lösen. Es fehlt daher ein kausales Therapiekonzept.<sup>5</sup>

Seit einigen Jahren steht das Immunsystem von Endometriose-Patientinnen im Fokus der Forschung. Es weist deutliche Veränderungen auf (siehe Kapitel 5.3). Untersuchungen über die genauen Mechanismen dieser Veränderungen und ihren möglicherweise krankheitsauslösenden Charakter sind dringend nötig, um neue primärpräventive Ansätze und Therapiestrategien zu entwickeln.

Von besonderem Interesse für die Aufklärung immunologischer Phänomene ist die Molekülgruppe der Galektine, einer Unterfamilie der Lektin-Proteine.<sup>88</sup> Sie üben immunmodulatorische Funktionen aus und werden als Schlüsselregulatoren der Immunantwort gehandelt.<sup>89</sup> Ihr Mitwirken an zelladhäsiven, zellmigrativen, wachstumsregulierenden und neoplastischen Abläufen<sup>90</sup> wirft die Frage auf, welche Rolle die Galektine im Krankheitsprozess der Endometriose spielen. Über ihre Expression im Endometriosegewebe ist bisher nur wenig bekannt. Da es die Galektine 1 und 3 sind, die im Endometrium in nennenswertem Ausmaß vorkommen<sup>91</sup>, standen sie im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit. Es werden ihnen u.a. wichtige Aufgaben bei der Regulation endometrialer Funktionen und der embryonalen Implantation zugeschrieben. Ebenso ausschlaggebend könnte die Galektinfunktion sein für die Implantation und/oder das Wachstum endometrialer Herde im Peritoneum, für die vaskuläre Versorgung dieser Herde und eine modifizierte Immunantwort im peritonealen Milieu.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, das Expressionsmuster der Galektine 1 und 3 im Endometriosegewebe zu untersuchen im Vergleich mit dem Ovarstroma und dem Endometrium nicht-erkrankter Frauen.

In einem zweiten Versuchsaufbau wurde der mögliche Einfluss von Stress auf Endometriosezellen und ihr Galektin-Expressionsverhalten nachgestellt. Physischem wie psychischem Stress wird in vielen Studien und aus der klinischen Erfahrung heraus eine krankheitsfördernde Wirkung zugeschrieben. Gerade das

Immunsystem reagiert sehr empfindlich auf externe Stressoren.<sup>92</sup> Zudem bedeuten die Krankheitssymptome selbst einen nicht zu unterschätzenden Stressor für die von Endometriose betroffenen Frauen. Der Zusammenhang zwischen Stress und einer Galektin-1-gekoppelten Dysregulation des Immunsystems bei Endometriose wurde hier anhand der CRF-Stimulation geeigneter Modellzellen untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Immunhistochemie: Detektion von Galektin-1 und Galektin-3 im Endometriosegewebe, Ovarstroma und Endometrium

##### 3.1.1 Vorbemerkung

Im immunhistochemischen Teil dieser Arbeit wurden drei Gruppen von Geweben hinsichtlich ihrer Galektin-Expression verglichen.

Die erste Gruppe bestand aus Gewebeproben von ektopen Endometrioseläsionen (n=54, vorwiegend ovarieller Ursprung).

In den zwei Vergleichsgruppen fanden sich ausschließlich Gewebeproben aus pathologisch *nicht* veränderten Organen von Frauen *ohne* sichtbare Endometriose. Die Proben wurden zum einen aus Ovarstroma (n=10), zum anderen aus eutopem Endometrium (n=15) entnommen.

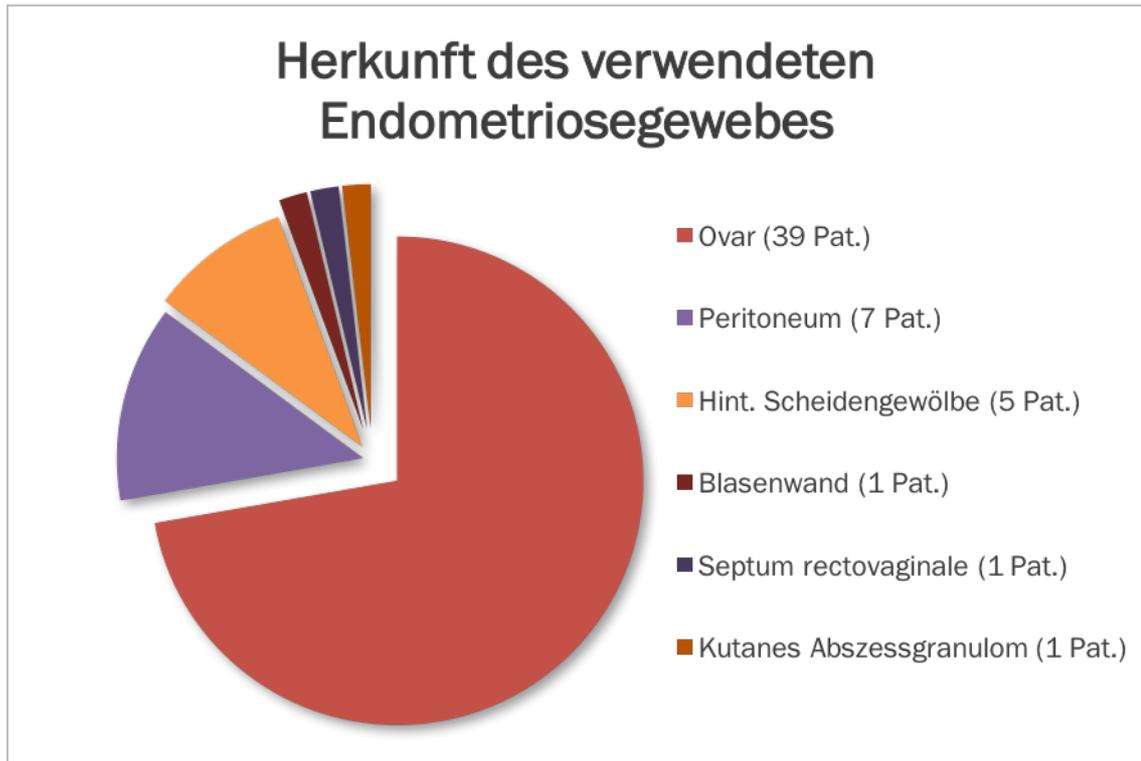
Tabelle 3: Anzahl der gefärbten Präparate pro Gewebe- und Färbegruppe

	Endometriose	Ovar	Endometrium
Galektin-1-Färbung	n = 54	n = 10	n = 15
Galektin-3-Färbung	n = 54	n = 10	n = 15
Gesamtzahl	n = 108	n = 20	n = 30

##### 3.1.2 Gewebeproben

Die 54 Gewebeproben aus Endometrioseläsionen stammten von 54 Patientinnen, die in den Jahren 2000 bis 2002 in der Frauenklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München aufgrund Endometriose-bedingter Beschwerden operiert wurden. Die Endometrioseherde, aus denen die Proben jeweils entnommen wurden, befanden sich auf folgenden Strukturen: Ovar (n=39), Peritoneum von Blase (n=3), Douglas-Raum (n=3) und Beckenwand (n=1), hinteres Scheidengewölbe (n=5), Blasenwand (innen; n=1), Septum rectovaginale (n=1), Abszessgranulom der Bauchhaut (n=1).

Abbildung 4: Entnahmestellen der Endometriose-Proben



Auch die 10 Gewebeproben aus unauffälligem Ovarstroma wurden an der Frauenklinik Innenstadt der LMU München im Rahmen operativer gynäkologischer Eingriffe (z.B. Wertheim-Meigs-Operation) gewonnen. In den jeweiligen Operationen waren die Adnexe der Patientinnen vorsorglich mitentfernt worden, hatten in der pathologischen Untersuchung jedoch einen unauffälligen histologischen Befund gezeigt.

Die 15 Gewebeproben aus normalem Endometrium stammten von 15 prämenopausalen, nicht-schwangeren Frauen, die sich im Rahmen gutartiger Erkrankungen (hauptsächlich Leiomyome des Uterus) in der Münchener Universitäts-Frauenklinik einer Abrasio bzw. hysteroskopischen Myomresektion oder einer Hysterektomie unterziehen mussten. Die 15 Frauen hatten einen regelmäßigen Zyklus. Ab 3 Monate präoperativ war bei ihnen keinerlei hormonelle Behandlung erfolgt. Hyperplastisches oder pathologisch verändertes Endometrium wurde von der Sammlung der Gewebeproben ausgeschlossen. Entsprechend anamnestischer Angaben und histologischer Auswertung<sup>93</sup> fand zyklusphasengerecht eine Einteilung der entnommenen Proben in drei Gruppen statt: Proliferativ (n=5), frühsekretorisch (n=5) und spätsekretorisch (n=5).

### 3.1.3 Reagenzien und Materialien

Im Folgenden sind die für den immunhistochemischen Teil dieser Arbeit verwendeten Materialien tabellarisch aufgeführt:

Tabelle 4: Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Bezugsquelle
Einbettautomat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Farbkamera 3CCD	JVC, Yokohama, JP
Feuchte Kammer	Eigenbau
Kühlschränke, 4 °C	Siemens, München, DE
Mikroskop	Leitz, Wetzlar, DE
Pipette <i>Eppendorf Research</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Schlittenmikrotom Hn40	Reichert-Jung/Leica Microsystems, Wetzlar, DE

Tabelle 5: Plastik- und Glaswaren

Bezeichnung	Bezugsquelle
Deckglas	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Objekträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Pipettenspitze, Plastik, 10µl – 1ml	Eppendorf, Hamburg, DE

Tabelle 6: Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aqua destillata	B. Braun AG, Melsungen, DE
Eindeckmittel <i>Shandon Consul-Mount™</i>	Thermo Electron Corporation Anatomical Pathology, Pittsburgh, PA US
Ethanol (100%, 96%, 70%)	Klinikapotheke der LMU München
Formalin 4% neutral gepuffert	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE
Hämalaun	Klinikapotheke der LMU München
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	VWR International S.A.S., Fontenay sous bois, FR
Leitungswasser	Frauenklinik der LMU München
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Paraffin	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
PBS – Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (1l enthält: 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,42g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,27g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Biochrom AG, Berlin, DE
Ultra V Block Katalog-Nr. TA-060-UB	Lab Vision Corporation, Fremont, Californien, US
Verdünnungsmedium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Xylol	Klinikapotheke der LMU München

Tabelle 7: Antikörper, Detektionssysteme, Färbesubstrat

Bezeichnung	Bezugsquelle
Polyklonaler Antikörper Anti-h-Galektin-1 Bestell-Nr. AF 1152	R&D Systems, Minneapolis, US
Monoklonaler Antikörper Anti-Galektin-3, Klon 9C4 Bestell-Nr. NCL-GAL3	Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK
DAB	Dako, Glostrup, DK
Detektionssystem Vectastain Elite goat-IgG-Kit Bestell-Nr. PK 6105	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, US
Detektionssystem Vectastain Elite mouse-IgG-Kit Bestell-Nr. PK-6102	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, US

### 3.1.4 Methode: Herstellung und Färbung der Gewebepräparate

#### 3.1.4.1 Vorbehandlung des Gewebes und Anfertigen der Gewebepräparate

Abbildung 5: Grundprinzip der Anfertigung eines Gewebeschnittes



Die Gewebeproben aller drei Gruppen (Endometriose n=54; Ovarstroma n=10; Endometrium n=15) wurden in 4%igem neutral gepufferten Formalin, einer wässrigen Formaldehyd-Lösung, fixiert. Dadurch wird die Aktivität körpereigener Enzyme im Gewebe zum Stillstand gebracht und Eiweißmoleküle werden durch Anlagerung je eines Formaldehydmoleküls untereinander vernetzt. Auf diese Weise entsteht ein festes Gitternetz. Da die Proteine durch den Fixationsvorgang kaum denaturiert werden, können Antigenstrukturen wie die Galektine 1 und 3 anschließend noch gut nachgewiesen werden.

Das Fixationsmittel Formalin wurde mithilfe von Leitungswasser herausgewaschen und das Gewebe anschließend im Einbett-Automaten mit Paraffin durchtränkt (Pathologisches Institut der LMU München). Voraussetzung dafür war die – ebenfalls automatisch durchgeführte – Entwässerung mithilfe einer aufsteigenden Ethanol-Reihe und die Verwendung von Xylol als Intermedium, das sich sowohl mit dem Ethanol als auch mit Paraffin mischt. Durch das Xylol wurden die letzten Reste Alkohol aus dem Gewebe herausgewaschen und das Eindringen des auf 60°C erhitzten Paraffins ermöglicht. Das so durchtränkte Gewebe wurde schließlich mit flüssigem Paraffin in Blockform gegossen, die Blöcke nach Erkalten aus der Form gelöst und im Eisfach gekühlt.

Der letzte Schritt war das Anfertigen der Präparate: Mit einem Schlittenmikrotom wurden 2-3µm dünne Gewebescheiben von den Blöcken heruntergeschnitten und auf speziell für immunhistochemische Verfahren präparierte Objektträger („Superfrost Plus“) aufgezogen. Die positive Ladung dieser Objektträger ermöglicht eine bessere Haftung des Gewebes. Um letztere noch weiter zu fördern, wurden die Präparate über Nacht bei ca. 56°C im Brutschrank getrocknet.

### 3.1.4.2 Immunhistochemische Färbung der Präparate

Abbildung 6: Grundprinzip der Präparatfärbung



In jedem Färbedurchgang wurde Kontrollgewebe mitgefärbt.

Die grundsätzlichen Schritte des immunhistochemischen Färbeprozesses waren für die Galektin-1- und Galektin-3-Färbung gleich, Unterschiede bestanden bei der Wahl des jeweils verwendeten Detektionssystems.

**Tabelle 8: Primärantikörper, Detektionssystem und Färbesubstrat im immunhistochemischen Galektin-1- und Galektin-3-Färbeprozess**

	<b>Galektin-1-Färbung</b>	<b>Galektin-3-Färbung</b>
<b>Primärantikörper</b>	Anti-h-Galektin-1, polyklonal	Anti-Galektin-3, monoklonal
<b>Detektionssystem</b>	Vectastain Elite goat-IgG-Kit	Vectastain Elite mouse-IgG-Kit
<b>Färbesubstrat</b>	DAB = 3,3-Diaminobenzidin	

Bevor mit der Färbung begonnen werden konnte, musste mithilfe von Xylol das Paraffin aus den Präparaten herausgelöst werden. In einer absteigenden Alkohol-Reihe (Ethanol) erfolgte anschließend die Rehydrierung des Gewebes, sowie (zwischen den beiden Durchgängen mit Ethanol absolut) die Inaktivierung im Gewebe befindlicher endogener Peroxidasen durch 3%iges  $H_2O_2$  in Methanol. Diese endogenen Peroxidasen hätten sonst später bei der Färbereaktion stören und zu unspezifisch positiven Ergebnissen führen können. Im Anschluss an die absteigende Ethanol-Reihe wurden Alkoholreste mit Aqua destillata herausgewaschen und die Präparate 2 x 2 Minuten lang in PBS gespült, bevor der eigentliche immunhistochemische Färbeprozess begann. Grundsätzlich erfolgte dieser in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Präparate während der einzelnen Inkubationsschritte zu verhindern. Nach Austestung der unterschiedlichen Färbemethoden für den jeweiligen Primärantikörper wurden für das Anfärben von Galektin-1 bzw. Galektin-3 die folgenden zwei Färbeprotokolle erstellt:

Abbildung 7: Färbeprotokoll zum Nachweis von Galektin-1

1. Entparaffinieren für 15 Min. in Xylol
2. Schwenken in 100% Alkohol
3. **Blockierung der endogenen Peroxidase** durch: **20 Min. in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** in Methanol (= 3ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 97ml Methanol)
4. Schwenken in 1 x 100%, 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol
5. Spülen in Aqua dest.
6. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
7. **40 Min. Blockieren mit Ultra V Block**
8. Abschütten des Blockierungsmittels
9. **Primärantikörper bei 4 °C über Nacht = Anti-h-Galektin-1**; Verdünnung 1:1000 in Dako Verdünnungsmedium
10. Am nächsten Tag Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
11. **30 Min. Sekundärantikörper** = 3gtt Normalserum + 1gtt Anti-goat-IgG + 10ml PBS
12. Währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes = 4gtt Reagenz A + 4gtt Reagenz B + 10ml steriles PBS (Lösung muss vor Gebrauch 30 Min. ruhen)
13. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
14. **30 Min. ABC-Komplex**
15. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
16. **1 Min. Substratfärbung mit DAB** (3,3-Diaminobenzidin) = 1ml Substratpuffer + 1gtt DAB Chromogen
17. Waschen in Aqua dest. (2 x 2 Min.)
18. **2 Min. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun** nach Mayer
19. 5 Min. in Leitungswasser bläuen
20. Schwenken in aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol
21. Eindecken mit „Shandon Consul-Mount“

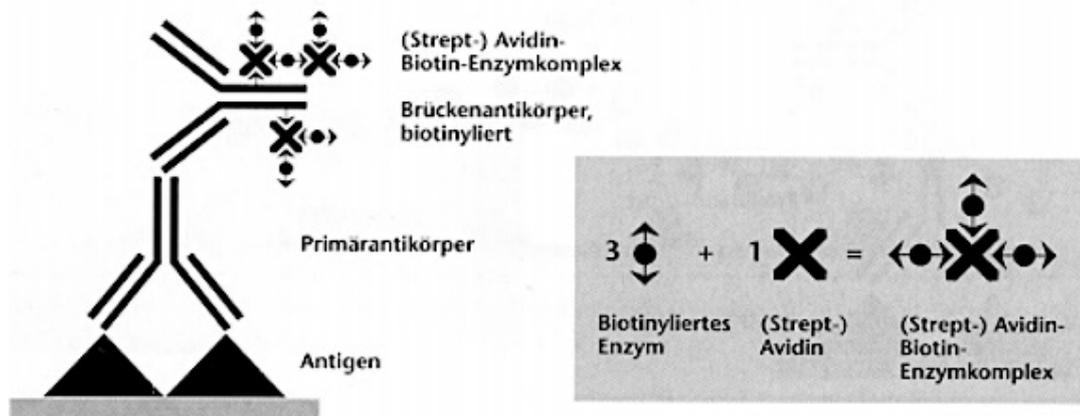
Abbildung 8: Färbeprotokoll zum Nachweis von Galektin-3

1. Entparaffinieren für 15 Min. in Xylol
2. Schwenken in 100% Alkohol
3. **Blockierung der endogenen Peroxidase** durch: **20 Min. in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** in Methanol (= 3ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 97ml Methanol)
4. Schwenken in 1 x 100% , 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol
5. Spülen in Aqua dest.
6. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
7. **20 Min. Blockierungsserum** = 3gtt Normalserum auf 10ml steriles PBS
8. Abschütten des Blockierungsserums
9. **Primärantikörper bei 4 °C über Nacht = Anti-Galektin-3**; (1:500 in PBS)
10. Am nächsten Tag Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
11. **30 Min. Sekundär-Ak** = 3gtt Normalserum + 1gtt Anti-mouse-IgG + 10ml PBS
12. Währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes = 4gtt Reagenz A + 4gtt Reagenz B + 10ml steriles PBS (Lösung muss vor Gebrauch 30 Min. ruhen)
13. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
14. **30 Min. ABC-Komplex**
15. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
16. **1 Min. Substratfärbung mit DAB** (3,3-Diaminobenzidin) = 1ml Substratpuffer + 1gtt DAB-Chromogen
17. Waschen in Aqua dest. (2 x 2 Min.)
18. **2 Min. Gegenfärbung in saurem Hämalaun** nach Mayer
19. 5 Min. in Leitungswasser bläuen
20. Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
21. Eindecken mit „Shandon Consul-Mount“

Zunächst war es wichtig, elektrostatische Ladungen im Gewebe abzusättigen, da diese sonst zu unspezifischen hydrophoben Bindungen der nachfolgend verwendeten Immunglobuline an Membranen oder Fettgewebe hätten führen können. Im Falle der Galektin-1-Färbung fand dazu der Ultra V Block Verwendung (40-minütige Inkubation), bei der Galektin-3-Färbung das Blockierungsserum aus dem zugehörigen Detektionssystem (20-minütige Inkubation).

Als nächster Schritt folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper: zum einen der polyklonale, in der Ziege gewonnene Antikörper gegen humanes Galektin-1 in der Verdünnung 1:1000 mit Dako Verdünnungsmedium; zum anderen der monoklonale, in der Maus gewonnene Antikörper gegen Galektin-3 in der Verdünnung 1:500 mit PBS. In beiden Färbegruppen wirkte die Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4°C ein, bevor sie am nächsten Tag von den Objektträgern abgeschüttet wurde und die Präparate wie zuvor 2 x 2 Minuten lang in PBS gewaschen wurden.

Um die gesuchten Antigene Galektin-1 und Galektin-3 darstellen zu können, mussten nun die soeben an diese Antigene gebundenen Primärantikörper farblich markiert werden. Hierzu diente die ABC-Methode. Dieses Nachweisverfahren beruht auf der Bindung eines Brückenantikörpers (= Sekundärantikörper) an den Primärantikörper. An den Brückenantikörper wiederum gekoppelt ist das wasserlösliche Vitamin Biotin, das die Verbindung zum ABC- bzw. Avidin-Biotin-Komplex herstellt. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glycoprotein (Tetramer) mit einem Molekulargewicht von 68 kDa. Bei dem hier verwendeten Strept-Avidin handelt es sich um ein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliertes reineres Produkt, bei dem es im Versuchsverlauf zu weniger unspezifischen Reaktionen kommt als bei der Verwendung von Avidin. Für Biotin (= Vitamin B7, Vitamin H) stehen am (Strept-)Avidin-Komplex vier Bindungsstellen zur Verfügung. Um den Avidin-Biotin-Komplex herzustellen, wird an drei dieser Bindungsstellen je ein Molekül Biotin gekoppelt. Mit seiner vierten, freien Bindungsstelle dockt der ABC-Komplex an den biotinylierten Brückenantikörper (= Sekundärantikörper) an. Ein bereits an den Komplex gebundenes Enzym (Peroxidase) ist für die letzten Schritte der Färbung von Bedeutung.

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode<sup>94</sup>

Quelle: Noll, S., Schaub-Kuhnen S. *Praxis d. Immunhistochemie*, (Urban & Fischer Verlag München, Jena, 2000), S. 17

Nach dieser prinzipiellen Erklärung zum Verständnis der ABC-Methode weiter gemäß Färbeprotokoll: Im Anschluss an den Waschvorgang wurden die Präparate 30 Minuten lang mit dem jeweiligen biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert, d.h. mit einer Lösung aus Anti-goat-IgG für die Galektin-1-Färbegruppe und aus Anti-mouse-IgG für die Galektin-3-Färbegruppe. Es folgten ein weiterer Waschgang in PBS, die 30-minütige Inkubation mit dem ABC-Komplex und ein erneutes Waschen in PBS.

In beiden Färbegruppen wurde jetzt eine Minute lang eine Substrat/Chromogen-Lösung zugesetzt, um eine enzymatische Reaktion mit der erwähnten, an den Streptavidin-Biotin-Komplex gebundenen Peroxidase zu starten. Da - als Vorbereitung auf die Färbung - die im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen durch den Kontakt mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bereits inaktiviert sind (s.o.), können sie sich in diesem Schritt nicht mehr störend auswirken. Am Ort der Reaktion (= Ort der an Galektin gebundenen Primärantikörper sowie der an diese gebundenen, ABC-Komplex-markierten Sekundärantikörper) bildet sich ein Farbniederschlag, der im Lichtmikroskop (und z.T. bereits mit bloßem Auge) sichtbar wird. Dies ermöglichte nach Abschluss des Färbeprozesses die quantitative Auswertung der im Endometriose-Gewebe, im Ovarstroma und im Endometrium vorhandenen Galektin-1- und Galektin-3-Menge, auf die im Ergebnisteil dieser Arbeit eingegangen wird. Im weiteren Verlauf des Färbungsvorgangs folgten ein Waschgang in Aqua destillata, sowie eine 2-minütige Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer. Saures Hämalaun enthält einen Protonen-bindenden Farbstoff in saurer Lösung. Beim Färbeprozess mit dieser Lösung lagern sich die positiv geladenen basischen

Farbstoffmoleküle an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS im Zellkern an. Dieser wird dadurch stark angefärbt, während das Zellplasma nur eine zarte Färbung erhält.

Nach der Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Präparate für 5 Minuten in Leitungswasser (= alkalisches Milieu) gebläut und gleichzeitig vorhandene Säurereste herausgewaschen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe fand die Entwässerung der gefärbten Gewebepreparate statt, bevor sie in Xylol aufgeheilt wurden. Als Einschlussmittel beim Eindecken diente *Shandon Consul-Mount<sup>TM</sup>*. Dieser Schritt ermöglicht die lichtmikroskopische Auswertung und macht die Präparate für Jahre haltbar.

In allen Färbezyklen und -gruppen dienten Colon-Schnittpräparate als Positivkontrollen für einen funktionierenden Färbevorgang.

### **3.2 Zellkultur und Immunzytochemie: Stimulation von Endometriumskarzinomzellen in vitro mit Corticotropin Releasing Factor (CRF) und anschließende Detektion von Galektin-1**

#### **3.2.1 Modellzelllinien**

Eine ausreichende Menge Primärzellen von Endometriosegewebe für eine Kultivierung im Rahmen aussagekräftiger Studien zu gewinnen, ist schwierig und äußerst aufwendig. Daher dienten in dieser Arbeit Zelllinien epithelialen endometrialen Ursprungs als Modell für Endometriosezellen. Die derzeit üblichen Modellzelllinien dieser Gruppe wurden zumeist aus uterinen Adenokarzinomzellen gewonnen, so auch die beiden hier gebrauchten Linien Ishikawa und HEC-1B.

Die Ishikawa Zellen entstammen dem endometrialen Adenokarzinom einer 39-jährigen Asiatin. Sie wurden zum ersten Mal beschrieben von Nishida et al.<sup>95</sup> und werden weithin als exzellentes Modell für die Funktion endometrialer Zellen angesehen und verwendet<sup>96</sup>. Ishikawa zeigen dabei sowohl Eigenschaften glandulären als auch luminalen Epithels<sup>97,98</sup> und ähneln in ihrer Enzym- und Strukturproteinausstattung stark den normalen Endometriumzellen<sup>99-103</sup>.

Die HEC-1B Zellen wurden vor etwa 40 Jahren<sup>97</sup> aus dem Adenokarzinom des Endometriums einer 71-jährigen Patientin gewonnen und weisen im Gegensatz zu

Ishikawa eher stromazellähnliche Eigenschaften auf.<sup>97,104</sup> HEC-1B war die erste verfügbare Endometriumzelllinie und wurde vor allem in der Implantationsforschung genutzt als Modell für nicht-rezeptive Zellen der Gebärmutter-schleimhaut.<sup>97</sup>

Für diese Arbeit wurden die genannten Zelllinien von der European Collection of Authenticated Cell Cultures ECACC (Ishikawa) bzw. der American Type Culture Collection ATCC (HEC-1B) bezogen.

### 3.2.2 Reagenzien und Materialien

Im Folgenden sind die für die Zellkultivierung und anschließende immunzytochemische Färbung verwendeten Materialien tabellarisch aufgeführt:

Tabelle 9: Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Bezugsquelle
Brutschrank	Heraeus Thermotech, Hanau, DE
Gefrierschrank, -20 °C	Siemens, München, DE
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, DE
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen, DE
Pipette <i>Eppendorf Research</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe <i>Easypet</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Sterilwerkbank	Uniequip GmbH, Planegg, DE
Stickstofftank	Taylor-Wharton, Theodore, US
Vortex Mixer	Edmund Bühler, Tübingen, DE
Wasserbad	GFL, Burgwedel, DE
Zentrifuge	Hermle, Wehingen, DE

Tabelle 10: Plastik- und Glaswaren

Bezeichnung	Bezugsquelle
Chamber Slide, 4-Well (= Kammerobjektträger)	Nalge Nunc International, Rochester, US
Deckglas	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Kryoröhrchen	Simport, Beloeil, CA
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Pipettenspitze, Glas, 2ml – 50ml	Becton Dickinson Labware, New Jersey, US
Pipettenspitze, Plastik, 10µl – 1ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß, 2ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Tube, steril, 50ml	Becton Dickinson Labware, New Jersey, US
Zellkulturflasche BD Falcon™ T75 (= 75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche)	Becton Dickinson Labware, New Jersey, US

Tabelle 11: Zellen

Zelllinie	Bezugsquelle
HEC-1B	ATCC (American Type Culture Collection)
Ishikawa	ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures)

Tabelle 12: Chemikalien, Lösungen, Stimulanz, Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Aqua destillata	B. Braun AG, Melsungen, DE
Cell Culture Freezing Medium – DMSO	GIBCO®/Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
CRF	Sigma-Aldrich, St. Lois, US
DMEM (3,7g/l NaHCO <sub>3</sub> + 4,5g/l D-Glucose + 1,028 g/l stable glutamine + Na-Pyruvate)	Biochrom AG, Berlin, DE
Eindeckmittel <i>Aquatex</i>	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol	Klinikapotheke der LMU München
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Hämalaun	Klinikapotheke der LMU München
PBS – Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (1l enthält: 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,42g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,27g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Biochrom AG, Berlin, DE
Power Block™ Universal Blocking Reagent (10fach konzentriert)	BioGenex, Fremont, US
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Trypsin/EDTA-Lösung 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE

Tabelle 13: Antikörper, Detektionssysteme, Färbesubstrat

Bezeichnung	Bezugsquelle
AEC	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyklonaler Antikörper Anti-h-Galektin-1 Bestell-Nr. AF 1152	R&D systems, Minneapolis, US
Monoklonaler Antikörper Anti-Galektin-3, Klon 9C4 Bestell-Nr. NCL-GAL3	Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK
Detektionssystem Vectastain Elite goat-IgG-Kit Bestell-Nr. PK 6105	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, US
Detektionssystem Vectastain Elite mouse-IgG-Kit Bestell-Nr. PK-6102	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, US

### 3.2.3 Methode: Zellkultur, Stimulation mit CRF und immunzytochemische Färbung

#### 3.2.3.1 Zellkultivierung

Für die Arbeit an den Zellkulturen galten strenge Sterilitätsanforderungen: Vor Beginn und nach Beendigung jeden Arbeitens wurde die speziell für mikrobiologische und biotechnologische Tätigkeit konzipierte Sicherheitswerkbank mit 70%igem Ethanol gewischt; ebenso alles, was im Lauf der Versuche unter die Sterilwerkbank genommen wurde, wie Pipetten, Abfallgefäße, Reaktionsgefäße, Zellkulturflaschen etc. und die Handschuhe, die während der Arbeit getragen wurden. Eine Stunde vor Beginn wurde die UV-Lampe in der Werkbank eingeschaltet (um eventuell darin befindliche Keime abzutöten), zum Arbeiten selbst jedoch ausgeschaltet (um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden).

Das Nährmedium, in dem die Zellen kultiviert wurden, bestand aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 10% Fetal Calf Serum (FCS) als Wachstumsfaktoren- und Proteinquelle. 50ml FCS wurden in eine 500ml-Flasche DMEM pipettiert. Diese Mischung wurde in 50ml-Reaktionsgefäßen portioniert aufbewahrt.

Weder Antibiotika noch Antimykotika kamen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Da nicht mit Primärzellkulturen aus potentiell kontaminiertem Gewebe gearbeitet wurde, war dazu zum einen nicht die Notwendigkeit gegeben. Zum anderen sollten weder ein Verschleiern unsauberem Arbeitens noch mögliche zytotoxische Effekte der Antibiotika auf die Zellen riskiert werden.

Die zwei Zelllinien Ishikawa und HEC-1B wurden durch Wachstumsversuche so ausgetestet, dass durch die Wahl einer optimalen Zellzahl zur Aussaat innerhalb einer Woche eine Monoschicht in der Zellkulturflasche angezüchtet werden konnte. Somit musste einmal pro Woche das Medium ausgetauscht werden. Ein weiteres Mal waren die Zellen aus der Flasche zu lösen und dann erneut auszusäen. Es wurden Zellkulturflaschen der Größe T75 verwendet. Im Brutschrank herrschten mit einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% gute Wachstumsbedingungen für die Zellen.

Im Folgenden sind die durchgeführten grundsätzlichen Schritte der Arbeit an den Zellkulturen in Protokollform beschrieben (Mengenangaben beziehen sich auf T75-Flaschen):

**Abbildung 10: Aussäen der Zellen**

1. Wasserbad anstellen auf 37 °C.
2. Reaktionsgefäß (50ml) mit ca. 10ml Medium vorbereiten.
3. Kryoröhrchen mit Zellen dem Stickstofftank entnehmen.
4. Kryoröhrchen mit 70% Ethanol abwischen und mit einer Pinzette im Wasserbad auftauen.
5. Die aufgetauten Zellen zügig unter die Sterilwerkbank nehmen und mit einer 2ml-Pipette in das vorbereitete Reaktionsgefäß pipettieren. Dieser Schritt sollte schnell durchgeführt werden, da das Einfriermedium DMSO, sobald es warm wird, die Zellen abtötet. DMEM/FCS neutralisiert das DMSO.
6. Zentrifugieren: 5 Min. bei 1000 Upm, Raumtemperatur und Bremsstufe 2.
7. Medium im Überstand abziehen und 12ml auf das Zellpellet geben; gut mischen und in die Zellkulturflasche geben.
8. Zellkulturflasche mit Name der Zelllinie, Passagennummer und dem aktuellen Datum versehen im Brutschrank aufbewahren.

**Abbildung 11: Austausch des Nährmediums**

1. Vorher Medium bei 37 °C warmstellen.
2. Altes Medium mit einer 10ml-Pipette abziehen und verwerfen; 12ml neues angewärmtes Medium zugeben.
3. Mediumwechsel mit Datum auf der Flasche notieren.

**Abbildung 12: Zell-Splitting**

1. Medium und PBS bei 37 °C, Trypsin bei Raumtemperatur warm stellen.
2. Vor dem Splitten Medium, PBS und Trypsin unter die Hood nehmen.
3. Medium mit einer 10ml-Pipette aus der Zellkulturflasche abziehen und verwerfen.
4. Flasche mit 6ml PBS waschen (Reste von FCS werden herausgewaschen; die Wirkung von Trypsin könnte sonst gehemmt werden). PBS abziehen und verwerfen.
5. 2ml Trypsin in die Flasche pipettieren und diese für 8-15 Min. in den Brutschrank legen.
6. Währenddessen Neubauer-Zählkammer und ein Reaktionsgefäß (2ml) mit Trypanblau/PBS (25µl Trypanblau + 50µl PBS) sowie unter der Hood zwei weitere Reaktionsgefäße (50ml und 2ml) zur Zellzählung vorbereiten.
7. Wenn sich die Zellen nach der Inkubationszeit vom Flaschenboden lösen, 8ml DMEM/FCS in die Flasche zugeben (FCS stoppt die Wirkung von Trypsin) und gut mischen. Mit der gleichen 10ml-Pipette Zellsuspension aufnehmen und in das vorbereitete 50ml-Gefäß geben. Zwischendurch zwei Tropfen der Zellsuspension in das zweite 2ml-Reaktionsgefäß geben.
8. 50ml-Gefäß in die Zentrifuge stellen und 5 Min. zentrifugieren (bei 1000 Upm, Raumtemperatur und Bremsstufe 2)"
9. Währenddessen Zellen zählen: 25µl aus dem 2ml-Gefäß mit der Zellsuspension entnehmen und in das Gefäß mit Trypanblau/PBS pipettieren. Gut mischen und die Zählkammer mit dieser Lösung befüllen. Die Zellmembran vitaler Zellen ist für den Farbstoff Trypanblau undurchlässig. Die Zahl ungefärbter und somit vitaler Zellen wird in 4 Groß-Quadraten des Hämocytometers ausgezählt. Die Lebendzellzahl in der hergestellten Zellsuspension (10ml) ergibt sich nach der Formel:  
**Zellzahl = Gesamt-Zellzahl der 4 Quadrate/4 (4 Quadrate) x 4 (Verdünnung mit Trypanblau/PBS) x 10 (Verdünnungsfaktor bei 10ml Zellsuspension) x 10<sup>4</sup> (Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Höhe der Zählkammer)**  
**Beispiel:** (27+25+38+36) x 10 x 10<sup>4</sup> = 1260 x 10<sup>4</sup> = 12,6 x 10<sup>6</sup>  
 →12,6 Mio. Zellen in 10ml Zellsuspension
10. Gefäß (50ml) aus der Zentrifuge und wieder unter die Hood nehmen und das Medium im Überstand mit Pipette abziehen.
11. Auf das Zellpellet nun soviel Medium geben, dass sich eine Zellzahl von 1 Mio. Zellen pro 1ml ergibt - also im obigen Rechenbeispiel 12,6 ml - und gut mischen.
12. Insgesamt sollten 12ml Medium in der Flasche sein. Sollen beispielsweise 1 Mio. Zellen in die Flasche ausgesät werden, so entspricht dies 1ml der hergestellten Zellsuspension. Man gibt zunächst 11ml Medium, dann 1ml Zellsuspension in die Zellkulturflasche. Anschließend wird die Flasche vorsichtig geschwenkt und wieder in den Brutschrank gelegt. Dort bleibt sie bis zum nächsten Mediumwechsel.

### 3.2.3.2 Stimulation mit Corticotropin Releasing Factor (CRF)

Die einzelnen Kammern zweier Kammerobjektträger (4-Well Chamber Slides) wurden mit je 1ml einer Zell-DMEM-Suspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml Nährmedium) gefüllt und die Kammerobjektträger anschließend über Nacht im Brutschrank aufbewahrt. Nach Abziehen des Nährmediums über den angewachsenen Zellen am nächsten Morgen wurden die Zellen in den unterschiedlichen Kammern für 72h bei  $37^\circ\text{C}$  mit CRF/Medium-Lösungen in unterschiedlicher Konzentration sowie mit reinem Nährmedium inkubiert. Für die Ishikawa-Zellen wurden Konzentrationen von 1ng, 10ng, 100ng und 1000ng CRF pro ml Medium (DMEM+10%FCS) verwendet. Die Inkubation der HEC-1B-Zellen erfolgte mit den Konzentrationen 10ng und 100ng CRF pro ml Medium. Die Inkubationsversuche mit CRF fanden in der beschriebenen Weise sowohl an Ishikawa- als auch an HEC-1B-Zellen statt und wurden mehrmals wiederholt. Nach der Inkubation erfolgte jeweils die Färbung der Zellpräparate.

### 3.2.3.3 Immunzytochemische Färbung

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunzytochemischen Schritte entsprechen weitgehend dem oben für die Immunhistochemie beschriebenen Vorgehen (s. Kap. 3.1.4.2) und werden hier erneut in Form des entworfenen Versuchsprotokolls wiedergegeben. Die Fixierung der Zellen wurde mit Aceton (5 Min.) durchgeführt. Als Chromogen diente AEC (= 3-Amino-9-Ethylcarbazol, wasserunlöslich) und als Eindeckmittel kam *Aquatex* zum Einsatz.

**Tabelle 14: Primärantikörper, Detektionssystem und Färbesubstrat im Galektin-1-Färbeprozess der Ishikawa- und HEC-1B-Zellen**

<b>Primärantikörper</b>	Anti-h-Galektin-1, polyklonal
<b>Detektionssystem</b>	Vectastain Elite goat-IgG-Kit
<b>Färbesubstrat</b>	AEC = 3-Amino-9-Ethylcarbazol

Abbildung 13: Färbeprotokoll zum Nachweis von Galektin-1

1. Objektträger 5 Min. in PBS
2. **3 Min. Blockieren mit Powerblock**, Verdünnung 1:10 in Aqua destillata
3. Abschütten des Powerblocks
4. **16-17h Anti-Gal-1** (bei 4 °C), Verdünnung 1:50 in PBS
5. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
6. **30 Min. Sekundärantikörper** (Raumtemperatur) = 3gtt Normalserum (rabbit) + 1gtt Anti-goat-IgG + 10ml steriles PBS
7. Währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes = 4gtt Reagenz A + 4gtt Reagenz B + 10ml steriles PBS (Lösung vor Gebrauch 30 Min. ruhen lassen)
8. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
9. **30 Min. ABC-Komplex** (Raumtemperatur)
10. Waschen in PBS (2 x 2 Min.)
11. **6 Min. AEC** (ready to use)
12. Fließend wässern
13. **30 Sek. Hämalaun**
14. Spülen in Aqua destillata
15. Eindecken mit „Aquatex“

### 3.3 Evaluation und statistische Auswertung

Zur Beurteilung der immunhisto- und -zytochemischen Färbeargebnisse kam die von Remmele und Stegner 1987 beschriebene semiquantitative Auswertungsmethode des immunreaktiven Scores (IRS) zur Anwendung.<sup>105</sup> Dieser Score errechnet sich durch Multiplikation der entsprechenden Punktzahlen (s. Tabelle) aus der maximal erreichten Färbeintensität und dem Anteil der positiv gefärbten Zellen dieser Intensitätsstufe am Gesamtzellvolumen.

Tabelle 15: Immunreaktiver Score (IRS)<sup>105</sup>

Färbeintensität	Anteil positiv gefärbter Zellen am Gesamtzellvolumen	IRS
0 = keine Reaktion	0 = keine Zellen angefärbt	0-12 Punkte
1 = schwache Reaktion	1 = <10% der Zellen angefärbt	
2 = mäßige Reaktion	2 = 10-50%	
3 = starke Reaktion	3 = 51-80%	
	4 = >80%	

Die Präparate wurden von drei unabhängigen Beobachtern ausgewertet, eine Pathologin mit speziellem Tätigkeitsschwerpunkt Gynäkologie eingeschlossen. Zur Auswertung diente ein Leitz-Mikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und eine 3CCD Farbkamera (JVC, Yokohama, Japan).

Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde das IBM SPSS Software Paket in der Version 24 für Mac (IBM Deutschland GmbH) verwendet. Die Auswertung der Gewebepräparate erfolgte mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests. Die Auswertung der Zellpräparate erfolgte mithilfe des Wilcoxon-Tests. Signifikanz wurde angenommen ab  $p < 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immunhistochemie:

#### Downregulation von Galektin-1 im Endometriosegewebe

##### 4.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der histologischen Präparate zeigte sich eine klare Downregulation ( $p < 0,001$ ) von Galektin-1 im Endometriosegewebe im Vergleich zum unauffälligen Ovarstroma und zum Endometrium nicht an Endometriose erkrankter Frauen.

Für den Vergleich der Galektin-3-Expression im Endometriosegewebe und in den Kontrollpräparaten aus Ovarstroma und Endometrium ergab sich kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Innerhalb der Endometrium-Kontrollgruppe war zudem keine signifikante zyklusphasenspezifische Veränderung der Galektin-Expression zu beobachten.

Allgemein fiel auf, dass Galektin-1 fast ausschließlich im Stroma detektiert wurde, während Galektin-3 vorwiegend an Drüsenzellen und nur teilweise im Stroma nachzuweisen war. Ähnliche Beobachtungen machten von Wolff et al. bei ihren Untersuchungen zum Galektin-Fingerprinting des Endometriums.<sup>91</sup>

**Tabelle 16: IRS (Median) für die Färbung von Galektin-1 und Galektin-3 im unauffälligen Endometrium bzw. Ovarstroma nicht an Endometriose erkrankter Frauen und im Endometriosegewebe**

	Endometrium, proliferativ	Endometrium, frühsekretorisch	Endometrium, spätsekretorisch	Ovar	Endometriose
Galektin-1	12	12	12	10	2
Galektin-3	1	1	2	3	1

#### 4.1.2 Expression von Galektin-1 im Endometriosegewebe

Der Galektin-1-Färbeprozess bewirkte in 41 der 54 Endometriosepräparate eine *schwache* Farbreaktion: In 20 Fällen zeigte sich dabei eine zytosolische Anfärbung von unter 10% aller Zellen, in 8 Fällen eine Anfärbung von etwa 25% der Zellen, in 6 Fällen eine Anfärbung von etwa 60% der Zellen und in 7 Fällen eine Anfärbung von >80% der Zellen (IRS 1-4).

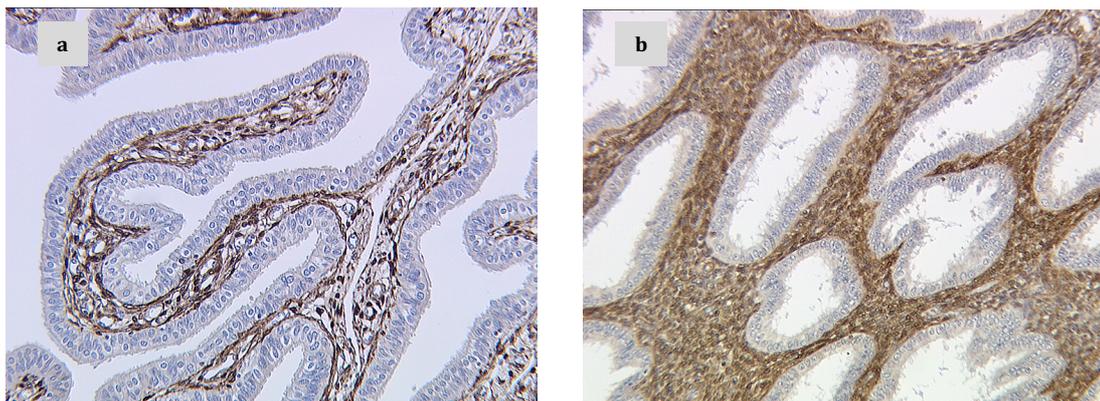
In 7 der 54 Endometriosepräparate ergab sich eine *mäßig starke* Farbreaktion: In einem Fall zeigte sich eine Anfärbung von 5% aller Zellen, in 3 Fällen eine Anfärbung von 40% der Zellen und in den übrigen 3 Fällen eine Anfärbung von 60% der Zellen (IRS 2, 4 bzw. 6).

3 der 54 Endometriosepräparate wiesen eine *starke* Farbreaktion auf: In einem Fall zeigte sich eine Anfärbung von 25% der Zellen und in 2 Fällen eine Anfärbung von knapp 80% der Zellen (IRS 6 bzw. 9).

Weitere 3 Endometriosepräparate blieben nach dem Färbeprozess ohne jede Farbreaktion (IRS 0).

Abschließend ergab sich damit für den immunreaktiven Score der Galektin-1-Färbung des Endometriosegewebes ein Median von 2.

43 der 54 Präparate zeigten die beschriebene Farbreaktion ausschließlich in Stromazellen. In 8 Präparaten wurde zusätzlich eine leichte Drüsenzellanfärbung beobachtet. In keinem Fall ergab sich eine ausschließliche Drüsenzellanfärbung.

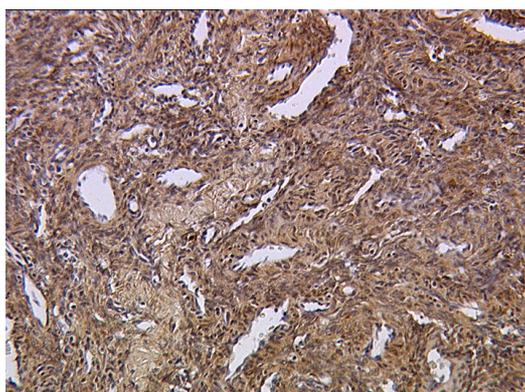
**Abbildung 14: Endometriosegewebe, Galektin-1-Färbung**

**Abbildung 14a** zeigt eines der 3 Endometriosepräparate mit mäßig starker zytoplasmischer Galektin-1-Anfärbung von etwa 40% der Stromazellen (IRS 4). Einige Drüsenzellen weisen hier ausnahmsweise ebenso eine (sehr schwache) zytoplasmische Anfärbung auf. In 4 weiteren Präparaten zeigte sich ein moderater Intensitätsgrad bei 5% bzw. bei 60% der Zellen. *Vergrößerung (Objektiv): x10*

**Abbildung 14b** demonstriert das seltene Beispiel (2 Präparate) starker Galektin-1-Anfärbung von bis zu 80% der Endometriose-Stromazellen (IRS 9) bei ebenfalls dezenter, gleichmäßiger Drüsenzellanfärbung. In einem weiteren Fall zeigte sich Intensitätsgrad 3 an 25% der Zellen. Die Mehrzahl (41) der Endometriosepräparate wies nach dem Färbeprozess eine nur schwache Anfärbung unterschiedlich großer Anteile (<10% bis >80%) der Stromazellen bei negativen Drüsenzellen auf. In 3 Fällen blieb jegliche Farbreaktion aus. Der Median der IRS-Werte für Galektin-1 im Endometriosegewebe betrug 2. *Vergrößerung (Objektiv): x6,3*

#### 4.1.3 Expression von Galektin-1 im Ovarstroma

Die Galektin-1-Färbung der 10 Ovarpräparate ergab eine *mäßig starke* bis *starke* Anfärbung von >80% der Zellen (IRS 8 bzw. 12). Der Median der IRS-Werte lag bei 10.

**Abbildung 15: Normales Ovarstroma, Galektin-1-Färbung**

**Abbildung 15** zeigt die starke Anfärbung von >80% der Ovarstromazellen - so bei 5 der 10 Präparate zu sehen. 5 weitere Präparate zeigten eine mäßig starke Farbintensität fast aller Zellen. Somit ergab sich für den IRS der 10 Galektin-1-gefärbten Ovarpräparate ein Median von 10. *Vergrößerung (Objektiv): x10*

#### 4.1.4 Expression von Galektin-1 im Endometrium

Die insgesamt 15 Präparate aus Endometrium entstammten zu je einem Drittel der proliferativen, frühsekretorischen und spätsekretorischen Zyklusphase.

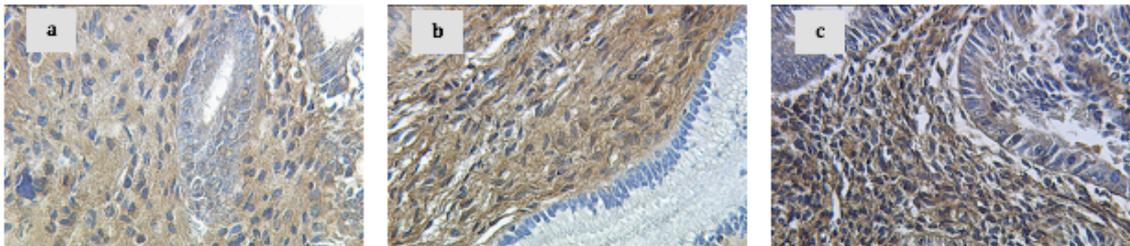
Das proliferative Endometrium zeigte nach Galektin-1-Färbung in 2 Fällen eine *mäßig starke* und in 3 Fällen eine *starke* zytosolische Anfärbung von jeweils über 80% der Zellen (IRS 8 bzw. 12)

Für die 5 Endometriumpräparate aus der frühsekretorischen Zyklusphase ergaben sich exakt gleiche Werte.

Das spätsekretorische Endometrium wies in einem Fall eine *mäßig starke* sowie in 3 Fällen eine *starke* Farbreaktion von über 80% der Zellen auf (IRS 8 bzw. 12). Ein weiteres Präparat zeigte eine *mäßige* Farbreaktion von nur 70% aller Zellen (IRS 6).

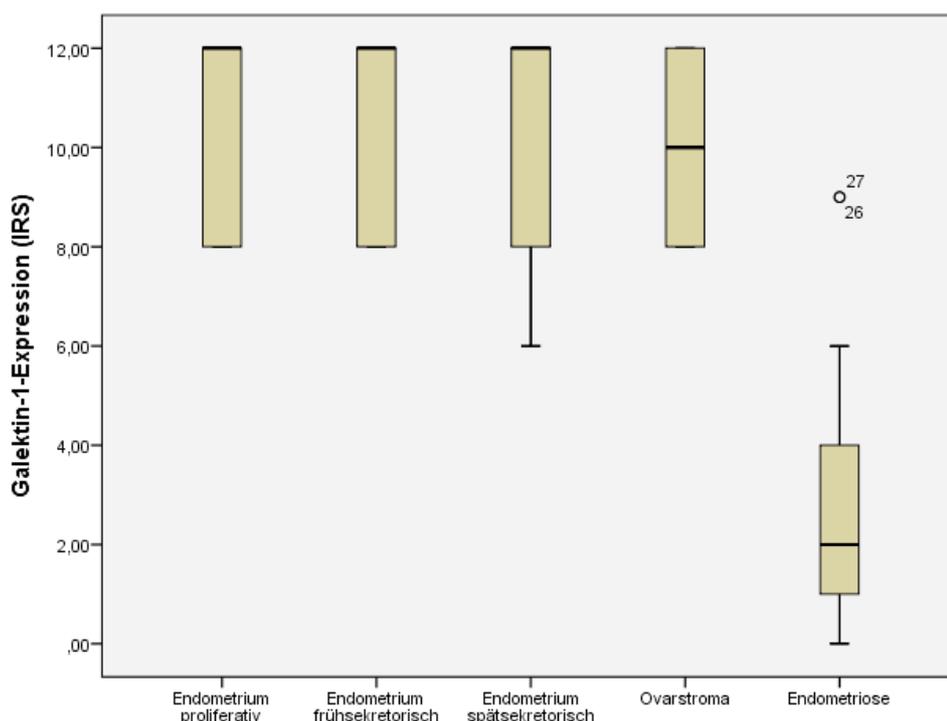
Der Median der IRS-Werte aller 15 Endometriumpräparate lag bei 12. Es wurde keine zyklusphasenspezifische Veränderung der Galektin-1-Expression des Endometriums nachgewiesen.

Abbildung 16: Endometrium, Galektin-1-Färbung



Die **Abbildungen 16a-c** zeigen die mäßig starke (**16a**) bis starke (**16b+c**) zytosolische Anfärbung von >80% der Endometrium-Stromazellen bei teilweise vorhandener schwacher Drüsenzellanfärbung (**16a+c**). Foto **16a** bildet proliferatives Endometrium ab, Foto **16b** frühsekretorisches und Foto **16c** spätsekretorisches Endometrium. Der schwächere Intensitätsgrad in der proliferativen Zyklusphase ist hier der Bildauswahl geschuldet. Der Median der IRS-Werte für die Galektin-1-Färbung des Endometriums lag bei 12. *Vergrößerung (Objektiv): x25*

**Abbildung 17: Expression von Galektin-1 im unauffälligen Endometrium bzw. Ovarstroma nicht an Endometriose erkrankter Frauen und im Endometriosegewebe**



**Abbildung 17** zeigt die Verteilung der IRS-Werte im Rahmen der am Endometrium, Ovarstroma und Endometriosegewebe durchgeführten Galektin-1-Färbung. Der Median für das Endometriosegewebe (2) lag deutlich unter dem der beiden Vergleichsgewebe (Endometrium: 12; Ovar: 10). Für das Endometriosegewebe wurde somit im Vergleich eine Downregulation von Galektin-1 nachgewiesen ( $p < 0,001$ ).

#### 4.1.5 Expression von Galektin-3 im Endometriosegewebe

Die Galektin-3-Färbung des Endometriosegewebes ergab in 20 Präparaten keinerlei Farbreaktion (IRS 0).

Eine nur *leichte* zytosolische Farbreaktion wurde nachgewiesen in insgesamt 11 Präparaten: 9 Fälle zeigten dabei eine Anfärbung von  $< 10\%$  der Zellen, 1 Präparat eine Anfärbung von 40% der Zellen und 1 weiteres Präparat eine Anfärbung von 60% der Zellen (IRS 1-3).

Eine maximal *mäßig starke* Farbreaktion fand sich in 14 Präparaten: 6 Fälle wiesen hier eine Anfärbung von  $< 10\%$  aller Zellen auf, weitere 6 Fälle eine Anfärbung von 25% der Zellen und 2 Fälle eine Anfärbung von 70% der Zellen (IRS 2,4 bzw. 6).

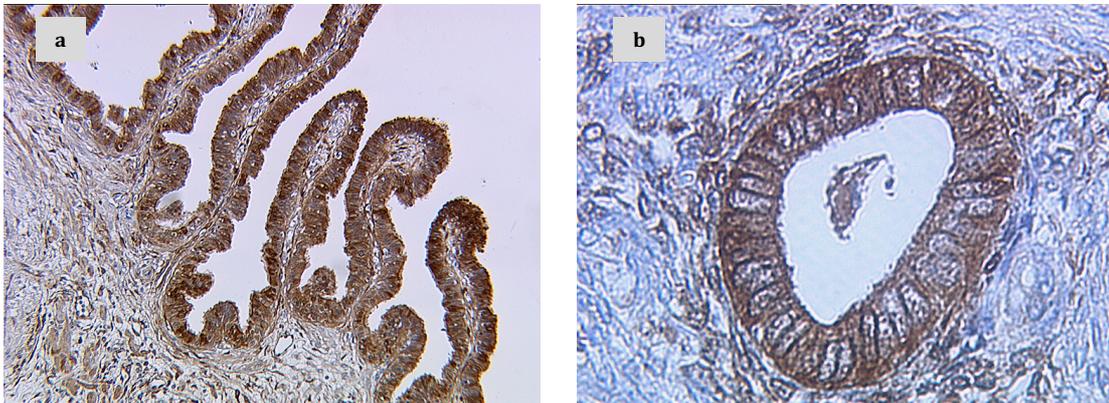
9 Endometriosepräparate reagierten *stark* auf den Galektin-3-Färbeprozess: In 2 Fällen mit einer Anfärbung von  $< 10\%$  der Zellen, in 4 Fällen mit einer Anfärbung von

20-40% der Zellen, in 2 Fällen mit einer Anfärbung von 75% der Zellen und in einem Fall mit einer Anfärbung von 90% der Zellen (IRS 3, 6, 9 bzw. 12).

Der Median der IRS-Werte für die Galektin-3-Färbung des Endometriosegewebes lag bei 1.

Neben den 20 Endometriosepräparaten ohne jeden Galektin-3-Nachweis (teils mit jedoch positiv gefärbten Makrophagen) beschränkte sich die Farbreaktion in 19 weiteren Präparaten ausschließlich auf Drüsenzellen. 9 Präparate zeigten ausschließlich (schwach) angefärbte Stromazellen und die 6 übrigen Präparate ergaben sowohl positive Stroma- als auch Drüsenzellen.

**Abbildung 18: Endometriosegewebe, Galektin-3-Färbung**



**Abbildung 18a** zeigt eine starke Galektin-3-Anfärbung von ca. 40% der Drüsenzellen des Endometriosegewebes (IRS 6) bei gleichzeitig niedrigintensiver Anfärbung einiger Stromazellen. *Vergrößerung (Objektiv): x6,3*

**Abbildung 18b** zeigt ebenfalls teils stark gefärbte Drüsenzellen sowie eine starke Anfärbung weniger Stromazellen in der Umgebung. Der Median für die Galektin-3-Färbung des Endometriosegewebes lag bei 1. Die in den Abbildungen starke Farbkonzentration auf den Drüsenbereich ist charakteristisch: Nur 15 der insgesamt 54 Endometriosepräparate ließen eine allenfalls schwache Anfärbung einzelner Stromazellen erkennen (darunter 6 Fälle mit gleichzeitig vorhandener Drüsenzellanfärbung). *Vergrößerung (Objektiv): x40*

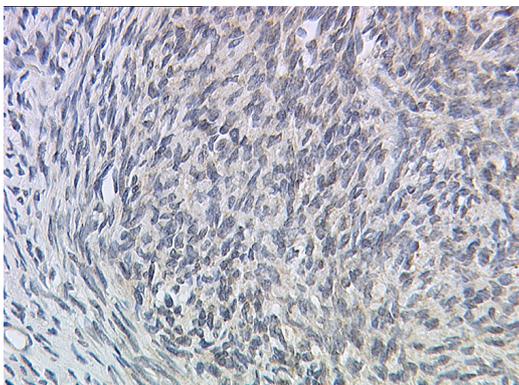
#### 4.1.6 Expression von Galektin-3 im Ovarstroma

In 6 der insgesamt 10 Ovarstroma-Präparaten ergab der Galektin-3-Färbeprozess eine maximal *leichte* Anfärbung: 2 Fälle reagierten mit <10% angefärbten Zellen, 1 Präparat mit 40% angefärbten Zellen und 3 Präparate mit 75% angefärbten Zellen (IRS 1-3).

3 weitere Fälle zeigten eine *mäßig starke* Anfärbung von 40% der Zellen (IRS 4).

Das letzte Präparat wies eine *starke* Anfärbung von 40% der Zellen auf (IRS 6). Der Median der IRS-Werte für die Galektin-3-Detektion im Ovarstroma lag bei 3.

**Abbildung 19: Normales Ovarstroma, Galektin-3-Färbung**



**Abbildung 19** zeigt die leichte Anfärbung von 75% der Ovarstromazellen - so bei 3 der 10 Präparate zu sehen (IRS 3). Für den IRS der 10 Galektin-1-gefärbten Ovarpräparate ergab sich ein Median von 3. *Vergrößerung (Objektiv): x25*

#### 4.1.7 Expression von Galektin-3 im Endometrium

Wie oben beschrieben entstammten die 15 Präparate aus Endometrium zu je einem Drittel Gebärmutter Schleimhaut der proliferativen, frühsekretorischen und spätsekretorischen Zyklusphase. Das proliferative Endometrium zeigte in 2 Präparaten *keine* Farbreaktion (IRS 0). 2 weitere Präparate ergaben eine *schwache* Anfärbung von <10% der Zellen (IRS 1). 1 Präparat zeigte eine *mäßig starke* Farbreaktion eines Drittels der Zellen (IRS 4).

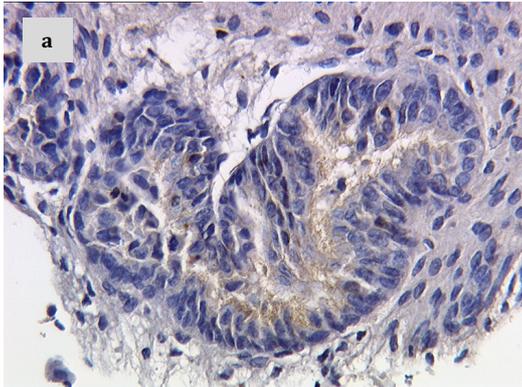
Das frühsekretorische Endometrium zeigte eine maximal *schwache* Anfärbung von <10% der Zellen in 2 Fällen (IRS 1) und von 90% der Zellen in einem Fall (IRS 4). Ein weiteres Präparat zeigte eine *mäßig starke* Anfärbung von 75% der Zellen (IRS 6). Für das 5. Präparat ergab sich keine Farbreaktion (IRS 0).

Der Färbeprozess des spätsekretorischen Endometriums hinterließ in 2 Präparaten keine Farbreaktion (IRS 0). Ein Präparat wies eine *schwache* Reaktion an 75% der

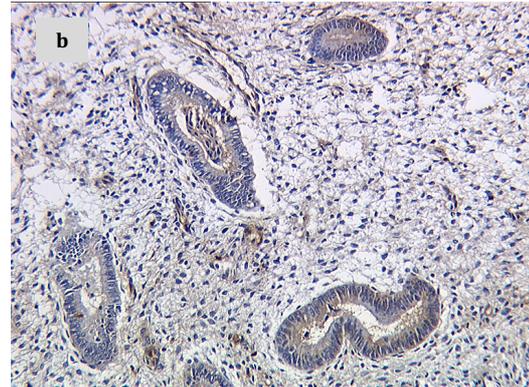
Zellen auf (IRS 3). Die übrigen beiden Präparate zeigten eine *mäßig starke* bzw. *starke* Anfärbung von jeweils unter 10% der dargestellten Zellen (IRS 2 bzw. 3).

Der Median (IRS) für die Galektin-3-Färbung des Endometriums lag bei 1. Ein signifikanter zyklusphasenspezifischer Unterschied wurde auch für Galektin-3 nicht nachgewiesen.

**Abbildung 20: Endometrium, Galektin-3-Färbung**

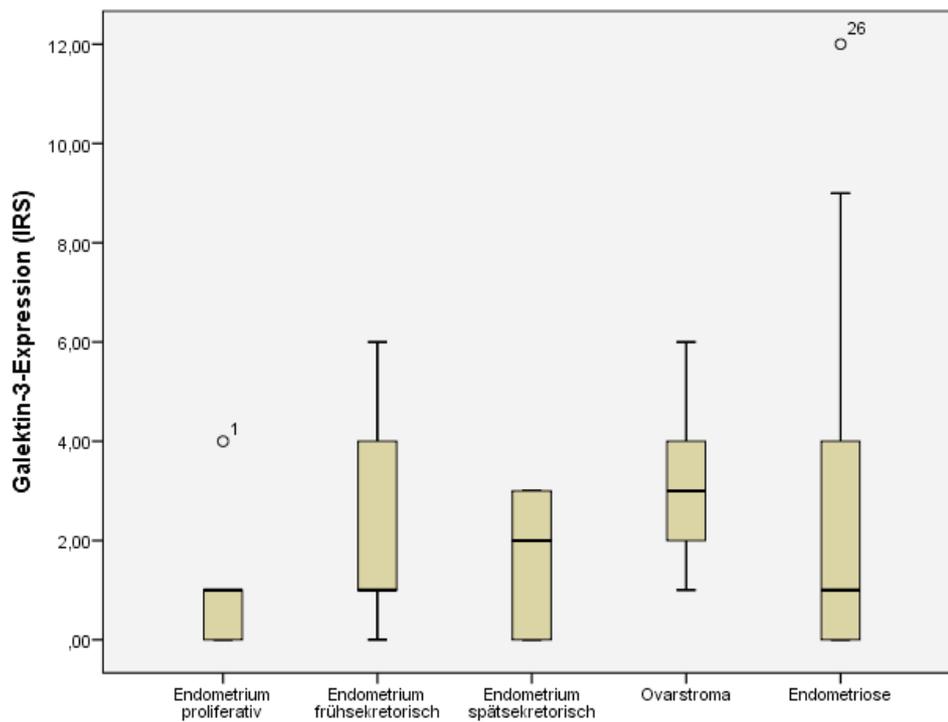


**Abbildung 20a** zeigt proliferatives Endometrium, das nach dem Galektin-3-Färbevorgang keine Anfärbung aufwies (IRS 0). *Vergrößerung (Objektiv): x25*



**Abbildung 20b** zeigt frühsekretorisches Endometrium, das nach dem Galektin-3-Färbevorgang eine schwache Anfärbung von <10% der Zellen aufwies (IRS 1). Der Median der IRS-Werte für die Galektin-3-Färbung des Endometriums lag bei 1. *Vergrößerung (Objektiv): x10*

**Abbildung 21:** Expression von Galektin-3 im unauffälligen Endometrium bzw. Ovarstroma nicht an Endometriose erkrankter Frauen und im Endometriosegewebe



**Abbildung 21** zeigt die Verteilung der IRS-Werte im Rahmen der am Endometrium, Ovarstroma und Endometriosegewebe durchgeführten Galektin-3-Färbung. Für das Endometriosegewebe und das proliferative sowie frühsekretorische Endometrium war der Median der IRS-Werte jeweils 1. Für das spätsekretorische Endometrium lag er bei 2, für das Ovarstroma bei 3. Die Unterschiede in der Galektin-3-Expression der fünf Gewebe waren statistisch nicht signifikant.

## 4.2 Zellkultur und Immunzytochemie: CRF als Regulator der Galektin-1-Expression von Endometriumskarzinomzellen in vitro

### 4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Erhöhung des CRF-Anteils im Nährmedium führte zu einer verminderten Galektin-1-Expression durch sowohl Ishikawa- als auch HEC-1B-Zellen.

### 4.2.2 Galektin-1-Expression der Ishikawa-Zellen nach CRF-Stimulation

Im Rahmen des Galektin-1-Färbeprozesses an Ishikawa-Zellen ergaben sich bezüglich der verschiedenen CRF-Konzentrationen im Nährmedium folgende Werte für den IRS und die statistische Signifikanz:

Tabelle 17: IRS und p-Wert für die Galektin-1-Färbung der Ishikawa-Zellen nach Stimulation mit CRF

CRF-Konzentration (ng/ml Medium)	IRS (Median)	Signifikanzwert
0 (reines Nährmedium)	12	
1	10,5	p = 0,083
10	9	p = 0,038
100	2	p = 0,023
1000	1,5	p = 0,024

Ishikawa-Zellen, die 72 Stunden lang mit reinem Nährmedium inkubiert wurden, zeigten nach dem Galektin-1-Färbeprozess eine *starke* Farbreaktion von über 80% der Zellen. Der IRS war 12.

Nach 72-stündiger Inkubation mit **1ng CRF** pro ml Medium zeigte sich an den Ishikawa-Zellen weiterhin eine *starke* Farbreaktion von 60 bis >80% der Zellen. Entsprechend ergaben sich IRS-Werte von 9 bzw. 12. Der Median für diese CRF-Konzentrationsstufe lag bei 10,5. Die Verminderung der Galektin-1-Expression war statistisch noch nicht signifikant (p=0,083).

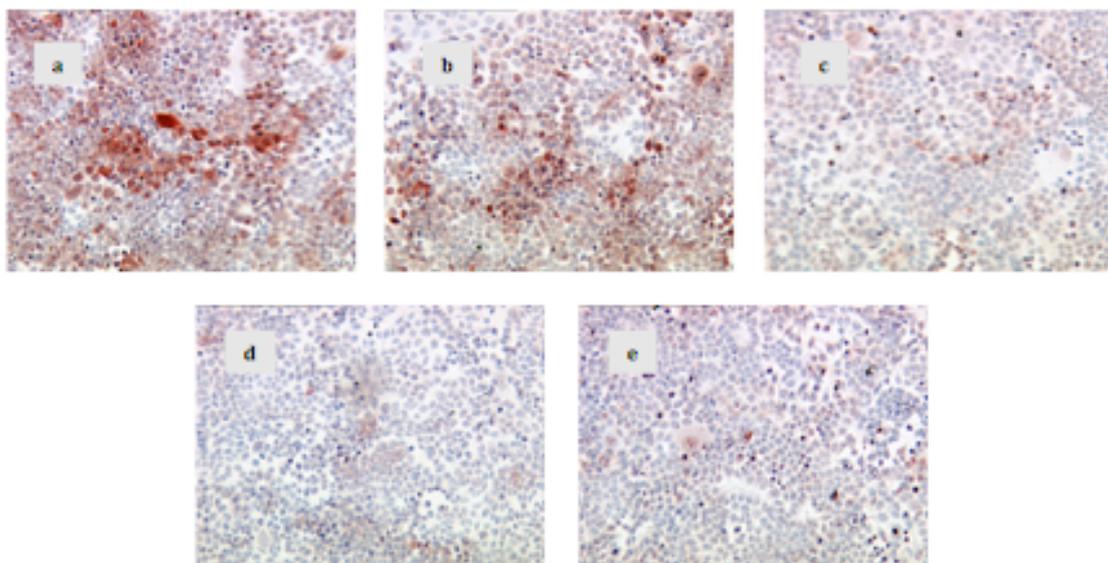
Bei einer CRF-Konzentration von **10ng CRF** pro ml Medium bewirkte der anschließende Galektin-1-Färbeprozess eine *mäßig starke* bis *starke* Farbreaktion von 75% bis >80% der Zellen (IRS 8, 9 und 12). Der Median der IRS-Werte für diese

CRF-Konzentrationsstufe lag bei 9. Der Unterschied zur Galektin-1-Expression der nicht-stimulierten Zellen war statistisch signifikant ( $p=0,038$ ).

Mit **100ng CRF** pro ml Medium inkubierte Zellen wiesen nach der Galektin-1-Färbung eine *schwache bis starke* Farbreaktion von <10% bis 40% der Zellen auf (IRS 2 bzw. 3) Der Median der IRS-Werte für diese CRF-Konzentrationsstufe lag bei 2. Die Verminderung der Galektin-1-Expression war statistisch signifikant ( $p=0,023$ ).

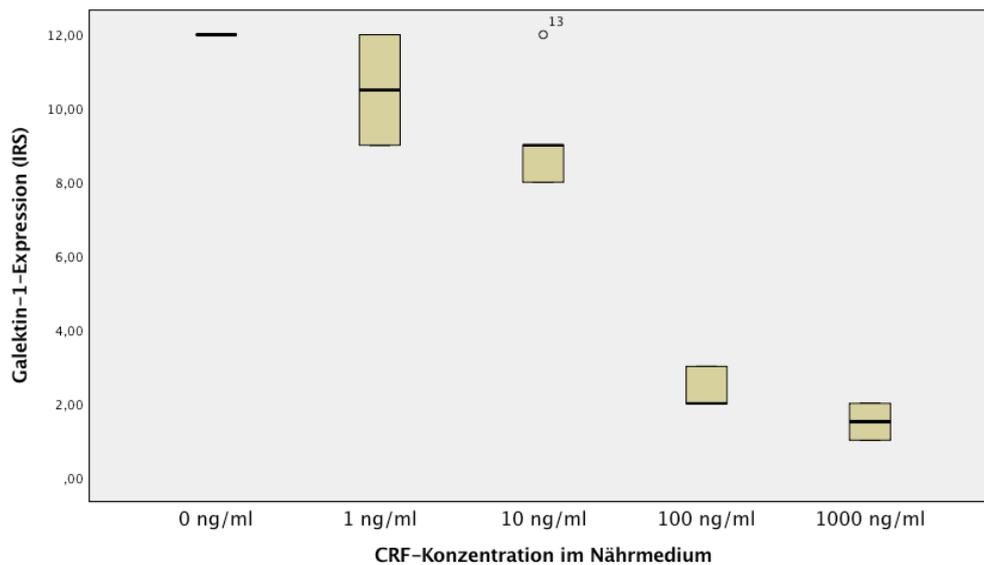
In der höchsten Konzentrationsstufe von **1000ng CRF** pro ml Medium reagierten nur noch <10% bis 40% der Ishikawa-Zellen *schwach bis moderat* auf den Galektin-1-Färbeprozess (IRS 1 bzw. 2). Der Median der IRS-Werte lag bei 1,5. Dieses Ergebnis war ebenfalls statistisch signifikant ( $p=0,024$ ).

**Abbildung 22: Galektin-1-Expression von Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen CRF-Konzentrationen**



**Abbildung 22** zeigt Ishikawa-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit **reinem Nährmedium (a)**, **1ng CRF/ml Medium (b)**, **10ng CRF/ml Medium (c)**, **100ng CRF/ml Medium (d)** und **1000ng CRF/ml Medium (e)**. Mit steigender CRF-Konzentration ergab sich eine abnehmende Intensität der Zellfärbung im Sinne einer durch das Stresshormon CRF bedingten Downregulation der Galektin-1-Expression: (a) >80% der Zellen stark angefärbt, (b) >50% der Zellen stark angefärbt, (c) >80% der Zellen mäßig stark angefärbt, (d) 25% der Zellen mäßig stark angefärbt, (e) <10% der Zellen mäßig stark angefärbt. *Vergrößerung (Objektiv): x10*

**Abbildung 23:** Galektin-1-Expression der Ishikawa-Zellen in Abhängigkeit von der CRF-Konzentration im Nährmedium



**Abbildung 23** veranschaulicht die abnehmende Galektin-1-Expression der Ishikawa-Zellen in Abhängigkeit von der zunehmenden CRF-Konzentration im Nährmedium. Nach 72-stündiger Inkubation lag der Median des IRS jeweils bei 12 (reines Nährmedium), 10,5 (1ng CRF/ml), 9 (10ng CRF/ml), 2 (100ng CRF/ml) bzw. 1,5 (1000ng CRF/ml).

#### 4.2.3 Galektin-1-Expression der HEC-1B-Zellen nach CRF-Stimulation

Im Rahmen des Galektin-1-Färbeprozesses an HEC-1B-Zellen ergaben sich bezüglich der verschiedenen CRF-Konzentrationen im Nährmedium folgende Werte für den IRS und die statistische Signifikanz:

**Tabelle 18:** IRS und p-Wert für die Galektin-1-Färbung der HEC-1B-Zellen nach Stimulation mit CRF

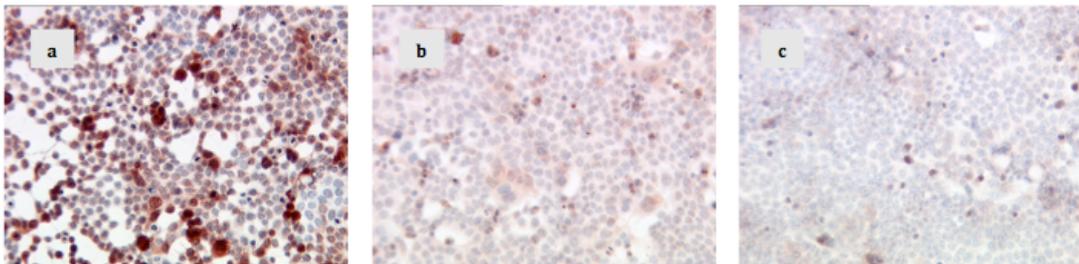
CRF-Konzentration (ng/ml Medium)	IRS (Median)	Signifikanzwert
0 (reines Nährmedium)	12	
10	3	p = 0,038
100	1	p = 0,041

HEC-1B-Zellen, die 72 Stunden lang mit reinem Nährmedium inkubiert wurden, zeigten wie die Ishikawa-Zellen in der Galektin-1-Färbung eine *starke* Farbreaktion von über 80% der Zellen. Der IRS war 12.

Bei einer CRF-Konzentration von **10ng CRF** pro ml Medium ergab die anschließende Galektin-1-Färbung eine *moderate bis starke* Farbreaktion von <10% bis 70% der Zellen (IRS 3 bzw. 6). Der Median für diese CRF-Konzentrationsstufe lag bei 3. Die Verminderung der Galektin-1-Expression war statistisch signifikant ( $p = 0,038$ ).

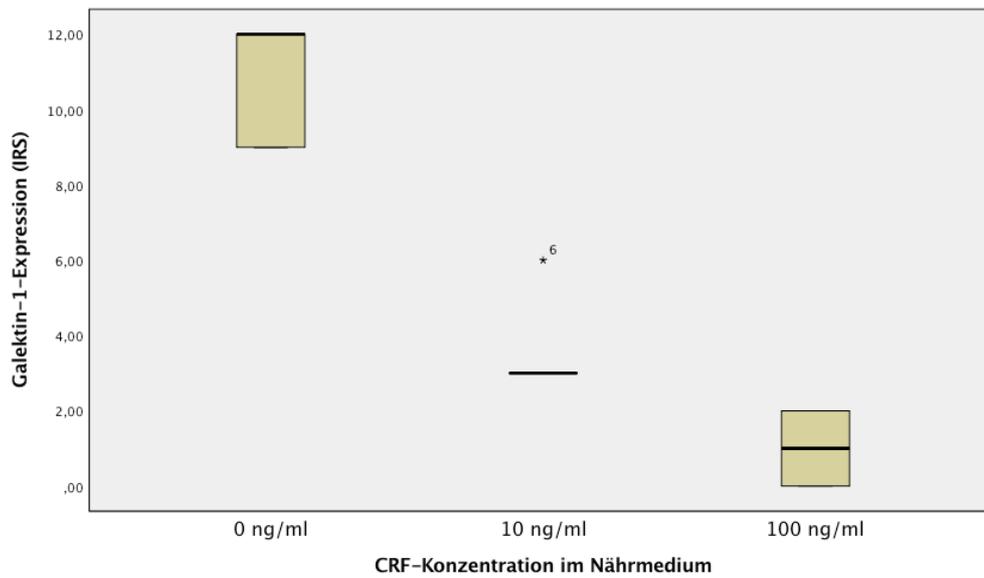
Mit **100ng CRF** pro ml Medium inkubierte HEC-1B-Zellen wiesen nach Galektin-1-Färbung entweder keine Farbreaktion mehr oder nur noch eine *schwache bis mäßig starke* Farbreaktion von <10% der Zellen auf (IRS 1 bzw. 2). Der Median für diese CRF-Konzentrationsstufe lag bei 1. Mit einem p-Wert von 0,041 war auch dieses Ergebnis statistisch signifikant.

**Abbildung 24: Galektin-1-Expression von HEC-1B-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen CRF-Konzentrationen**



**Abbildung 24** zeigt HEC-1B-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit **reinem Nährmedium (a)**, mit **10ng CRF/ml Medium (b)** und mit **100ng CRF/ml Medium (c)**. Wie beim entsprechenden Versuch mit Ishikawa-Zellen ergibt sich hier mit steigender CRF-Konzentration ein Abfall der Färbeintensität und der Anzahl gefärbter Zellen: (a) >80% der Zellen stark angefärbt, (b) <10% der Zellen stark angefärbt, (c) <10% der Zellen mäßig stark angefärbt. Vergrößerung (Objektiv): x10

**Abbildung 25:** Galektin-1-Expression der HEC-1B-Zellen in Abhängigkeit von der CRF-Konzentration im Nährmedium



**Abbildung 25** veranschaulicht die abnehmende Galektin-1-Expression der HEC-1B-Zellen in Abhängigkeit von der zunehmenden CRF-Konzentration im Nährmedium. Nach 72-stündiger Inkubation lag der Median des IRS jeweils bei 12 (reines Nährmedium), 3 (10ng CRF/ml) bzw. 1 (100ng CRF/ml).

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Versuche

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass das Protein Galektin-1 vom ektopen Endometriosegewebe signifikant weniger exprimiert wird als vom Ovarstroma und eutopen Endometrium nicht an Endometriose erkrankter Frauen. Als möglicher Auslöser dieser Galektin-1-Downregulation konnte das Stresshormon CRF identifiziert werden, da es in Modellzellen für Endometriose eine Galektin-1-Downregulation bewirkte.

Die Galektin-3-Expression von Endometriosegewebe, Ovarstroma und Endometrium wurde simultan zur Galektin-1-Expression untersucht. Die dabei beobachteten Veränderungen waren statistisch jedoch nicht signifikant.

Um die beschriebenen Ergebnisse vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes besser diskutieren zu können, fasst das folgende Kapitel die wesentlichen Merkmale der Molekülgruppe der Galektine zusammen.

### 5.2 Überblick über die Molekülgruppe der Galektine

Die Galektine sind eine der 5 Unterfamilien der Lektine, einer Gruppe von Proteinen, die in der Lage ist, eine Vielzahl von Kohlenhydratstrukturen auf anderen Proteinen und Lipiden (= Glykokonjugate) zu erkennen. Lektine binden an diese Glykokonjugate, die sich beispielsweise auf der Oberfläche von Zellen und in der Extrazellulärmatrix befinden, und übernehmen dadurch eine wichtige Rolle bei Zelladhäsionsvorgängen, bei Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen, bei der Erkennung von Pathogenen und bei zahlreichen anderen biologischen Prozessen.<sup>106</sup>

Die meisten Lektine lassen sich einer der 5 folgenden Familien zuordnen: Den Lektinen vom C-Typ, I-Typ oder P-Typ, den Pentraxinen oder den Galektinen (früher auch S-Typ-Lektine oder S-Lac-Lektine genannt).<sup>107,108</sup> In der folgenden Abbildung sind diese 5 Familien tabellarisch dargestellt:

Tabelle 19: Hauptfamilien tierischer Lektine<sup>108</sup>

Familie	Strukturmotiv	Zuckerligand
C-Typ	Konservierte CRD*	Variabel (Mannose, Galaktose, Fukose, Heparin-Tetrasaccharid u.a.)
Galektine (früher S-Typ)	Konservierte CRD	Gal $\beta$ 1,3(4)GlcNAc Basisstrukturen mit Spezies- und Galektintyp-abhängigen Affinitätsunterschieden für die Verlängerung z.B. zu den Blutgruppenantigenen A, B oder H; Affinität zu Poly(N-Acetyllaktosamin)-Ketten
I-Typ	Immunglobulin-ähnliche CRD	Variabel (Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , HNK-1-Epitop, Hyaluronsäure, $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-Sialyllaktose)
Pentraxine	Pentamerische Anordnung der Untereinheiten	4,6-Ringazetale von $\beta$ -Galaktose, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide
P-Typ	Konservierte CRD	Mannose-6-Phosphat-enthaltende Glykoproteine

\*CRD = carbohydrate recognition domain

Die Galektine werden definiert als  $\beta$ -Galaktose-bindende Proteine, deren Kohlenhydratbindungsstelle sich aus charakteristischen Aminosäuresequenzen zusammensetzt.

Zu finden sind Galektine in einer großen Anzahl von Geweben und Lebewesen: neben dem Menschen zum Beispiel in verschiedenen anderen Säugetierarten, aber auch in Pflanzen<sup>109</sup>, wirbellosen Schwämmen<sup>110</sup> oder Fadenwürmern<sup>111</sup>. Nach einem langen Zeitraum uneinheitlicher Nomenklatur wurden 1994 die vier bis dahin am besten erforschten humanen Galektine von Barondes et al. als Galektin-1 bis Galektin-4 durchnummeriert und beschrieben.<sup>112</sup> Seitdem konnten mehr als 10 weitere, in Säugetieren vorkommende Galektine identifiziert werden. Obwohl in ihrer sonstigen Struktur sehr unterschiedlich, sind ihnen allen die typischen, aus etwa 130 Aminosäuren bestehenden kohlenhydratbindenden Sequenzen (carbohydrate recognition domain, CRD) gemeinsam, die sich evolutionär kaum verändert haben („konservierte Gensequenzen“).

Letzteres spricht dafür, dass diese Sequenzen und ihre kohlenhydratbindenden Eigenschaften für grundlegende Funktionen des Organismus unerlässlich sind.

Die Mehrheit der Galektine verfügt über eine einzelne kohlenhydraterkennende Domäne und ist als Monomer (Gal-5, -7 und -10) oder in der Homodimer-Form (Gal-1, -2, -11, -13, -14 und -15) biologisch aktiv.<sup>88</sup> Andere Galektine (Gal-4, -6, -8, -9, und -12) enthalten zwei unterschiedliche CRDs, die durch ein kurzes Verbindungspeptid voneinander getrennt sind, sogenannte Tandem-Repeat Galektine. Galektin-3 besitzt nur eine CRD in Kombination mit einer Nicht-Lektin-Domäne, über die es sich mit anderen Galektin-3-Monomeren zu oligomeren Komplexen zusammenschließt.<sup>88</sup>

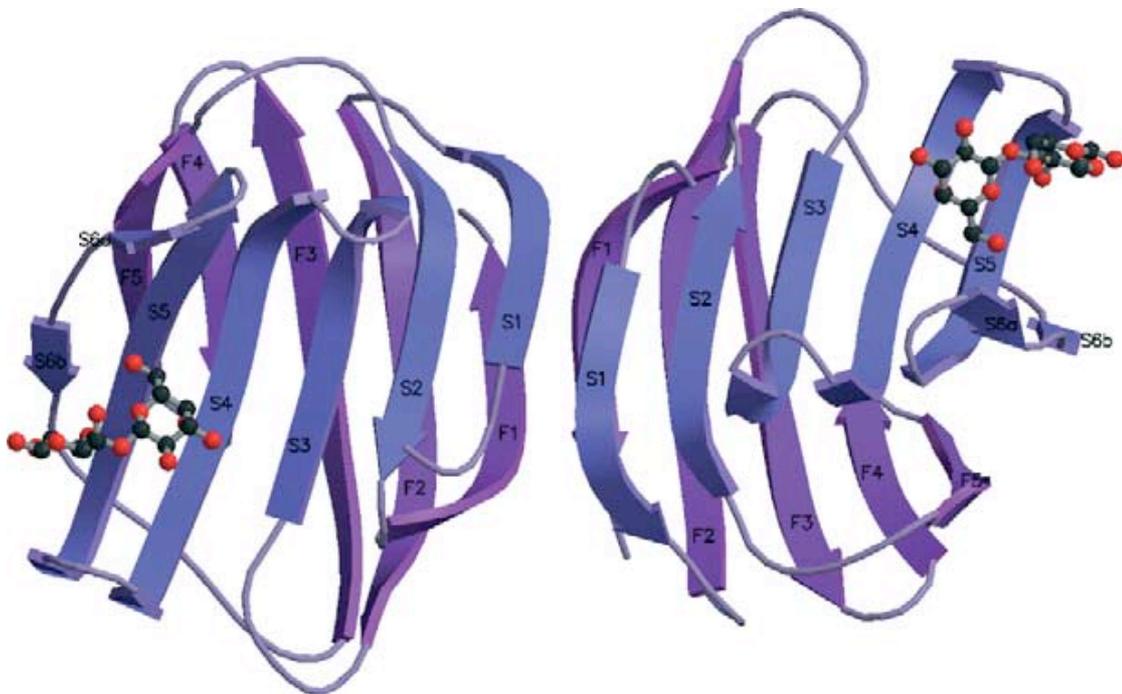
**Tabelle 20: Wesentliche Eigenschaften der Galektine 1 und 3<sup>111-113</sup>**

	<b>Galektin-1</b>	<b>Galektin-3</b>
<b>Biochemische Struktur</b>	Prototyp Monomer/Homodimer	Chimär-Typ Besonderheit: glycin-, prolin- und tyrosin-reiche Verbindungsdomäne → Bildung oligomerer Komplexe
<b>Molekulargewicht einer CRD-Untereinheit</b>	12-16 kDa	29-37 kDa
<b>Andere Namen</b>	L-14, BHL, Galaptin	Mac-2, L-29, CBP-35, εBP
<b>Vorkommen</b>	Mehrzahl der Organe, Lymphknoten, Milz, Thymus, Plazenta, Prostata, Makrophagen, B-Zellen, T- Zellen, Dendritische Zellen	Hauptsächlich in Tumorzellen, Makrophagen, Epithelzellen, Fibroblasten, aktivierten T-Zellen
<b>Glykokonjugat-Liganden</b>	Matrixglykoproteine: Laminin, Fibronectin, 90K/Mac-2BP Zelloberflächenrezeptoren: CD45, CD43, CD7, CD2, CD3 und GM1	Matrixglykoproteine: Laminin, Fibronectin, LAMPS, 90K/Mac-2BP, MP20 und CEA
<b>Kodierendes Gen (Genom-Datenbank)</b>	LGALS1*	LGALS3*

\* GALactoside-binding, Soluble

Die Galektine wirken als Brücke sowohl zwischen Zellen derselben Art wie auch zwischen unterschiedlichen Zelltypen. Außerdem verbinden sie Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix. Signale von außen werden durch Galektinbindung ins Innere der Zellen vermittelt. Auch in den Zellen selbst sind Galektine in fundamentale Abläufe involviert, zirkulieren als Shuttle zwischen Zytoplasma und Zellkern und nehmen so Einfluss auf Prozesse wie z. B. das Pre-RNA-Splicing.<sup>106</sup> Diese Vielzahl an Funktionen macht die Galektine zu einem facettenreichen Forschungsobjekt.

**Abbildung 26:** Dreidimensionale Darstellung des homodimeren Galektin-1. Die beta-Stränge sind entsprechend beschriftet (F1-F5; S1-S6a/S6b)



Quelle: Lopez-Lucendo, M.F., *et al.* Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *Journal of molecular biology* 343, 957-970 (2004)

## **5.3 Galektin-1 und auffällige Immunparameter bei Endometriose**

### **5.3.1 Überblick**

Nachdem die Pathogenese der Endometriose trotz verschiedener Theorien weiterhin nicht zufriedenstellend geklärt ist, befasst sich die Wissenschaft seit einigen Jahren vermehrt mit immunologischen Aspekten der Erkrankung.<sup>113</sup> Es gibt viele Faktoren, die möglicherweise Überleben, Implantation und Proliferation endometrialer Zellen in der Bauchhöhle und an weiter entfernt liegenden Organen begünstigen.<sup>114</sup> Dazu gehören bioaktive Moleküle wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Prostaglandine ebenso wie die unterschiedlichen Zelltypen, die innerhalb von Endometrioseläsionen nachweisbar sind: Immunzellen, endometriale Epithelzellen, Stromazellen und vaskuläre Endothelzellen.<sup>83</sup> Untersucht man die Immunzellen von Endometriose-Patientinnen, so finden sich teils ausgeprägte Veränderungen der entsprechenden Zellen nicht nur innerhalb des Erkrankungsgewebes, sondern auch in der Peritonealflüssigkeit, im Cavum uteri und im Blutkreislauf.<sup>115</sup>

Viele dieser bei der Endometriose auffälligen immunologischen Faktoren sind in mehr oder weniger engem Zusammenhang mit dem immunmodulierenden Protein Galektin-1 zu sehen. Dieser Zusammenhang soll diskutiert werden im Hinblick auf die in dieser Arbeit für das Endometriosegewebe nachgewiesene Galektin-1-Downregulation.

### **5.3.2 Reifestörung der Dendritischen Zellen**

Im normalen Zyklus einer Frau sind die im Uterus befindlichen Immunzellen teils großen Veränderungen unterworfen. Sie gewährleisten den immunologischen Schutz der endometrialen Mukosa und übernehmen Regulationsfunktionen im Rahmen der Implantation eines Embryos und der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft.<sup>115</sup> Während der sekretorischen Zyklusphase werden vermehrt Immunzellen wie Makrophagen, Neutrophile und Natürliche Killerzellen im eutopen Endometrium rekrutiert. Sie spielen eine entscheidende Rolle in Reinigungs-, Wiederaufbau- und Reparaturprozessen des Endometriums während und im Anschluss an die Menstruationsblutung.<sup>116</sup> Berbic und Fraser stellten die Hypothese auf, dass durch das Funktionsversagen bestimmter Immunzellpopulationen endometriale Fragmente vital blieben und dadurch in der

Lage seien, sich nach retrograder Menstruation in der Bauchhöhle zu implantieren. Dies wiederum führe dort zu Immunreaktionen des Körpers, zu denen es andernfalls nie kommen würde.<sup>115</sup>

Während die Zahl unreifer Dendritischer Zellen (CD1a+) im eutopen Endometrium von Endometriose-Patientinnen in der proliferativen Phase signifikant erhöht ist, sind reife Formen dieser Zellpopulation (CD83+) zu allen Zyklusphasen in deutlich vermindertem Maß vorhanden.<sup>117</sup> Es scheint also bei der Endometriose eine Reifestörung der Dendritischen Zellen vorzuliegen. Dies bedeutet, dass die Antigenbindung durch die Dendritischen Zellen und die anschließende Antigenpräsentation gegenüber den in Lymphknoten befindlichen T-Zellen nur unzureichend funktioniert und in der Folge eine adäquate antigenspezifische Immunantwort der T-Lymphozyten ausbleibt.<sup>118</sup> Darüberhinaus weisen Frauen mit Endometriose in ihrem Blut eine erhöhte Zahl anti-endometrialer Antikörper auf, die geeignet sind, endometriale Antigene zu maskieren.<sup>119</sup> Diese beiden Faktoren zusammengenommen – defekte dendritische Erkennung/Präsentation und Maskierung durch anti-endometriale Antikörper – könnten ein Faktor sein, der die Erkennung endometrialer Antigene durch Immunzellen behindert und der dadurch ein Vital- und Implantationsfähig-bleiben endometrialen (Menstruations-)Gewebes begünstigt.

In ektopen Endometrioseherden und im unmittelbar angrenzenden Peritoneum beobachteten Schulke et al. eine signifikante Erhöhung (unreifer) CD1a+ Dendritischer Zellen verglichen mit dem weiter entfernten Bauchfell und dem eutopen Endometrium von Patientinnen.<sup>117</sup> In Peritonealbiopsien von gesunden Kontrollprobandinnen fanden sich im Unterschied dazu weder (unreife) CD1a+ noch (reife) CD83+ Dendritische Zellen.

Galektin-1 induziert bekanntermaßen die phänotypische und funktionelle Reifung Dendritischer Zellen auf etwa ähnliche Weise, wie dies die Lipopolysaccharide (LPS) in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien tun. So zeigen unreife Dendritische Zellen bei Galektin-1-Kontakt eine Hochregulation von Oberflächenmarkern, die charakteristisch sind für die Reifung der Dendritischen Zellen: CD40, CD83, CD86 und HLA-DR. Außerdem werden sie durch Galektin-1 zur Sekretion hoher IL-6- und TNF- $\alpha$ -Mengen angeregt, stimulieren die T-Zell-

Proliferation und weisen eine reduzierte endozytotische Kapazität auf, ähnlich wie Dendritische Zellen unter LPS-Einfluss.<sup>120</sup>

In Zusammenschau der genannten Faktoren könnte das von uns beobachtete relative Galektin-1-Defizit in Endometrioseherden (verglichen mit dem Ovarstroma und dem eutopen Endometrium gesunder Probandinnen) verantwortlich sein dafür, dass die Reifung Dendritischer Zellen am Ort der Läsion ausbleibt und sie ihren vielfältigen Funktionen nur eingeschränkt nachkommen können. Da Galektin-1 außerdem die Migration Dendritischer Zellen durch die Extrazellulärmatrix verstärkt, hier aber downreguliert ist, fehlt im Bereich der Endometrioseherde unter Umständen eine wichtige Komponente für den reibungslosen Ablauf der Immunantwort.<sup>120</sup>

### 5.3.3 Veränderte Makrophagen

Monozyten und Makrophagen sind neben ihrer Aufräumfunktion als Phagozyten (altgriechisch *phagein* „essen“) bekannt dafür, dass sie über die Sekretion bestimmter Stoffe (Nicht-)Immunzellen modulieren.<sup>121</sup>

Bei gesunden Frauen kommt es zum Zeitpunkt der Menstruation (Tag 3-4) zu einem deutlichen Anstieg der Makrophagen in utero – wohl im Zuge der Entfernung menstrualen Gewebes und der anschließenden Regeneration des Endometriums.<sup>115</sup> Bei Endometriose-Patientinnen findet sich dieses Phänomen einer Makrophagenvermehrung in den Tagen der Menstruation *nicht*.<sup>122</sup> Auch das mag zu Persistenz und fortgesetzter Vitalität endometrialer Fragmente beitragen.

Blickt man auf die in der Peritonealhöhle von Patientinnen befindlichen Makrophagen, so zeigt sich eine Zunahme dieser Zellen sowohl in Zahl als auch in Konzentration und Aktivitätsgrad.<sup>123-125</sup> Von Makrophagen sezernierte Produkte wie Wachstumsfaktoren und Zytokine werden hier in vermehrtem Maß freigesetzt und beeinflussen sicherlich Überleben und Wachstum ektooper endometrialer Zellen im Peritoneum.<sup>126</sup> So weisen schon In-vitro-Studien aus den 1990er Jahren nach, dass peritoneale Makrophagen von Endometriose-Patientinnen erhöhte Mengen an Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sezernieren.<sup>127,128</sup> Diese Stoffe verstärken nachgewiesenermaßen die Adhäsion endometrialer Zellen am Peritoneum<sup>129</sup> und korrelieren in hoher Konzentration mit Infertilität und Embryotoxizität.<sup>130,131</sup>

Außerdem sind Makrophagen im Rahmen ihrer Fresszell-Tätigkeit auf eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren angewiesen.<sup>132-134</sup> Diese Rezeptoren wiederum unterliegen der Regulation durch Zytokine, Glukokortikoide, Lipopolysaccharide, Interferone, Makrophagen-CSF und Retinoide. Dass die genannten Zytokine und Hormone bei Endometriose in anormaler Höhe in der Peritonealflüssigkeit nachweisbar sind, könnte über eine veränderte Rezeptorregulation eine defekte Fressfunktion der Makrophagen zur Folge haben und zum Wachsen peritonealer endometrialer Herde beitragen.<sup>121,135</sup> Tran et al. berichteten 2009 über die signifikante Vermehrung von Makrophagen sowohl in Endometrioseläsionen als auch im übrigen Peritoneum von Patientinnen verglichen mit dem Peritoneum von Frauen ohne Endometriose.<sup>136</sup> Darüberhinaus waren in den Arealen, in denen sich eine erhöhte Zahl von Makrophagen befand, auch deutlich mehr Nervenfasern nachzuweisen. Vor dem Hintergrund der für die Endometriose typischen Schmerzsymptomatik ist dies eine interessante Beobachtung. Denn Makrophagen stimulieren nicht nur die Nervenfasern im Sinne der Auslösung einer Schmerzwahrnehmung, sondern tragen über die Beeinflussung der Synthese von NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain derived neurotropic factor*) und VEGF auch zu Wachstum und Reparatur der Nervenfasern bei.<sup>137</sup>

Galektin-1 scheint in aktivierten Makrophagen die Arginase-Aktivität und damit einen alternativen Stoffwechselweg zu fördern.<sup>138</sup> Darüberhinaus reguliert es über ERK1/2 die Expression regulatorischer Oberflächenmoleküle.<sup>139</sup> Diese beiden Beobachtungen zusammengenommen weisen darauf hin, dass Galektin-1 in Makrophagen eine Situation der „alternativen Aktivierung“ oder sogar der „Deaktivierung“ bewirkt.<sup>140</sup> Die genaue pathophysiologische Rolle des Lektins in Bezug auf Makrophagen bleibt noch zu erforschen. Doch ist angesichts des beschriebenen deaktivierenden Effekts auf Makrophagen ein Zusammenhang zwischen der Galektin-1-Verminderung und dem außerordentlichen Anstieg von Makrophagen in Endometrioseläsionen denkbar.

### 5.3.4 T-Lymphozyten im Bereich der Endometrioseläsionen

Aus der Gruppe der Leukozyten finden sich innerhalb der Endometrioseläsionen vor allem Makrophagen und T-Lymphozyten.<sup>141</sup> Verglichen mit eutopem Endometrium lassen sich vermehrt CD4+ und CD8+ Zellen (Verhältnis CD4/CD8 = 0.78) nachweisen. Auch ist in Endometrioseherden eine größere Anzahl aktivierter T-Zellen vorhanden als im normalen Endometrium.<sup>142</sup>

Gieseke et al. (2010) beschrieben Galektin-1 als entscheidendes Protein für den immunmodulatorischen Effekt multipotenter mesenchymaler Stromazellen auf CD4+ und CD8+ Zellen.<sup>143</sup> So bewirkte der Knockdown von Galektin-1 in Stromazellen die zumindest teilweise Wiederherstellung der umgebenden Lymphozytenproliferation. Diese Beobachtungen lassen sich auf die Situation im Endometriosegewebe übertragen: Die Downregulation von Galektin-1 könnte mit der Vermehrung der Lymphozyten im Bereich der Endometrioseherde zusammenhängen. Dass eine solche Verbindung besteht, lässt sich auch am Beispiel des physiologischen eutopen Endometriums veranschaulichen: Dort nimmt laut der Untersuchungen von Wolff et al. die Galektin-1-Expression zur späte sekretorischen Phase hin signifikant zu<sup>91</sup>, während aktivierte T-Zellen zahlenmäßig deutlich abfallen<sup>142</sup>.

Allgemein ist über Galektin-1 und seine Beziehung zu T-Lymphozyten zu sagen, dass dieses kohlenhydratbindende Protein neben erwiesenen pro-apoptischen Effekten auf aktivierte T-Zellen auch fähig ist, das Überleben naiver T-Zellen zu unterstützen (ohne jedoch deren Proliferation voranzutreiben). Galektin-1 scheint damit in der Lage zu sein, unterschiedliche oder sogar gegenteilige Signale weiterzuleiten, abhängig von Faktoren wie dem Aktivitätsstatus der betreffenden Zellen, der raumzeitlichen Expression spezifischer Glykosyltransferasen und den generellen Verhältnissen in der Zellkultur. Auch die biochemische Verfasstheit des verwendeten Galektin-1 (Monomer-/Dimer-Form) und der jeweiligen Zielzellen (z.B. aktiviert, differenziert, ruhend) ist von Bedeutung. Diese Faktoren werden in zukünftigen Arbeiten verstärkt zu berücksichtigen sein, um definitive Aussagen über die immunmodulatorischen Effekte der Galektin-1-Downregulation bei der Endometriose zu ermöglichen.<sup>140</sup>

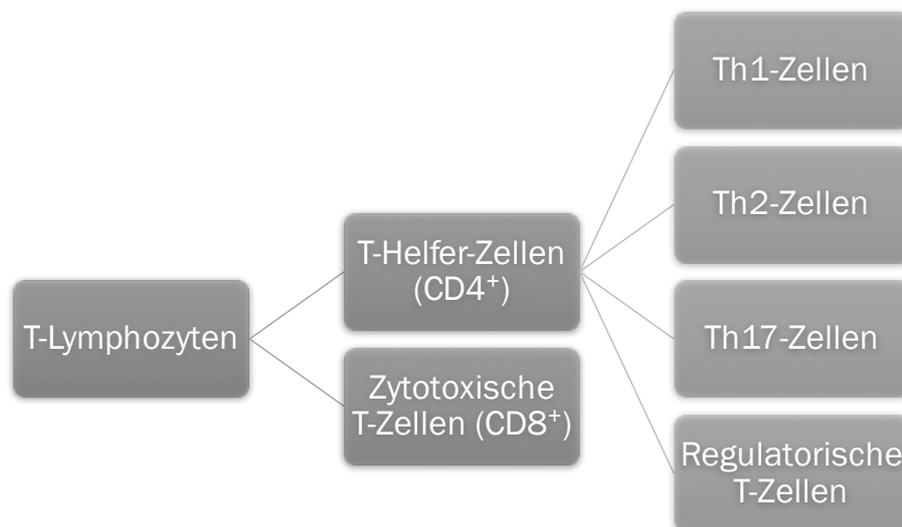
Obgleich in hoher Zahl in den Endometrioseläsionen vorhanden, scheinen gerade die zytotoxischen T-Zellen von Patientinnen in ihrer Funktion deutlich eingeschränkt

zu sein. Bereits 1981 zeigten Dmowski et al., dass die intradermale Injektion autologen Endometriums bei Rhesusaffen mit Endometriose zu einer deutlich schwächeren lymphozytären Infiltration der Injektionsstelle führt, als dies bei gesunden Tieren der Fall ist.<sup>144</sup> Sowohl die Lymphozyten erkrankter Rhesusaffen (in vivo) als auch die von Frauen mit Endometriose (in vitro) zeigten eine verminderte proliferative Reaktion auf autologe Endometriumzellen.<sup>144-146</sup> Darüberhinaus war bei Patientinnen die Zytotoxizität der T-Lymphozyten gegen autologes Endometrium erniedrigt.<sup>147</sup> Dieses Defizit konnte durch die In-vitro-Stimulation peripherer Blut-Lymphozyten mit rekombinantem Interleukin-2 korrigiert werden.<sup>148</sup>

Andere Punkte, die eine Schwächung der T-Zellen hervorrufen, wurden weiter oben in diesem Kapitel bereits genannt: Etwa die Reifestörung Dendritischer Zellen, die zu mangelnder Antigen-Präsentation gegenüber T-Lymphozyten führt; eine Maskierung des Gewebes durch anti-endometriale Antikörper; unterschiedlichste Stoffe in der Peritonealflüssigkeit; und die dort vermehrt vorhandenen regulatorischen T-Zellen (siehe nächstes Kapitel 5.3.5).

### 5.3.5 Relative Zunahme regulatorischer T-Lymphozyten

Abbildung 27: Untergruppen der T-Lymphozyten



Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) kontrollieren und unterdrücken eine Reihe von Immunprozessen, darunter die T-Zell-Proliferation<sup>149</sup> und -Aktivierung<sup>150</sup>, die Funktion von Makrophagen, B-Zellen, Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen<sup>151,152</sup>, die Zytokinfreisetzung<sup>152</sup> sowie die Mastzelldegranulation<sup>150</sup>.

Berbic und Fraser beobachteten eine relative Zunahme regulatorischer T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor Foxp3+ exprimieren, im sekretorischen eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose.

Während die Zahl dieser Foxp3(+)-Zellen im eutopen Endometrium von Frauen *ohne* Endometriose zwischen der spätproliferativen und frühsekretorischen Phase (also um den Zeitpunkt der Ovulation) zunimmt, um dann in der Lutealphase dramatisch abzusinken, bleiben die intrauterinen regulatorischen T-Zellen bei Frauen *mit* Endometriose auch während der gesamten sekretorischen Phase hochreguliert.<sup>153</sup> Arruvito et al. nehmen an, dass der kurze präimplantatorische Anstieg der Zahl regulatorischer T-Zellen notwendig ist, um Immuntoleranz zu induzieren und eine erfolgreiche embryonale Implantation zu ermöglichen. Eine permanente Hochregulation der Foxp3(+)-Zellen während der Sekretionsphase, wie von Berbic und Fraser 2010 für die Endometriose beschrieben, könnte unter anderem zu einer Treg-induzierten Suppression der Funktion prämenstruell in die Uterushöhle eingewanderter Immunzellen führen. Dies würde wieder das Überleben abgestoßener Endometriumzellen erleichtern.

Blickt man auf die Situation im peripheren Blut und in der Peritonealflüssigkeit betroffener Frauen, so zeigt eine Studie von 2012 den Anteil der Treg-Zellen im ersten Fall vermindert, im zweiten erhöht.<sup>154</sup> Regulatorische T-Zellen in der Peritonealflüssigkeit könnten die dort vorhandenen T-Zellen dahingehend beeinflussen, dass diese die Implantation von Gebärmutter-schleimhautzellen im Peritonealraum nicht mehr verhindern. Oder aber sie könnten der Auslöser sein für die beobachtete verstärkte Aktivierung dieser Zellen, während es andere noch zu spezifizierende Faktoren sind, die die letztlich insuffiziente Abwehrfunktion der T-Lymphozyten zu verantworten haben.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sich die Population der Foxp3+ regulatorischen T-Zellen in Frauen mit Endometriose stark verändert verhält.<sup>155</sup> Berbic et al. wiesen in zumindest 18 von insgesamt 59 ektopen Endometrioseläsionen Foxp3(+)-Zellen nach. Dagegen waren weder im benachbarten oder weiter entfernten Peritoneum von Patientinnen noch in Peritonealbiopsien von Frauen ohne Endometriose regulatorische T-Zellen zu finden. Ob ein Zusammenhang besteht zwischen der in dieser Arbeit nachgewiesenen verminderten Galektin-1-Expression in Endometrioseherden und

dem zumindest teilweisen, ausschließlich auf Erkrankungsherde beschränkten Vorkommen regulatorischer T-Zellen, ist zu klären. Im Rahmen von Autoimmunprozessen scheint die Expansion regulatorischer T-Zellen eher durch Vermehrung von Galektin-1 als durch eine Verminderung ausgelöst zu werden.<sup>156</sup> Stattdessen könnte der bei Endometriose in erhöhter Konzentration vorliegende Vascular endothelial growth factor oder der jeweilige Entwicklungsstand der Läsion für die Vermehrung der Foxp3(+)-Zellen ausschlaggebend sein. Rote, vaskularisierte Endometrioseherde weisen ein anderes Immunzellmuster auf als ältere, vernarbte oder schwarze Läsionen.<sup>155</sup> VEGF ist auch hierfür eine mögliche Einflussgröße. Inwiefern sich die Expressionsmuster des immunregulatorisch wirksamen Galektin-1 innerhalb der verschiedenen Läsionstypen unterscheiden, ist noch nicht bekannt und böte einen interessanten Ansatz für weitere Untersuchungen.

### **5.3.6 Verminderte Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen**

Im Sinne einer vollständigen Darstellung wird hier abschließend auch die verminderte Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen von Frauen mit Endometriose angesprochen.

Natürliche Killerzellen gehören zur Gruppe der Lymphozyten und induzieren über die Freisetzung kleiner zytoplasmatischer Protein-Granula die Apoptose von Tumor- und infizierten Zellen. Darüberhinaus produzieren sie eine große Bandbreite an Zytokinen und Chemokinen.<sup>157</sup> Im Blut befindliche Natürliche Killerzellen besitzen nachgewiesenermaßen die Fähigkeit, endometriale Zellen zu zerstören.<sup>158</sup> Diese Beobachtung macht eine Reinigungsfunktion der Natürlichen Killerzellen in Bezug auf retrograd in die Bauchhöhle gelangtes oder anderweitig dort entstandenes endometrioides Gewebe wahrscheinlich. Ein Funktionsverlust der Natürlichen Killerzellen könnte deshalb zur Entwicklung einer Endometriose beitragen. Tatsächlich wurde bereits zu Beginn der 1990er Jahre nachgewiesen, dass Natürliche Killerzellen in der Körperperipherie und in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose nur vermindert zytotoxisch wirken.<sup>158-160</sup> Diese Reduktion lässt sich bei im Blut befindlichen Killerzellen sogar mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren.<sup>161</sup>

Bei der Suche nach der Ursache dieser verminderten Zytotoxizität, ergaben sich eine Reihe von Beobachtungen in verschiedenen Körperkompartimenten: Es

konnte gezeigt werden, dass das Serum von Endometriose-Patientinnen Faktoren enthält, die NK-Zellen inhibieren.<sup>162</sup> Im Rahmen einer Untersuchung der immunsuppressiven Potenz der Peritonealflüssigkeit wurde deutlich, dass im Fall der Endometriose eine signifikant stärkere Einschränkung der zytotoxischen Kapazität Natürlicher Killerzellen durch die Peritonealflüssigkeit erfolgt als bei gesunden, fertilen Kontrollprobandinnen. Besonders deutlich zeigte sich die Abnahme der Zytotoxizität der Natural Killer Cells in der Follikelphase, also im Anschluss an die Menstruation. Einigkeit besteht in diesem Zusammenhang nur über die beschriebene verminderte zytotoxische Wirksamkeit. Über die zahlenmäßige Verteilung – ob erhöht<sup>163</sup>, vermindert<sup>164</sup> oder ähnlich der gesunder Frauen<sup>158</sup> – finden sich in der Literatur uneinheitliche Angaben.

Eine mögliche Quelle der NK-Zell-Inhibition ist das Endometriose-Gewebe selbst: Hirata et al. fanden in kultiviertem Endometriose-Gewebe immunsuppressive Faktoren, die u.a. NK-Zellen hemmten.<sup>165</sup> Außerdem hatte eutopes endometriales Stroma, das von Frauen mit Endometriose stammte und in der Zellkultur weitergezüchtet wurde, einen stärker inhibierenden Effekt auf NK-Zellen als entsprechendes Gewebe gesunder Frauen.<sup>166</sup> Ein weiterer möglicher Erklärungsmechanismus für die verminderte zytotoxische Potenz ist die vermehrte Expression sogenannter Killer Cell Inhibitory Receptors (KIRs) durch die NK-Zellen selbst. Diese Rezeptoren dienen dazu, ein Überschießen der zytotoxischen Reaktion gegenüber den zu zerstörenden Zielzellen zu verhindern. Bei fortgeschrittener Endometriose ist die Expression der KIRs KIR3DL1, KIR2DS1 und KIR2DL1 durch peritoneale Natural Killer Cells signifikant gesteigert.<sup>167</sup> Auch der Anteil der KIR2DL1-exprimierenden NK-Zellen in Peritonealflüssigkeit und peripherem Blut zeigt sich bei Endometriose signifikant erhöht.<sup>168,169</sup>

Interessanterweise steigert eine Therapie mit GnRH-Agonisten sowohl die Zellzahl<sup>164</sup> als auch die Aktivität<sup>170</sup> Natürlicher Killerzellen. Ebenso zeigten das Gestagen *Dienogest*<sup>171</sup> und das früher häufig bei Endometriose eingesetzte antigonadotrope *Danazol*<sup>172</sup> diesen Effekt in der Peritonealflüssigkeit bzw. in Peritonealflüssigkeit und Blut.

In Kapitel 5.3.4 wurde bereits der inhibierende Effekt von Galektin-1 auf alloreaktive T-Lymphozyten angesprochen, der sich durch einen Galektin-1-Knockdown in multipotenten mesenchymalen Stromazellen teilweise unterbinden

ließ.<sup>143</sup> Gieseke et al. bezogen auch Natürliche Killerzellen in diese Versuche ein und stellten fest, dass die in den Stromazellen herbeigeführte Galektin-1-Downregulation *keine* signifikanten Effekte auf die NK-Zell-Proliferation ausübte. Zwar ist die hemmende Wirkung mesenchymaler Stromazellen auf NK-Zellen erwiesen, doch scheint Galektin-1 hier keine Schlüsselrolle zu spielen. Auch für die hemmende Wirkung, die das Endometriosegewebe auf diese Zellpopulation ausübt, lässt sich kein Zusammenhang zur beobachteten Galektin-1-Downregulation ausmachen.

#### 5.4 Galektin-3 und Endometriose

Galektin-3 könnte für das Krankheitsgeschehen der Endometriose von Bedeutung sein durch seine zelladhäsiven und -invasiven, zellmigrativen sowie Angiogenese-fördernden Eigenschaften.

Die Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen scheint *vermehrt* Galektin-3 zu enthalten verglichen mit gesunden Kontrollprobandinnen.<sup>173</sup> Ebenso wiesen Noël et al. 2011 eine *vermehrte* Expression von Galektin-3 für das Endometriosegewebe selbst nach. Als Kontrollgewebe fungierten hier das eutope Endometrium gesunder Frauen sowie das Endometrium von Frauen, die an Endometriose erkrankt waren. Innerhalb dieser heterogenen Kontrollgruppe fand sich zudem eine Vermehrung von Galektin-3 im eutopen Endometrium der erkrankten Frauen verglichen mit dem Endometrium der nicht-erkrankten Frauen.<sup>174</sup> Dazu im Widerspruch steht eine Untersuchung von 2016, die dem eutopen Endometrium zumindest infertiler Endometriose-Patientinnen eine signifikant *verminderte* Galektin-3-Expression bescheinigt verglichen mit dem Endometrium nicht-erkrankter Frauen.<sup>175</sup>

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Galektin-3-Färbung von Endometriosegewebe und eutopem Endometrium nicht-erkrankter Frauen zeigte kein signifikantes Ergebnis hinsichtlich einer Verstärkung von Galektin-3 im Endometriosegewebe.

Zur Klärung der Rolle von Galektin-3 in Bezug auf die Endometriose sind weitere Untersuchungen nötig.

## 5.5 Endometriose und Stress

### 5.5.1 Die Bedeutung von Stress für die Entstehung von Krankheiten

Die große Bedeutung, die dem Faktor Stress bei der Entwicklung und Verschlimmerung vieler Erkrankungen zukommt, ist seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung und ein mittlerweile gut etabliertes Konzept. Sowohl neuerliche Schübe entzündlicher Darmerkrankungen<sup>176,177</sup> als auch die Exazerbation von Dermatosen<sup>178,179</sup> lassen sich auf den Einfluss von Stress zurückführen. Durch seinen dysregulierenden Effekt auf das Immunsystem begünstigt er die Rekrudescenz bakterieller Infektionen<sup>180</sup>, verzögert die Wundheilung<sup>181</sup> und beschleunigt die Entwicklung altersbedingter Erkrankungen<sup>92</sup>. Da Stress die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6) verstärkt und chronische Entzündungen heute für ca. 15% aller Krebserkrankungen als potentiell ursächlich gelten, wird auch ein Zusammenhang zwischen Stress und der Entstehung von Krebserkrankungen immer wahrscheinlicher.<sup>182</sup> Befinden sich Patienten präoperativ in einer großen Belastungssituation oder leiden unter ausgeprägten Angstzuständen, so führt dies nicht selten zu einem schlechteren operativen Outcome, zieht längere Krankenhausaufenthalte nach sich und steigert die postoperative Komplikations- und Rehospitalisierungsrate.<sup>183</sup>

Im gynäkologischen Bereich wird physischer und psychischer Stress als gewichtiger Trigger für Schwangerschaftskomplikationen (z.B. Spontanaborte, Präeklampsie) gesehen.<sup>184</sup> Häufig finden sich in der aktuellen Literatur Berichte über negative Effekte von Stress auf die Reproduktionsfähigkeit von Frauen.<sup>185</sup> Erhöhte CRF-Konzentrationen, wie sie beispielsweise bei der Endometriose vorherrschen, werden dabei mit Dysfunktionen des reproduktiven endokrinen Systems in Verbindung gesetzt.<sup>186</sup>

Lima et al. fanden bei Frauen mit Endometriose erhöhte Serumwerte für die in Stresssituationen vermehrt ausgeschütteten Hormone Prolaktin und Kortisol. Daraus leiteten sie die Hypothese ab, ein hohes Maß an Stress trage zur Entwicklung und zum Fortschreiten dieser Erkrankung bei.<sup>4</sup> Auch Cuevas et al. (2012) und Guo et al. (2016) schließen sich dieser Aussage an. Sie zeigten am Ratten- bzw. Mausmodell, dass Stress die Entwicklung und den Schweregrad einer Endometriose beeinflusst - etwa durch die Rekrutierung von Mastzellen, die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und das Auslösen einer

zentralnervösen Dysregulation.<sup>187,188</sup> Interessant ist in diesem Zusammenhang Interleukin-6, ein pro-inflammatorisches Zytokin, das von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert wird und das unter dem Einfluss von chronischem Stress sowie negativen Gefühlen wie Angst und Depression deutlich erhöht ist.<sup>189</sup> Für die Endometriose ist nachgewiesen, dass die vorhandenen Mastzellen vermehrt Interleukin-6 und andere Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  produzieren, welche die Adhäsion endometrialer Zellen ans Peritoneum fördern und außerdem mit Infertilität und Embryotoxizität in Verbindung gebracht werden.<sup>13,125</sup>

Stressoren verschiedener Art und Depression bewirken in Patientinnen eine erhöhte Sensitivität gegenüber negativen Reizen und steigern so wiederum die inflammatorische Reaktion auf noch kommende Stress-Ereignisse. Damit schaffen sie eine ungünstige Ausgangssituation für etwaige Herausforderungen des Immunsystems<sup>190</sup>, wie es retrograd in den Bauchraum menstruierte Zellen oder auf anderem Weg entstandene Endometriose-Inseln sein können.

### **5.5.2 Endometriose als chronischer Stressor**

Die beobachtete Erhöhung von Stressparametern bei Patientinnen lässt sich noch in weiterer Hinsicht interpretieren: Stellen doch gerade die Symptome der Krankheit selbst für betroffene Frauen einen chronischen Stressor dar. Endometriose-Patientinnen sehen sich mit ständig wiederkehrenden und im Verlauf oft zunehmenden Schmerzen konfrontiert, welche unter Umständen jahrelang als „normale Frauenbeschwerden“ still und nur unter erheblichem Schmerzmittelverbrauch ertragen werden. Es resultieren Beeinträchtigungen und Konflikte im beruflichen und familiären Umfeld. Nicht selten fehlt zunächst das nötige Verständnis auch von ärztlicher Seite. Meist spät erfolgt dann die Diagnose der im Bewusstsein der Allgemeinheit noch wenig bekannten Erkrankung. Wiederholte Operationen können nötig sein. Eine besondere psychische Belastung bedeutet auch die Aussicht auf oder das bereits offenkundige Vorliegen einer Subfertilität der betroffenen Frau. Es ergeben sich Konsequenzen für die Partnerschaft durch verspätete Diagnose, Dyspareunie und unerfüllten Kinderwunsch. Die Liste dieser „Stressoren“ ließe sich lange fortsetzen. Sie erzeugen Stress, der im Körper der Frauen über die Freisetzung endogener Substanzen den Krankheitsverlauf wiederum befördert. Krankheit und Stress bedingen und verstärken sich auf diese Weise gegenseitig, einer fatalen Spirale gleich. Das Immunsystem reagiert unter

Umständen sehr empfindlich auf diese Stress-Reize: In ihrem Artikel „Stress-induced immune-dysfunction: implications for health“<sup>92</sup> legen Glaser und Kiecolt-Glaser die Komplexität der Interaktionen zwischen zentralem Nervensystem, endokrinem System und Immunsystem dar. Von Seiten der Psychoneuroimmunologie sind hier in Zukunft spannende Ergebnisse auch in Bezug auf die Endometriose zu erwarten.

### 5.5.3 Stimulation von Modellzellen mit Corticotropin Releasing Factor (CRF)

Der Corticotropin Releasing Factor (CRF) ist ein aus 41 Aminosäuren aufgebautes Neuropeptid, das eine Schlüsselrolle innerhalb der Stressantwort von Säugetieren spielt. Er konnte 1981 zum ersten Mal aus dem Hypothalamus von Schafen isoliert werden<sup>191</sup> und entfaltet seine Wirkung durch Bindung an die G-Protein-gekoppelten CRF-Rezeptoren 1 und 2 (CRF-R1 und CRF-R2)<sup>186</sup>. CRF ist innerhalb der Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde hauptverantwortlicher Regulator der basalen wie stressinduzierten ACTH-Sekretion durch den Hypophysen-Vorderlappen. ACTH wiederum induziert die Biosynthese von Glukokortikoiden, Mineralokortikoiden und Androgenen in der Nebennierenrinde.

Doch nicht allein CRF zentralnervöser Herkunft trägt zur peripheren Stressantwort bei. Auch außerhalb des Hypothalamus werden CRF und strukturell verwandte Peptide gebildet und wirken an verschiedensten Organen und Geweben – ein Vorgang, der im Rahmen dieser Arbeit zur Endometriose anhand der Stimulation von Modellzellen nachgestellt wurde.

Innerhalb des Reproduktionstraktes wird CRF beispielsweise produziert von Endometrium<sup>192,193</sup>, Plazenta<sup>194</sup>, fetalen Membranen<sup>195</sup> und Ovarien<sup>196</sup>. Im Endometriosegewebe sind CRF und Urocortin (ein Neuropeptid mit struktureller Ähnlichkeit zum CRF und Bindung an die CRF-Rezeptoren) in hohem Maß exprimiert.<sup>197,198</sup> Zudem sind die CRF-Rezeptoren 1 und 2 innerhalb von Endometriose-Herden deutlich zahlreicher vertreten als im eutopen Endometrium erkrankter Frauen.<sup>199</sup> Dies spricht für eine erhöhte Hormonaktivität im Erkrankungsgewebe.

Kalantaridou et al. geben einen Überblick über die Funktionen des peripheren CRFs innerhalb des reproduktiven Systems<sup>200</sup>: So wirkt CRF *in vitro* inhibierend auf die

ovarielle Steroidbildung<sup>201</sup> und ist damit womöglich ursächlich für das frühere Eintreten der Menopause bei Frauen, die in erhöhtem Maß psychosozialen Stress ausgesetzt sind.<sup>202</sup> Zudem spielt der ovarielle CRF eine Rolle bei der Follikelreifung, steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Anovulation beim PCO-Syndrom (CRF-Verminderung) und scheint insgesamt für eine normale prämenopausale Ovarialfunktion unerlässlich zu sein.<sup>200</sup> Uteriner bzw. plazentarer CRF sind beteiligt an der reibungslosen Implantation des Embryos, der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft und dem Einsetzen und Zunehmen der Wehentätigkeit.<sup>200</sup> Das CRF-Plasmalevel einer Frau kann Aufschluss geben über eine möglicherweise drohende Frühgeburt, über Präeklampsie und fetale Wachstumsretardierung. Im abortiven Plazentamaterial finden sich erhöhte Konzentrationen von CRF gegenüber dem Plazentagewebe normaler Schwangerschaften.<sup>203</sup> Zusammenfassend wird deutlich, dass CRF im Sinne einer autokrinen und parakrinen Zellmodulation an zahlreichen reproduktiven Prozessen (mit teils inflammatorischer Komponente) beteiligt ist.

Saunders et al. unternahmen bezüglich CRF Versuche an Ratten mit entzündlicher Darmerkrankung, deren Prinzip sich auf die Endometriose übertragen lässt: Sie setzten ihre Versuchstiere psychischem Stress aus und stellten in der Folge veränderte Ionenströme und eine erhöhte Permeabilität der Darmmukosa fest. CRF wurde als Mediator dieser stressinduzierten Pathophysiologie des Darmepithels identifiziert. Exogen zugeführter CRF rief in der Darmmukosa die genannten funktionellen Veränderungen hervor, während eine intraperitoneale Vorbehandlung mit CRF-Antagonisten eine Hemmung der stressbedingten Erscheinungen zur Folge hatte. Damit lässt sich festhalten, dass peripherer Corticotropin Releasing Factor als entscheidendes Bindeglied fungiert zwischen der Erfahrung von psychischem Stress und dem Auftreten pathophysiologischer Korrelate im Gewebe.

Es liegt nahe, diese generelle Erkenntnis zur CRF-Wirkung auf die Endometriose zu übertragen. CRF ist innerhalb der Endometrioseläsionen verstärkt nachweisbar. Die Rolle des Hormons im Rahmen des peritonealen Entzündungsprozesses und seine vielfältigen Effekte auf molekularer Ebene könnten für die Entwicklung neuer Therapiestrategien von großer Bedeutung sein. Da CRF beispielsweise Mastzellen zur Sekretion von VEGF anregt<sup>204</sup> und diese Zellen in Endometrioseläsionen in erhöhter Zahl vorkommen, fördert CRF die Angiogenese innerhalb von

Endometrioseherden und unterstützt auf diesem Weg die Ausbreitung der Endometriose. In dieser Arbeit nun wurde der CRF-Effekt auf den immunologischen Schlüsselregulator Galektin-1 in den Blick genommen. So konnte zum ersten Mal an Modellzellen für die Endometriose gezeigt werden, dass die Erhöhung der lokalen CRF-Konzentration den Rückgang der Galektin-1-Expression zur Folge hat. Ein verbessertes Stressmanagement und CRF-antagonisierende Substanzen könnten dazu beitragen, den Circulus vitiosus aus erlebtem Stress, Galektin-1-vermittelten Immundysregulationen und der lokalen Inflammation bei der Endometriose zu durchbrechen. Weitere Untersuchungen sind hierzu erforderlich. Welche sonstigen Stimuli eine Downregulation von Galektin-1 bewirken und welche Effekte CRF erzielt über die nachgewiesene Galektin-1-Downregulation hinaus, sollte ebenfalls Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

## 6 Zusammenfassung

Die Galektine 1 und 3 regulieren eine Vielzahl von Immunprozessen. In Bezug auf die beobachteten Alterationen des Immunsystems von Endometriose-Patientinnen stellt sich die Frage, ob die Galektine 1 und 3 auch bei der Endometriose als Immunregulatoren fungieren und somit der Schlüssel zur Entwicklung neuer Therapieoptionen sein könnten.

In dieser Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Färbung von Gewebepreparaten gezeigt, dass die Expression von Galektin-1 innerhalb von Endometrioseläsionen signifikant vermindert ist im Vergleich zum Ovarstroma und eutopen Endometrium nicht an Endometriose erkrankter Frauen. Die Galektin-3-Expression im Endometriosegewebe war *nicht* signifikant verändert im Vergleich zu den genannten Kontrollgeweben.

Mehrere der bei Endometriose beobachteten Immunphänomene wurden in früheren Untersuchungen bereits durch einen Galektin-1-Knockdown ausgelöst, so beispielsweise die Reifestörung dendritischer Zellen und die Vermehrung von Makrophagen und Lymphozyten. Dies macht einen Zusammenhang zwischen dem hier nachgewiesenen relativen Galektin-1-Defizit und den Immunalterationen bei der Endometriose sehr wahrscheinlich.

Als möglicher Auslöser der niedrigeren Galektin-1-Dichte im Endometriosegewebe konnte in dieser Arbeit das Stresshormon CRF identifiziert werden. Kultivierte Modellzellen (Ishikawa und HEC-1B) wiesen nach Stimulation mit zunehmend konzentriertem CRF eine signifikant geringere Galektin-1-Expression in der immunzytochemischen Färbung auf. Die Vermutung, dass physischer und psychischer Stress (und sein hormonelles Korrelat CRF) neben ungünstigen Effekten auf vielerlei physiologische Prozesse auch bei der Endometriose krankheitsfördernd wirkt, ergibt sich aus dem erhöhten Nachweis des Stresshormons CRF und seiner Rezeptoren im Endometriosegewebe.<sup>197,199</sup> Um z.B. durch retrograde Menstruation in die Bauchhöhle eingewanderte Zellen effektiv beseitigen zu können, ist der weibliche Körper auf eine funktionsfähige Immunabwehr angewiesen. Wird deren Gleichgewicht durch eine stressbedingte Galektin-1-Verminderung gestört, ist in Zusammenschau der hier vorliegenden sowie vergangener Untersuchungsergebnisse davon auszugehen, dass eine

Endometriose entstehen und voranschreiten kann. Daher sollte die Stressreduktion als unverzichtbares Element in eine ganzheitliche Endometriose-Therapie integriert werden. Die mögliche Behandlung mit CRF-Antagonisten ist darüber hinaus eine denkbare Therapiestrategie, deren weitere Untersuchung lohnenswert erscheint.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisation abdomineller Endometrioseherde .....	3
Abbildung 2: Aufteilung der Uteruswand in Archimetra und Neometra .....	8
Abbildung 3: Von der P450-Aromatase katalysierte Reaktionen.....	10
Abbildung 4: Entnahmestellen der Endometriose-Proben .....	19
Abbildung 5: Grundprinzip der Anfertigung eines Gewebeschnittes .....	22
Abbildung 6: Grundprinzip der Präparatfärbung.....	23
Abbildung 7: Färbeprotokoll zum Nachweis von Galektin-1.....	25
Abbildung 8: Färbeprotokoll zum Nachweis von Galektin-3.....	25
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode .....	27
Abbildung 10: Aussäen der Zellen .....	33
Abbildung 11: Austausch des Nährmediums .....	34
Abbildung 12: Zell-Splitting.....	34
Abbildung 13: Färbeprotokoll zum Nachweis von Galektin-1 .....	36
Abbildung 14: Endometriosegewebe, Galektin-1-Färbung.....	40
Abbildung 15: Normales Ovarstroma, Galektin-1-Färbung .....	40
Abbildung 16: Endometrium, Galektin-1-Färbung.....	41
Abbildung 17: Expression von Galektin-1 im unauffälligen Endometrium bzw. Ovarstroma nicht an Endometriose erkrankter Frauen und im Endometriosegewebe.....	42
Abbildung 18: Endometriosegewebe, Galektin-3-Färbung.....	43
Abbildung 19: Normales Ovarstroma, Galektin-3-Färbung .....	44
Abbildung 20: Endometrium, Galektin-3-Färbung.....	45
Abbildung 21: Expression von Galektin-3 im unauffälligen Endometrium bzw. Ovarstroma nicht an Endometriose erkrankter Frauen und im Endometriosegewebe.....	46
Abbildung 22: Galektin-1-Expression von Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen CRF-Konzentrationen .....	48
Abbildung 23: Galektin-1-Expression der Ishikawa-Zellen in Abhängigkeit von der CRF-Konzentration im Nährmedium .....	49
Abbildung 24: Galektin-1-Expression von HEC-1B-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen CRF-Konzentrationen .....	50
Abbildung 25: Galektin-1-Expression der HEC-1B-Zellen in Abhängigkeit von der CRF-Konzentration im Nährmedium .....	51
Abbildung 26: Dreidimensionale Darstellung des homodimeren Galektin-1.....	55
Abbildung 27: Untergruppen der T-Lymphozyten.....	61

## 8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Differentialdiagnosen zu Endometriose-typischen Beschwerden</i> .....	13
<i>Tabelle 2: Makroskopische Aktivitätskriterien der Endometriose</i> .....	13
<i>Tabelle 3: Anzahl der gefärbten Präparate pro Gewebe- und Färbegruppe</i> .....	18
<i>Tabelle 4: Geräte und Hilfsmittel</i> .....	20
<i>Tabelle 5: Plastik- und Glaswaren</i> .....	20
<i>Tabelle 6: Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterial</i> .....	21
<i>Tabelle 7: Antikörper, Detektionssysteme, Färbesubstrat</i> .....	22
<i>Tabelle 8: Primärantikörper, Detektionssystem und Färbesubstrat im immunhistochemischen Galektin-1- und Galektin-3-Färbeprozess</i> .....	24
<i>Tabelle 9: Geräte und Hilfsmittel</i> .....	29
<i>Tabelle 10: Plastik- und Glaswaren</i> .....	30
<i>Tabelle 11: Zellen</i> .....	30
<i>Tabelle 12: Chemikalien, Lösungen, Stimulanz, Verbrauchsmaterial</i> .....	31
<i>Tabelle 13: Antikörper, Detektionssysteme, Färbesubstrat</i> .....	32
<i>Tabelle 14: Primärantikörper, Detektionssystem und Färbesubstrat im Galektin-1-Färbeprozess der Ishikawa- und HEC-1B-Zellen</i> .....	35
<i>Tabelle 15: Immunreaktiver Score (IRS)</i> .....	36
<i>Tabelle 16: IRS (Median) für die Färbung von Galektin-1 und Galektin-3 im unauffälligen Endometrium bzw. Ovarstroma nicht an Endometriose erkrankter Frauen und im Endometriosegewebe</i> .....	38
<i>Tabelle 17: IRS und p-Wert für die Galektin-1-Färbung der Ishikawa-Zellen nach Stimulation mit CRF</i> .....	47
<i>Tabelle 18: IRS und p-Wert für die Galektin-1-Färbung der HEC-1B-Zellen nach Stimulation mit CRF</i> .....	49
<i>Tabelle 19: Hauptfamilien tierischer Lektine</i> .....	53
<i>Tabelle 20: Wesentliche Eigenschaften der Galektine 1 und 3</i> .....	54

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ATCC	American Type Culture Collection
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CRD	Kohlenhydraterkennende Domäne (carbohydrate recognition domain)
CRF/CRH	Corticotropin Releasing Factor/Hormon
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DC	Dendritic Cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Cell Culture
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazelluläre signal-regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
Gal-1	Galektin-1
Gal-3	Galektin-3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IRS	Immunreaktiver Score
KIR	Killer Cell Inhibitory Receptor
LPS	Lipopolysaccharid
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
Treg-Zellen	Regulatorische T-Zellen
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w/o	without

## 10 Literaturverzeichnis

1. Garcia-Velasco, J.A.a.R., B. R. M. B. *Endometriosis - Current Management and Future Trends*, (Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 2009).
2. Knapp, V.J. How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertility and sterility* **72**, 10-14 (1999).
3. Ebert, A.D. *Endometriose - Ein Wegweiser für die Praxis*, (Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/New York, 2014).
4. Lima, A.P., Moura, M.D. & Rosa e Silva, A.A. Prolactin and cortisol levels in women with endometriosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* **39**, 1121-1127 (2006).
5. Ulrich, U. Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose. (AWMF online, 2013).
6. Giudice, L.C. & Kao, L.C. Endometriosis. *Lancet* **364**, 1789-1799 (2004).
7. Bulun, S.E. Endometriosis. *The New England journal of medicine* **360**, 268-279 (2009).
8. Jubanyik, K.J. & Comite, F. Extrapelvic endometriosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* **24**, 411-440 (1997).
9. Stanley J. Robboy, M.C.A., Peter Russell. *Endometriosis. In: Pathology of the female reproductive tract.*, (Churchill Livingstone, London, 2002).
10. Anaf, V., Simon, P., Fayt, I. & Noel, J. Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions. *Hum Reprod* **15**, 767-771 (2000).
11. Taylor, R.N., et al. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci* **16**, 140-146 (2009).
12. Medina, M.G. & Lebovic, D.I. Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* **88**, 968-975 (2009).
13. Tariverdian, N., et al. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Seminars in immunopathology* **29**, 193-210 (2007).
14. Stauber Manfred, W.T. *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*, (Georg Thieme Verlag KG, 2007).
15. Goerke K., S.J., Valet A. *Klinikleitfaden Gynäkologie, Geburtshilfe*, (Elsevier, München, 2015).
16. Olive, D.L. & Pritts, E.A. Treatment of endometriosis. *The New England journal of medicine* **345**, 266-275 (2001).
17. Cramer, D.W. & Missmer, S.A. The epidemiology of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **955**, 11-22; discussion 34-16, 396-406 (2002).
18. Eskenazi, B. & Warner, M.L. Epidemiology of endometriosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* **24**, 235-258 (1997).
19. Vigano, P., Parazzini, F., Somigliana, E. & Vercellini, P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **18**, 177-200 (2004).
20. Ballard, K.D., Seaman, H.E., de Vries, C.S. & Wright, J.T. Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study--Part 1. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* **115**, 1382-1391 (2008).
21. Pugsley, Z. & Ballard, K. Management of endometriosis in general practice: the pathway to diagnosis. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* **57**, 470-476 (2007)
22. Abbas, S., Ihle, P., Koster, I. & Schubert, I. Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **160**, 79-83 (2012).

23. Benagiano, G. & Brosens, I. History of adenomyosis. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **20**, 449-463 (2006).
24. Benagiano, G. & Brosens, I. The history of endometriosis: identifying the disease. *Hum Reprod* **6**, 963-968 (1991).
25. Vinatier, D., Orazi, G., Cosson, M. & Dufour, P. Theories of endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **96**, 21-34 (2001).
26. Sampson, J.A. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Gynecology* (1927).
27. Kruitwagen, R.F., et al. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertility and sterility* **55**, 297-303 (1991).
28. Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F., Raj, S.G. & Talbert, L.M. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics and gynecology* **64**, 151-154 (1984).
29. Sanfilippo, J.S., Wakim, N.G., Schikler, K.N. & Yussman, M.A. Endometriosis in association with uterine anomaly. *American journal of obstetrics and gynecology* **154**, 39-43 (1986).
30. D'Hooghe, T.M., et al. Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertility and sterility* **62**, 635-638 (1994).
31. Koninckx, P.R., De Moor, P. & Brosens, I.A. Diagnosis of the luteinized unruptured follicle syndrome by steroid hormone assays on peritoneal fluid. *British journal of obstetrics and gynaecology* **87**, 929-934 (1980).
32. Hoshiai, H., Ishikawa, M., Sawatari, Y., Noda, K. & Fukaya, T. Laparoscopic evaluation of the onset and progression of endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* **169**, 714-719 (1993).
33. Vercellini, P., et al. Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? *British journal of obstetrics and gynaecology* **105**, 1018-1021 (1998).
34. Jenkins, S., Olive, D.L. & Haney, A.F. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstetrics and gynecology* **67**, 335-338 (1986).
35. Tabibzadeh, S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* **7**, 876-882 (1992).
36. Maruyama, T. & Yoshimura, Y. Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**, 2854-2863 (2012).
37. Sampson, J.A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American journal of pathology* **3**, 93-110 143 (1927).
38. Hobbs, J.E. Endometriosis of the lungs: experimental and clinical study. *American journal of obstetrics and gynecology* **40**, 832-833 (1940).
39. Javert, C.T. The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note of coexisting vascular involvement. *American journal of obstetrics and gynecology* **64**, 780-806 (1952).
40. Witz, C.A. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clinical obstetrics and gynecology* **42**, 566-585 (1999).
41. Morales Martinez, C. & Tejuca Somoano, S. Abdominal wall endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* (2017).
42. Landeen, K., Wempe, K. & Miller, R. A Case of Incisional Endometrioma that Presented as an Abdominal Mass. *S D Med* **70**, 359-361 (2017).
43. Redwine, D.B. Was Sampson wrong? *Fertility and sterility* **78**, 686-693 (2002).
44. Redwine, D.B. *Sampson revisited: a critical review of the development of Sampson's theory of origin of endometriosis*. In: *Endometriosis: Current Management and Future Trends*, (Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 2010).
45. Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*, (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009).

46. Meyer, R. Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im Allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa *Zentralblatt für Gynäkologie* **43**, 745-750 (1919).
47. Seli, E., Berkkanoglu, M. & Arici, A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* **30**, 41-61 (2003).
48. Clark, A.H. Endometriosis in a young girl. *Journal of the American Medical Association* **136**, 690 (1948).
49. Schifrin, B.S., Erez, S. & Moore, J.G. Teen-age endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* **116**, 973-980 (1973).
50. El-Mahgoub, S. & Yaseen, S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *American journal of obstetrics and gynecology* **137**, 137-140 (1980).
51. Doty, D.W., Gruber, J.S., Wolf, G.C. & Winslow, R.C. 46,XY pure gonadal dysgenesis: report of 2 unusual cases. *Obstetrics and gynecology* **55**, 61S-65S (1980).
52. Simsek, G., et al. An unusual cause of inguinal hernia in a male patient: endometriosis. *Gut and liver* **6**, 284-285 (2012).
53. Pinkert, T.C., Catlow, C.E. & Straus, R. Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer* **43**, 1562-1567 (1979).
54. Merrill, J.A. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *American journal of obstetrics and gynecology* **94**, 780-790 (1966).
55. Matsuura, K., Ohtake, H., Katabuchi, H. & Okamura, H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecologic and obstetric investigation* **47 Suppl 1**, 18-20; discussion 20-12 (1999).
56. Leyendecker, G., Kunz, G., Noe, M., Herbertz, M. & Mall, G. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Human reproduction update* **4**, 752-762 (1998).
57. Noe, M., Kunz, G., Herbertz, M., Mall, G. & Leyendecker, G. The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit. *Hum Reprod* **14**, 190-197 (1999).
58. Roberts, D.K., Walker, N.J. & Lavia, L.A. Ultrastructural evidence of stromal/epithelial interactions in the human endometrial cycle. *American journal of obstetrics and gynecology* **158**, 854-861 (1988).
59. Parente Barbosa, C., Bentes De Souza, A.M., Bianco, B. & Christofolini, D.M. The effect of hormones on endometriosis development. *Minerva ginecologica* **63**, 375-386 (2011).
60. Noble, L.S., Simpson, E.R., Johns, A. & Bulun, S.E. Aromatase expression in endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**, 174-179 (1996).
61. Kitawaki, J., et al. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biology of reproduction* **57**, 514-519 (1997).
62. Takahashi, K., Nagata, H. & Kitao, M. Clinical usefulness of determination of estradiol level in the menstrual blood for patients with endometriosis. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi* **41**, 1849-1850 (1989).
63. Zingg, H.H., et al. Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the uterus. *Recent progress in hormone research* **50**, 255-273 (1995).
64. Lyons, E.A., et al. Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women. *Fertility and sterility* **55**, 771-774 (1991).
65. de Vries, K., Lyons, E.A., Ballard, G., Levi, C.S. & Lindsay, D.J. Contractions of the inner third of the myometrium. *American journal of obstetrics and gynecology* **162**, 679-682 (1990).
66. Bulletti, C., et al. Uterine Contractility in Patients with Endometriosis. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* **3**, S5 (1996).

67. 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. *Hum Reprod* **11**, 1542-1551 (1996).
68. Quinn, M. Endometriosis: the consequence of neurological dysfunction? *Medical hypotheses* **63**, 602-608 (2004).
69. Chatman, D.L. Pelvic peritoneal defects and endometriosis: Allen-Masters syndrome revisited. *Fertility and sterility* **36**, 751-756 (1981).
70. Roman, H., et al. Are digestive symptoms in women presenting with pelvic endometriosis specific to lesion localizations? A preliminary prospective study. *Hum Reprod* **27**, 3440-3449 (2012).
71. Zhang, Q., Duan, J., Liu, X. & Guo, S.W. Platelets drive smooth muscle metaplasia and fibrogenesis in endometriosis through epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Mol Cell Endocrinol* **428**, 1-16 (2016).
72. Ballester, M., Dehan, P., Beliard, A., Brichant, G. & Nisolle, M. [Role of genetic and environmental factors in the development of endometriosis]. *Revue medicale de Liege* **67**, 374-380 (2012).
73. Yao, M., et al. Polychlorinated biphenyls and its potential role in endometriosis. *Environ Pollut* **229**, 837-845 (2017).
74. Kobayashi, H., Imanaka, S., Nakamura, H. & Tsuji, A. Understanding the role of epigenomic, genomic and genetic alterations in the development of endometriosis (Review). *Molecular medicine reports* **9**, 1483-1505 (2014).
75. Grimstad, F.W. & Decherney, A. A Review of the Epigenetic Contributions to Endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* **60**, 467-476 (2017).
76. dell'Endometriosi, G.I.p.I.S. Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Hum Reprod* **16**, 2668-2671 (2001).
77. B. Hinney, G.E. *Endometriose (Gynäkologie und Geburtshilfe)*, (Elsevier GmbH, München, 2007).
78. Timor-Tritsch, I.E. Erkrankungen der Adnexe. in *Ultraschalldiagnostik in der Gynäkologie* 121-139 (Elsevier, München, 2008).
79. Fratelli, N., et al. Transvaginal sonography for preoperative assessment of deep endometriosis. *Journal of clinical ultrasound : JCU* **41**, 69-75 (2013).
80. Kim, A., et al. Magnetic Resonance Imaging Compared with Rectal Endoscopic Sonography for the Prediction of Infiltration Depth in Colorectal Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* (2017).
81. Kruse, C., Seyer-Hansen, M. & Forman, A. Diagnosis and treatment of rectovaginal endometriosis: an overview. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* **91**, 648-657 (2012).
82. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and sterility* **67**, 817-821 (1997).
83. Osuga, Y., et al. Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **65**, 1-10 (2011).
84. Olive, D.L. & Pritts, E.A. The treatment of endometriosis: a review of the evidence. *Annals of the New York Academy of Sciences* **955**, 360-372; discussion 389-393, 396-406 (2002).
85. Romer, T. [Treatment of endometriosis]. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* **35**, 44-51; quiz 53-44 (2012).
86. Hudelist, G., et al. Combination of transvaginal sonography and clinical examination for preoperative diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* **24**, 1018-1024 (2009).
87. Alborzi, S., Hosseini-Nohadani, A., Poordast, T. & Shomali, Z. Surgical outcomes of laparoscopic endometriosis surgery: a 6 year experience. *Curr Med Res Opin*, 1-6 (2017).
88. Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F. & Kiss, R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* **16**, 137R-157R (2006).

89. Tribulatti, M.V., Figini, M.G., Carabelli, J., Cattaneo, V. & Campetella, O. Redundant and antagonistic functions of galectin-1, -3, and -8 in the elicitation of T cell responses. *J Immunol* **188**, 2991-2999 (2012).
90. Barondes, S.H., et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597-598 (1994).
91. von Wolff, M., Wang, X., Gabius, H.J. & Strowitzki, T. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Molecular human reproduction* **11**, 189-194 (2005).
92. Glaser, R. & Kiecolt-Glaser, J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature reviews. Immunology* **5**, 243-251 (2005).
93. Dallenbach-Hellweg, G.a.P., H. *Atlas der Histopathologie des Endometriums*, (Springer Berlin, 1985).
94. Noll, S., Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*, (Urban & Fischer Verlag München, Jena, 2000).
95. Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H. & Hayashi, K. [Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi* **37**, 1103-1111 (1985).
96. Castelbaum, A.J., et al. Characterization of integrin expression in a well differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**, 136-142 (1997).
97. Hannan, N.J., Paiva, P., Dimitriadis, E. & Salamonsen, L.A. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biology of reproduction* **82**, 235-245 (2010).
98. Mo, B., et al. ECC-1 cells: a well-differentiated steroid-responsive endometrial cell line with characteristics of luminal epithelium. *Biology of reproduction* **75**, 387-394 (2006).
99. Albert, J.L., Sundstrom, S.A. & Lyttle, C.R. Estrogen regulation of placental alkaline phosphatase gene expression in a human endometrial adenocarcinoma cell line. *Cancer research* **50**, 3306-3310 (1990).
100. Littlefield, B.A., Gurpide, E., Markiewicz, L., McKinley, B. & Hochberg, R.B. A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: estrogenic action of delta 5 adrenal steroids. *Endocrinology* **127**, 2757-2762 (1990).
101. Suzuki, N., et al. Dipyridamole enhances an anti-proliferative effect of interferon in various types of human tumor cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **51**, 627-633 (1992).
102. Emons, G., et al. High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **77**, 1458-1464 (1993).
103. Gong, Y., et al. Phorbol esters differentially regulate the expression of insulin-like growth factor-binding proteins in endometrial carcinoma cells. *Endocrinology* **131**, 2747-2754 (1992).
104. Kuramoto, H. Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. *Acta obstetrica et gynaecologica Japonica* **19**, 47-58 (1972).
105. Remmele, W. & Stegner, H.E. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe* **8**, 138-140 (1987).
106. Liu, F.T. & Rabinovich, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer* **5**, 29-41 (2005).
107. Drickamer, K. & Taylor, M.E. Biology of animal lectins. *Annual review of cell biology* **9**, 237-264 (1993).
108. Gabius, H.J. Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. *Anatomia, histologia, embryologia* **30**, 3-31 (2001).

109. Oda, Y. & Tatsumi, Y. New lectins from bulbs of *Crocus sativum*. *Biological & pharmaceutical bulletin* **16**, 978-981 (1993).
110. Pfeifer, K., et al. S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiology* **3**, 179-184 (1993).
111. Hirabayashi, J. & Kasai, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* **3**, 297-304 (1993).
112. Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A. & Leffler, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of biological chemistry* **269**, 20807-20810 (1994).
113. Miller, J.E., et al. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget* **8**, 7138-7147 (2017).
114. Osuga, Y. Novel therapeutic strategies for endometriosis: a pathophysiological perspective. *Gynecologic and obstetric investigation* **66 Suppl 1**, 3-9 (2008).
115. Berbic, M. & Fraser, I.S. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of reproductive immunology* **88**, 149-155 (2011).
116. Salamonsen, L.A. & Lathbury, L.J. Endometrial leukocytes and menstruation. *Human reproduction update* **6**, 16-27 (2000).
117. Schulke, L., et al. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* **24**, 1695-1703 (2009).
118. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
119. Kennedy, S.H., Sargent, I.L., Starkey, P.M., Hicks, B.R. & Barlow, D.H. Localization of anti-endometrial antibody binding in women with endometriosis using a double-labelling immunohistochemical method. *British journal of obstetrics and gynaecology* **97**, 671-674 (1990).
120. Fulcher, J.A., et al. Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. *J Immunol* **177**, 216-226 (2006).
121. Berkkanoglu, M. & Arici, A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **50**, 48-59 (2003).
122. Berbic, M., et al. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* **24**, 325-332 (2009).
123. Haney, A.F., Muscato, J.J. & Weinberg, J.B. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertility and sterility* **35**, 696-698 (1981).
124. Halme, J., Becker, S., Hammond, M.G. & Raj, S. Pelvic macrophages in normal and infertile women: the role of patent tubes. *American journal of obstetrics and gynecology* **142**, 890-895 (1982).
125. Li, S., et al. Role of Interleukin-6 and Its Receptor in Endometriosis. *Med Sci Monit* **23**, 3801-3807 (2017).
126. Lebovic, D.I., Mueller, M.D. & Taylor, R.N. Immunobiology of endometriosis. *Fertility and sterility* **75**, 1-10 (2001).
127. Keenan, J.A., Chen, T.T., Chadwell, N.L., Torry, D.S. & Caudle, M.R. Interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **32**, 180-183 (1994).
128. Keenan, J.A., Chen, T.T., Chadwell, N.L., Torry, D.S. & Caudle, M.R. IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **34**, 381-385 (1995).
129. Beliard, A., Noel, A., Goffin, F., Frankenne, F. & Foidart, J.M. Adhesion of endometrial cells labeled with <sup>111</sup>Indium-tropolonate to peritoneum: a novel in vitro model to study endometriosis. *Fertility and sterility* **79 Suppl 1**, 724-729 (2003).

130. Taketani, Y., Kuo, T.M. & Mizuno, M. Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* **167**, 265-270 (1992).
131. Gomez-Torres, M.J., Acien, P., Campos, A. & Velasco, I. Embryotoxicity of peritoneal fluid in women with endometriosis. Its relation with cytokines and lymphocyte populations. *Hum Reprod* **17**, 777-781 (2002).
132. Ramprasad, M.P., et al. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9580-9584 (1995).
133. Stanton, L.W., White, R.T., Bryant, C.M., Protter, A.A. & Endemann, G. A macrophage Fc receptor for IgG is also a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* **267**, 22446-22451 (1992).
134. Endemann, G., et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* **268**, 11811-11816 (1993).
135. Sidell, N., Han, S.W. & Parthasarathy, S. Regulation and modulation of abnormal immune responses in endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **955**, 159-173; discussion 199-200, 396-406 (2002).
136. Tran, L.V., Tokushige, N., Berbic, M., Markham, R. & Fraser, I.S. Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* **24**, 835-841 (2009).
137. Wu, J., Xie, H., Yao, S. & Liang, Y. Macrophage and nerve interaction in endometriosis. *J Neuroinflammation* **14**, 53 (2017).
138. Correa, S.G., Sotomayor, C.E., Aoki, M.P., Maldonado, C.A. & Rabinovich, G.A. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* **13**, 119-128 (2003).
139. Barrionuevo, P., et al. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol* **178**, 436-445 (2007).
140. Rabinovich, G.A., Liu, F.T., Hirashima, M. & Anderson, A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian journal of immunology* **66**, 143-158 (2007).
141. Oosterlynck, D.J., Cornillie, F.J., Waer, M. & Koninckx, P.R. Immunohistochemical characterization of leucocyte subpopulations in endometriotic lesions. *Archives of gynecology and obstetrics* **253**, 197-206 (1993).
142. Witz, C.A., Montoya, I.A., Dey, T.D. & Schenken, R.S. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **32**, 173-179 (1994).
143. Gieseke, F., et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* **116**, 3770-3779 (2010).
144. Dmowski, W.P., Steele, R.W. & Baker, G.F. Deficient cellular immunity in endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* **141**, 377-383 (1981).
145. Helvacioğlu, A., Aksel, S. & Peterson, R.D. Endometriosis and autologous lymphocyte activation by endometrial cells. Are lymphocytes or endometrial cell defects responsible? *The Journal of reproductive medicine* **42**, 71-75 (1997).
146. Gilmore, S.M., Aksel, S., Hoff, C. & Peterson, R.D. In vitro lymphocyte activity in women with endometriosis—an altered immune response? *Fertility and sterility* **58**, 1148-1152 (1992).
147. Steele, R.W., Dmowski, W.P. & Marmer, D.J. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **6**, 33-36 (1984).

148. Melioli, G., Semino, C., Semino, A., Venturini, P.L. & Ragni, N. Recombinant interleukin-2 corrects in vitro the immunological defect of endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **30**, 218-227 (1993).
149. Giatromanolaki, A., et al. The presence of tumor-infiltrating FOXP3+ lymphocytes correlates with intratumoral angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecologic oncology* **110**, 216-221 (2008).
150. Nandakumar, S., Miller, C.W. & Kumaraguru, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clinical and molecular allergy : CMA* **7**, 5 (2009).
151. Thornton, A.M. T regulatory cells. *Current biology : CB* **15**, R582 (2005).
152. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787 (2008).
153. Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A.H. & Fainboim, L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* **178**, 2572-2578 (2007).
154. Olkowska-Truchanowicz, J., et al. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* (2012).
155. Berbic, M., et al. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod* **25**, 900-907 (2010).
156. Toscano, M.A., et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* **176**, 6323-6332 (2006).
157. Bernardini, G., Gismondi, A. & Santoni, A. Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions. *Immunology letters* **145**, 39-46 (2012).
158. Oosterlynck, D.J., Cornillie, F.J., Waer, M., Vandeputte, M. & Koninckx, P.R. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertility and sterility* **56**, 45-51 (1991).
159. Wilson, T.J., et al. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertility and sterility* **62**, 1086-1088 (1994).
160. Vignano, P., et al. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertility and sterility* **56**, 894-899 (1991).
161. Oosterlynck, D.J., Meuleman, C., Waer, M., Vandeputte, M. & Koninckx, P.R. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertility and sterility* **58**, 290-295 (1992).
162. Kanzaki, H., Wang, H.S., Kariya, M. & Mori, T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* **167**, 257-261 (1992).
163. Hill, J.A., Faris, H.M., Schiff, I. & Anderson, D.J. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and sterility* **50**, 216-222 (1988).
164. Hsu, C.C., Lin, Y.S., Wang, S.T. & Huang, K.E. Immunomodulation in women with endometriosis receiving GnRH agonist. *Obstetrics and gynecology* **89**, 993-998 (1997).
165. Hirata, J., Kikuchi, Y., Imaizumi, E., Tode, T. & Nagata, I. Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors. *Gynecologic and obstetric investigation* **37**, 43-47 (1994).
166. Somigliana, E., et al. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **36**, 295-300 (1996).
167. Wu, M.Y., et al. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertility and sterility* **74**, 1187-1191 (2000).
168. Maeda, N., et al. Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis. *Fertility and sterility* **77**, 679-683 (2002).

169. Maeda, N., *et al.* Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertility and sterility* **77**, 297-302 (2002).
170. Garzetti, G.G., *et al.* Natural cytotoxicity and GnRH agonist administration in advanced endometriosis: positive modulation on natural killer activity. *Obstetrics and gynecology* **88**, 234-240 (1996).
171. Katsuki, Y., *et al.* Effects of dienogest, a synthetic steroid, on experimental endometriosis in rats. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **138**, 216-226 (1998).
172. Matsubayashi, H., *et al.* Leukocyte subpopulation changes in rats with autotransplanted endometrium and the effect of danazol. *Am J Reprod Immunol* **33**, 301-314 (1995).
173. Caserta, D., Di Benedetto, L., Bordi, G., D'Ambrosio, A. & Moscarini, M. Levels of Galectin-3 and Stimulation Expressed Gene 2 in the peritoneal fluid of women with endometriosis: a pilot study. *Gynecol Endocrinol* **30**, 877-880 (2014).
174. Noel, J.C., Chapron, C., Borghese, B., Fayt, I. & Anaf, V. Galectin-3 is overexpressed in various forms of endometriosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **19**, 253-257 (2011).
175. Yang, H., *et al.* Aberrant expression and hormonal regulation of Galectin-3 in endometriosis women with infertility. *J Endocrinol Invest* **39**, 785-791 (2016).
176. Levenstein, S. Stress and ulcerative colitis: convincing the doubting Thomases. *The American journal of gastroenterology* **98**, 2112-2115 (2003).
177. Qiu, B.S., Vallance, B.A., Blennerhassett, P.A. & Collins, S.M. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nature medicine* **5**, 1178-1182 (1999).
178. Gil, K.M., *et al.* The relation of stress and family environment to atopic dermatitis symptoms in children. *Journal of psychosomatic research* **31**, 673-684 (1987).
179. Paus, R., Theoharides, T.C. & Arck, P.C. Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. *Trends in immunology* **27**, 32-39 (2006).
180. Cao, L., Hudson, C.A. & Lawrence, D.A. Acute cold/restraint stress inhibits host resistance to *Listeria monocytogenes* via beta1-adrenergic receptors. *Brain, behavior, and immunity* **17**, 121-133 (2003).
181. Hubner, G., *et al.* Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* **8**, 548-556 (1996).
182. Marx, J. Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* **306**, 966-968 (2004).
183. Kiecolt-Glaser, J.K., Page, G.G., Marucha, P.T., MacCallum, R.C. & Glaser, R. Psychological influences on surgical recovery. Perspectives from psychoneuroimmunology. *The American psychologist* **53**, 1209-1218 (1998).
184. Arck P.C., K.M.K., Blois S.M. Current Insights and Future Perspectives on Neuro-Endocrine-Immune Circuitry Challenging Pregnancy Maintenance and Fetal Health. *Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology* **3**, 98-102 (2006).
185. Arck, P.C., *et al.* Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant women. *Reproductive biomedicine online* **17**, 101-113 (2008).
186. Wypior, G., Jeschke, U., Kurpysz, M. & Szekeres-Bartho, J. Expression of CRH, CRH-related peptide and CRH receptor in the ovary and potential CRH signalling pathways. *Journal of reproductive immunology* **90**, 67-73 (2011).
187. Cuevas, M., *et al.* Stress exacerbates endometriosis manifestations and inflammatory parameters in an animal model. *Reprod Sci* **19**, 851-862 (2012).
188. Guo, S.W., Zhang, Q. & Liu, X. Social psychogenic stress promotes the development of endometriosis in mouse. *Reprod Biomed Online* **34**, 225-239 (2017).
189. Zhou, D., Kusnecov, A.W., Shurin, M.R., DePaoli, M. & Rabin, B.S. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **133**, 2523-2530 (1993).

190. Glaser, R., Robles, T.F., Sheridan, J., Malarkey, W.B. & Kiecolt-Glaser, J.K. Mild depressive symptoms are associated with amplified and prolonged inflammatory responses after influenza virus vaccination in older adults. *Archives of general psychiatry* **60**, 1009-1014 (2003).
191. Spiess, J., Rivier, J., Rivier, C. & Vale, W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 6517-6521 (1981).
192. Makrigiannakis, A., et al. The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **80**, 185-189 (1995).
193. Mastorakos, G., et al. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**, 1046-1050 (1996).
194. Hatzoglou, A., Margioris, A.N., Bakogeorgou, E., Gravanis, A. & Castanas, E. Identification, characterization and localization of corticotropin-releasing hormone receptors in human placenta. *Life sciences* **59**, 1871-1879 (1996).
195. Karteris, E., et al. The human placenta and fetal membranes express the corticotropin-releasing hormone receptor 1alpha (CRH-1alpha) and the CRH-C variant receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **83**, 1376-1379 (1998).
196. Asakura, H., Zwain, I.H. & Yen, S.S. Expression of genes encoding corticotropin-releasing factor (CRF), type 1 CRF receptor, and CRF-binding protein and localization of the gene products in the human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**, 2720-2725 (1997).
197. Kempuraj, D., et al. Increased numbers of activated mast cells in endometriosis lesions positive for corticotropin-releasing hormone and urocortin. *Am J Reprod Immunol* **52**, 267-275 (2004).
198. Carrarelli, P., et al. Urocortin and corticotrophin-releasing hormone receptor type 2 mRNA are highly expressed in deep infiltrating endometriotic lesions. *Reprod Biomed Online* **33**, 476-483 (2016).
199. Vergetaki, A., et al. Differential expression of CRH, UCN, CRHR1 and CRHR2 in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *PloS one* **8**, e62313 (2013).
200. Kalantaridou, S.N., et al. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *Journal of reproductive immunology* **85**, 33-39 (2010).
201. Calogero, A.E., et al. Effects of corticotropin-releasing hormone on ovarian estrogen production in vitro. *Endocrinology* **137**, 4161-4166 (1996).
202. Bromberger, J.T., et al. Prospective study of the determinants of age at menopause. *American journal of epidemiology* **145**, 124-133 (1997).
203. Minas, V., et al. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin. *Molecular human reproduction* **13**, 663-673 (2007).
204. Cao, J., et al. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* **174**, 7665-7675 (2005).

## 11 Curriculum Vitae

## **12 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Sven Mahner und seinem Vorgänger Herrn Prof. Dr. med. Klaus Friese möchte ich meinen Dank dafür ausdrücken, dass ich diese Doktorarbeit an ihrer Klinik durchführen durfte.

Großer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke, der mich während der gesamten Forschungsarbeit wissenschaftlich wie menschlich hervorragend betreut hat. Für im Verlauf der Arbeit aufgekommene Fragen hatte er stets ein offenes Ohr und eine gewinnbringende Antwort. Auch nach zwischenzeitlichen Unterbrechungen durch meine Auslandsaufenthalte, erste Klinikjahre, familiäre Verpflichtungen und Elternzeit nahm er sich Zeit für einen abschließenden Austausch vor Einreichen der Dissertation. Für all das danke ich ihm sehr herzlich.

Frau Christina Kuhn und Frau Susanne Kunze (†) aus dem Laborteam danke ich sehr für die angenehme Zusammenarbeit und für die Unterstützung bei laborfachlichen Themen.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich herzlich für ihre Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Ehemann für seine großartige Unterstützung.

### **13 Eidesstattliche Versicherung**

**Humpert Elisabeth Christina**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur Expression und Regulation  
der Galektine 1 und 3 im Endometriosegewebe und  
in Endometriumskarzinomzellen in vitro

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Berlin, 26. November 2018**

**Elisabeth Humpert**

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin