

Aus dem Pathologischen Institut
Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Frederick Klauschen



***Die chronische Endometritis im Kontext der
Kinderwunschdiagnostik:***

***Morphologische, immunhistochemische und molekulare Unter-
suchungen an Endometriumsbiopsien bei unerfülltem Kinder-
wunsch***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Robert Erdelkamp

aus

Essen

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. Doris Mayr
Mitberichterstatter: PD Dr. Robert Ochsenkühn

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. Elisa Schmoeckel
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Vorwort.....	8
1.2 Das Endometrium: Histologische Grundlagen	8
1.2.1 Histologischer Aufbau	8
1.2.2 Morphologische Veränderungen im Rahmen des Menstruationszyklus	9
1.2.3 Immunzellen im Endometrium	12
1.3 Endometritis – Überblick	12
1.3.1 Akute Endometritis	13
1.3.2 Chronische Endometritis	13
1.3.3 Seltene spezifische Formen der chronischen Endometritis.....	14
1.4 Chronische Endometritis in der Reproduktionsmedizin	15
1.4.1 Überblick	15
1.4.2 Aktuelle Zahlen	15
1.4.3 Die Rolle der chronischen Endometritis in der Reproduktionsmedizin	16
1.4.4 Problematik der chronischen Endometritis	17
1.5 Zielsetzung und Fragestellung.....	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Probenkollektiv Immunhistochemie	19
2.2 Probenkollektiv Expressionsanalyse	20
2.3 Material	20
2.3.1 Geräte	20
2.3.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.3.3 Chemikalien	21
2.3.4 Software	21
2.4 Färbeprotokolle	22
2.4.1 HE-Färbeprotokoll	22
2.4.2 CD56 Immunhistochemie.....	22
2.4.3 CD138 Immunhistochemie.....	22
2.4.4 CD8 Immunhistochemie.....	22
2.5 Auswertung	22
2.5.1 Auswertung des HE-Schnittpräparates.....	22
2.5.2 Histologische Datierung der endometrialen Schleimhaut	23
2.5.3 Auswertung Immunhistochemie - Allgemeines.....	23
2.5.4 Auswertung CD56 Immunhistochemie	23
2.5.5 Auswertung CD138 Immunhistochemie	24
2.5.6 Auswertung CD8 Immunhistochemie	24
2.5.7 Statistik.....	25

2.6	Multigenanalyse	25
2.6.1	Leerschnitte.....	25
2.6.2	Auskratzen der Leerschnitte	25
2.6.3	RNA-Isolierung im QiaCube.....	25
2.6.4	nCounter System	26
2.6.5	Hybridisierung	27
2.6.6	Prep Station	27
2.6.7	Analyzer	27
2.6.8	Verarbeitung der Rohdaten.....	27
3.	Ergebnisse.....	30
3.1	Immunhistochemie	30
3.1.1	CD138 ⁺ Plasmazellen	30
3.1.2	CD56 ⁺ uterine NK-Zellen	33
3.1.3	CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen	35
3.2	Ergebnisse aus der Expressionsanalyse	37
3.2.1	Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten	37
3.2.2	Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse	41
3.2.3	Gene Set Analyse	43
3.2.4	Alternativer Untersuchungsansatz: Vergleichende Expressionsanalyse der vier fulminantesten Endometritisproben	44
4.	Diskussion	50
4.1	Patientinnenkollektiv	50
4.2	Ergebnisdiskussion der Immunhistochemie	51
4.2.1	CD138 – Goldstandard der Diagnostik	52
4.2.2	CD56	53
4.2.3	CD8	54
4.3	Diskussion Genexpressionsanalyse	55
4.3.1	NanoString-Kollektiv und Methode	55
4.3.2	Differentiell exprimierte Gene	56
4.3.3	Ergebnisse der Gene Set Enrichment Analyse	57
4.3.4	Ergebnisse des alternativen Untersuchungsansatzes.....	57
4.3.5	Fazit der Genexpressionanalyse	57
4.4	Zusammenschau der immunhistochemischen und molekularpathologischen Ergebnisse	58
4.5	Abschließende, praktische Überlegungen	59
5.	Zusammenfassung	60
	Literaturverzeichnis	62
	Anhang: Tabellen	67
	Danksagung	75
	Affidavit	76
	Publikationsliste.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proliferationsphase mit rund-ovalem Drüsenkörper, pseudostratifiziertem Epithel und mitotischer Aktivität. HE, 200x.	10
Abbildung 2 Frühsekretorisch transformierte Endometriumsschleimhaut. HE, 200x.	10
Abbildung 3: Sekretorisch transformierte endometriale Schleimhaut. Links: Gewundener Drüsenvorlauf, HE, 100x. Rechts: Runde Zellkerne, lockeres Chromatin, eosinophiles Zytoplasma, HE, 630x	11
Abbildung 4: PubMed-Publikationen unter dem Stichwort "chronic endometritis".....	16
Abbildung 5: Patientinnenalter zum Zeitpunkt der Endometriumsbiopsie	19
Abbildung 6: Histologische Zyklusphasen der Endometriumsbiopsien	20
Abbildung 7: Materialgewinn einer Pipette-Biopsie, HE, Lupenvergrößerung	23
Abbildung 8: Klassierte Verteilung des Plasmazellinfiltrats	30
Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung des Plasmazellinfiltrats	31
Abbildung 10: Klassierte Verteilung des uNK-Zellbesatzes. Absolute Werte bezeichnen CD56 ⁺ uNK-Zellen/HPF.....	33
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung CD56 ⁺ uNK-Zellen pro HPF	34
Abbildung 12: CD56, klassiert.....	35
Abbildung 13: Klassierte Darstellung der CD8 ⁺ Zelldichte pro 10 HPF	35
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung CD8 ⁺ T-Zellen auf 10 HPF	36
Abbildung 15: CD8, klassiert. Repräsentative Abbildungen der verschiedenen Klassen bei 400x Vergrößerung. In (A) geringe, in (B) mittlere, in (C) hohe und in (D) sehr hohe CD8-Zelldichte.....	36
Abbildung 16: Zählwerte der Housekeeper-Gene (oben) als Quadratwurzel des Expressionsniveaus, um niedrigere Zählwerte abzubilden. Log10-transformierte Zählwerte der exogenen Positivkontrolle aller Proben (unten).	38
Abbildung 17: Multidimensional Scaling Plot, in dem mit gelb die Proben des Kontrollkollektivs, mit grün die Proben des chronische-Endometritis-Kollektivs dargestellt sind.	39
Abbildung 18: Violin-Plot-Darstellung der Datensätze nach erfolgreicher Normalisierung mit vergleichbarer Höhe.	39
Abbildung 19: Heatmap aller 24 Proben (gelb: CE-Gruppe, blau: Kontrollgruppe) und aller untersuchten Gene.....	40
Abbildung 20: Heatmap nach differentieller Genexpressionsanalyse, hierarchisches Clustering von Zeilen und Spalten	42
Abbildung 21: Volcano Plot der differentiellen Expressionsanalyse, Vergleich CE (n=12) mit Kontrolle (n=12).....	42
Abbildung 22 Volcano Plot der differentiellen Expressionsanalyse, Vergleich ausgeprägte CE (n=4) mit Kontrolle (n=12)	45
Abbildung 23: Vergleich ausgeprägte chronische Endometritis (n=4) mit Kontrolle (n=12). Heatmap nach differentieller Genexpressionsanalyse, hierarchisches Clustering von Zeilen und Spalten.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klasseneinteilung uteriner NK-Zellen nach Zelldichte	24
Tabelle 2: Klasseneinteilung des Plasmazellinfiltrates nach Zelldichte	24
Tabelle 3: CE Prävalenz in Abhängigkeit des PZ-Infiltrats	30
Tabelle 4: Korrelation des klassierten Plasmazellinfiltrats mit der Anzahl CD8 ⁺ T-Lymphozyten auf 10 HPF.....	31
Tabelle 5 Korrelation des klassierten Plasmazellinfiltrats mit der Anzahl CD56 ⁺ NK-Zellen/HPF und dem Alter.....	32
Tabelle 6: Kreuztabelle der klassierten uNK-Zelldichte und der Zyklusphase.....	34
Tabelle 7: Plasmazelldichte der Probenkollektive für die Genexpressionsanalyse.....	37
Tabelle 8: Differentiell exprimierte Gene nach FDR-Korrektur, Vergleich CE- und Kontrollgruppe	41
Tabelle 9: Tabellarisches Resultat der Gene Set Analyse. DSS: gerichteter globaler Signifikanzscor, GSS: Globaler Signifikanzscore, Genzahl: Anzahl an Genen des Signalwegs.	43
Tabelle 10: Differentiell exprimierte Gene nach FDR-Korrektur, Vergleich ausgeprägte CE- und Kontrollgruppe. Hervorgehobene Gene in der Voruntersuchung differentiell exprimiert (Kap. 3.2.2)	47
Tabelle 11: Verschiedene Diagnosekriterien der CE	67
Tabelle 12: Antibiotische Behandlungskonzepte der chronischen Endometritis	67
Tabelle 13: Automatisches HE-Färbeprotokoll am Pathologischen Institut der LMU	68
Tabelle 14: BenchMark ULTRA IHC Färbeprotokoll CD56.....	68
Tabelle 15: BenchMark ULTRA IHC Färbeprotokoll CD138.....	69
Tabelle 16: BenchMark ULTRA IHC Färbeprotokoll CD8.....	69
Tabelle 17: Hybridisierungsprotokoll NanoString.....	70
Tabelle 18: Differentiell exprimierte Gene in der Gegenüberstellung ausgeprägter Endometritiden zum Kontrollkollektiv.	70
Tabelle 19: Genliste nCounter Immunology Panel	71
Tabelle 20: NanoString-Kollektiv, RNA-Extraktion.....	74

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CE	<i>Chronische Endometritis</i>
DSS	<i>Directed Significance Score</i>
FFPE	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analyse</i>
GSS	<i>Globaler Signifikanzscore</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HLA-DOB	<i>MHC Klasse II Antigen DOB</i>
HPF	<i>Hauptgesichtsfelder</i>
ICSI	<i>Intrazytoplasmatische Spermieninjektion</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
IKBKE	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon</i>
IVF	<i>In-vitro-Fertilisation</i>
LCK	<i>Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase</i>
LMU	<i>Ludwig-Maximilian-Universität</i>
POD	<i>Postovulatorischer Tag</i>
PTAFR	<i>Platelet activating factor receptor</i>
PZ	<i>Plasmazelle</i>
RIF	<i>Repeated Implantation Failure</i>
RPL	<i>Repeated Pregnancy Loss</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
uNK	<i>uterine NK-Zellen</i>

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Krankheitsbild der chronischen Endometritis (CE) im Kontext von Reproduktionsmedizin und Histopathologie.

Zu Beginn wird kurz der histologische Aufbau und die Funktion des Endometriums selbst beschrieben. Anschließend wird vor diesem Hintergrund die Entität der chronischen Endometritis behandelt, ferner die diagnostischen Herausforderungen und die Relevanz dieser Diagnose im Rahmen der reproduktionsmedizinischen Abklärung eines unerfüllten Kinderwunsches.

Im Folgenden, experimentellen Teil wird die Entität der chronischen Endometritis anhand eines eigenen Patientinnenkollektivs untersucht. Hierzu werden endometriale Schleimhautproben, die mit der Fragestellung nach einer chronischen Endometritis bei unerfülltem Kinderwunsch gewonnen wurden, zuerst immunhistochemisch, schließlich auf molekularpathologischer Ebene charakterisiert und mit Normalschleimhaut verglichen.

Die gewonnenen Ergebnisse gilt es abschließend in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext einzuordnen und die Rolle der chronischen Endometritis vor dem Hintergrund reproduktionsmedizinischer Fragestellungen zu beleuchten.

1.2 Das Endometrium: Histologische Grundlagen

Das Endometrium ist die den Uterus auskleidende Schleimhaut, die ein epitheliales und ein mesenchymales Kompartiment umfasst. Eine Besonderheit des Endometriums liegt in der hohen Wandlungsfähigkeit des morphologischen Erscheinungsbildes, das von Hormonstatus, Patientinnenalter und der Entnahmelokalisation abhängig ist. Ein Verständnis dieser histologischen Grundlagen ist für die weiterführende Diskussion der chronischen Endometritis wichtig und wird im folgenden Abschnitt vermittelt.

1.2.1 Histologischer Aufbau

Das Endometrium besteht aus einem tubulären Drüsenverband, der im Zyklusverlauf formvariabel elongiert, dilatiert und einen gestauchten bis sägezahnartigen Verlauf beschreiben kann. Hierbei wird eine endometriale Drüse in drei Abschnitte unterteilt, deren Epithelzellen in unterschiedlichem Ausmaß hormonellen Einflüssen unterliegen [1, 2].

Das Stratum basalis liegt dem Myometrium an und bildet den regeneratorischen, basalsten Drüsanteil, der den Wiederaufbau der Schleimhaut nach der Menstruationsblutung ermöglicht.

Der sich anschließende, funktionale Drüsanteil – das Stratum functionalis – zeigt ausgeprägte hormonelle Epithelveränderungen. Drüsenform und Zytologie sind für die histologische Auswertung von endometrialen Gewebeproben von besonderer Relevanz [1, 3, 4].

Das Oberflächenepithel ist wenig hormonsensitiv. Die Identifikation des Oberflächenepithels ist wichtig, um kleine Gewebeproben korrekt zu orientieren und eine sichere Unterscheidung der unmittelbar angrenzenden funktionalen Schleimhaut vom Stratum basalis zu ermöglichen.

Das epitheliale Element des Endometriums wird gebildet durch Zellen vom basalis-, proliferativen-, sekretorischen- und Zilien-tragenden Typ.

Die morphologisch ähnlichen proliferativen- und basalis- Zellen haben längliche Kerne mit schlankem, basophilem Zytoplasma. Häufig finden sich Kernteilungsfiguren und ein pseudostratifizierter Aspekt in der Proliferationsphase (vgl. *Abbildung 1*) [1, 5].

Nach der Ovulation findet sich in der Functionalis ein sekretorischer (nicht-muzinöser) Phänotyp. Die Epithelzellen akkumulieren zytoplasmatische sekretorische Produkte, die von infranucleär nach apikal geschleust und schließlich luminal sezerniert werden (vgl. *Abbildung 2*).

Hiernach nimmt das Zytoplasma einen eosinophilen Aspekt an, der Kern ist rund-vesikulär mit fein-dispersem Chromatin und einzelnen Nukleolen (vgl. *Abbildung 3*). Zilien-tragende Zellen sind insbesondere am Oberflächenepithel und im Bereich des Isthmus zu finden [1].

1.2.2 Morphologische Veränderungen im Rahmen des Menstruationszyklus

Mit Einsetzen der Menarche unterliegt das Endometrium hormonabhängigen, morphologisch distinkten Veränderungen im Zyklusverlauf. Da das Stratum basalis und das Endometrium der Oberfläche eine recht konstante, hormon-unabhängige Erscheinung beibehalten, wird im Folgenden mit dem Begriff „Endometrium“ das Stratum functionalis bezeichnet.

Der erste Tag der Regelblutung wird konventionell als erster Zyklustag definiert. Die so initiierte Menstruationsphase beträgt üblicherweise weniger als fünf Tage und wird von der Proliferationsphase gefolgt, die zeitlich deutlich variabler ist und zwischen neun und 20 – im Durchschnitt etwa zehn – Tage andauert [1, 2].

1.2.2.1 Proliferationsphase

Die Proliferationsphase ist durch ein östrogenvermitteltes Wachstum der endometrialen Schleimhaut gekennzeichnet.

Zu Beginn der Proliferationsphase ist der endometriale Drüsenkörper schlank-tubulär. Im zeitlichen Progress finden sich hier wie im Stroma zahlreiche, einfach zu erkennende Mitosefiguren. Das Epithel zeigt mit zunehmender proliferativer Aktivität eine scheinbare Mehrreihigkeit (Pseudostratifizierung). Der Drüsenkörper elongiert, wird gestaucht und windet sich in seinem Verlauf durch das etwas langsamer proliferierende Stroma. Hier finden sich locker verteilte, unscharf begrenzte Zellen mit recht chromatindichten, rund-ovalen, teils spindeligen Zellkernen. Im mittleren Drittel der Proliferationsphase kann das Stroma ödematos aufgelockert werden, eine Veränderung, die besonders prägnant auch im späten Sekretionsstadium zu gewahren ist [1, 2, 5].

Insgesamt bewegen sich die histologischen Veränderungen dieser Zyklusphase in einem diskreten zeitlichen Kontinuum, sodass eine weitere Binnenunterteilung üblicherweise nicht getroffen wird.

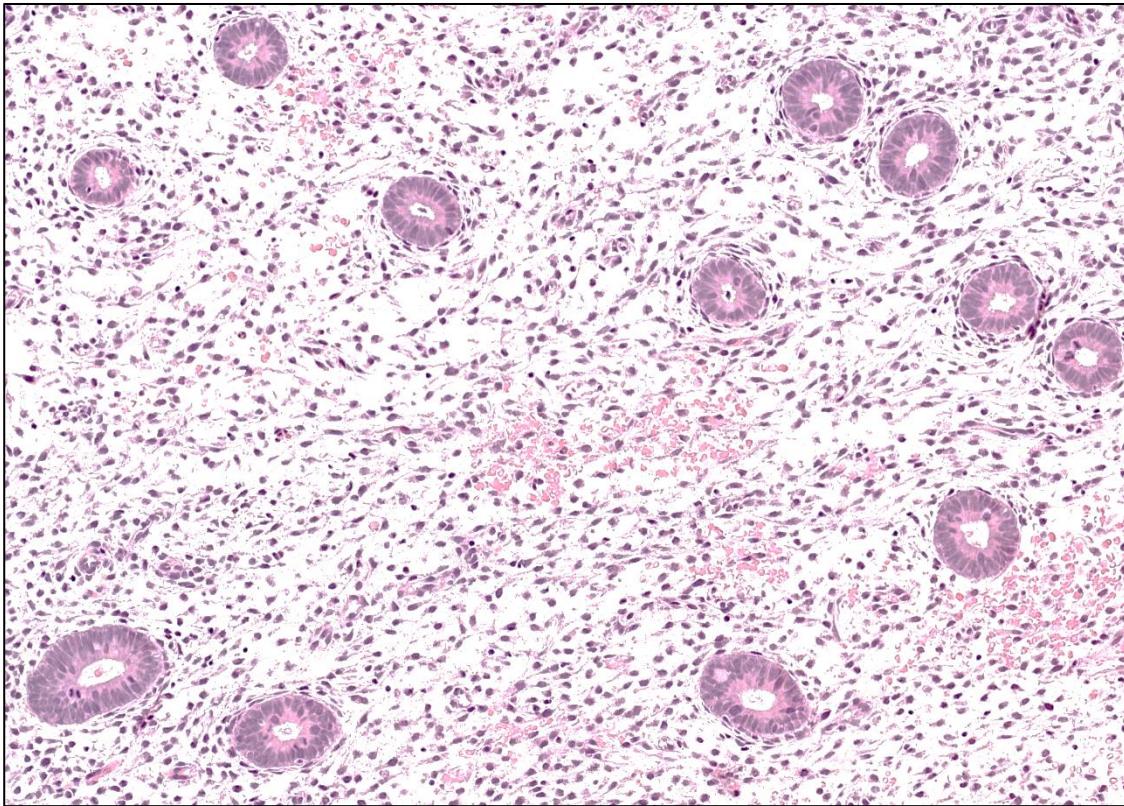


Abbildung 1: Proliferationsphase mit rund-ovalem Drüsenkörper, pseudostratifiziertem Epithel und mitotischer Aktivität. HE, 200x.

1.2.2.2 Sekretionsphase

Durch einen erfolgten Eisprung transformiert ein Tertiärfollikel zum Corpus luteum, das große Mengen Östrogen und Progesteron produziert und so die sekretorische Transformation des Endometriums initiiert. Die Sekretionsphase überspannt – analog zur Lutealphase des Ovars – einen Zeitraum von etwa 14 Tagen, die das Corpus luteum persistiert. In diesem Zeitraum lässt sich histologisch eine recht geordnete Sequenz distinkter morphologischer Veränderungen beobachten [6].

Etwa 36 bis 48 Stunden nach der Ovulation (sog. Inter-
valphase) lassen sich die ersten klaren lichtmikroskopischen Hinweise eines erfolgten Ei-
sprungs in Form retro-
nukleärer Sekretvakuolen in über 50% des Endometriums identifizieren.

Das für die frühe Sekretionsphase typische Merkmal ist die vakuolierte Epithelzelle, deren Sekret erst retro-

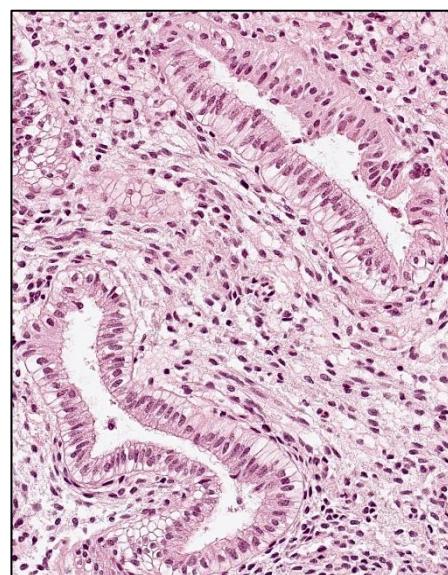


Abbildung 2 Frühsekretorisch trans-
formierte Endometriumsschleimhaut.
HE, 200x.

dann supranuklear lokalisiert ist und bis zum fünften postovulatorischen Tag (POD) in das Drüsenumlumen sezerniert wird [5] ¹.

Die anschließende mittlere Sekretionsphase (POD 5 bis 9) ist durch ein prominentes Stromaödem charakterisiert, worin zytoplasmaarme Stromazellen teils „nacktkernig“ imponieren [2]. Die Epithelzellen zeigen entrundete Kerne mit vesikulärem, lockerem Chromatin und ein eosinophiles Zytoplasma. In den Lumina der jetzt stark gewundenen Drüsen findet sich reichlich Sekret.

In der späten Sekretionsphase kondensieren Stromazellen um augenfällige Spiralarterien und bilden frühdeziuale, epitheloide Zellverbände aus. Das Epithel selbst wirkt vermehrt ungeordnet, unruhig und konturiert die aufgeweiteten Drüsenschläuche sägezahnartig. Im weiteren Verlauf findet sich eine vermehrte Anzahl stromaler Leukozyten (vgl. Kap. 1.2.3) [2, 6].

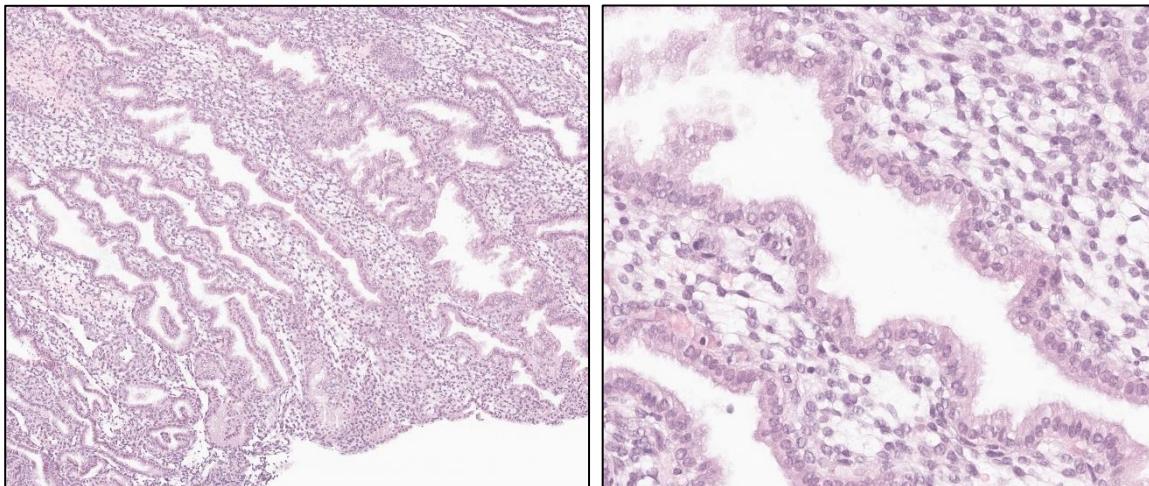


Abbildung 3: Sekretorisch transformierte endometriale Schleimhaut. Links: Gewundener Drüsenvorlauf, HE, 100x. Rechts: Runde Zellkerne, lockeres Chromatin, eosinophiles Zytoplasma, HE, 630x

1.2.2.3 Menstruationsphase

Die abrupte Rückbildung des Gelbkörpers mit konsequent fallendem Östrogen- und Progesteronspiegel induziert den Kollaps von Stroma und Drüsen. Intravaskuläre Fibrinthromben bilden sich. Der Gewebsverband desintegriert, wodurch es zu einer artifiziellen Ballung von Drüsenverbänden und degenerativen Atypien kommen kann. Das Stratum basalis freilich ist ausgenommen. Von hier ausgehend regeneriert die Schleimhaut bis zum Beginn der Proliferationsphase des nächsten Zyklus [1, 2, 5].

¹ Von der Praxis einer auf den Tag genauen histologischen Datierung endometrialer Schleimhaut der Sekretionsphase, wie initial von Noyes beschrieben, ist inzwischen Abstand genommen worden. Eine dreigliedrige Unterteilung in frühe, mittlere und späte Sekretionsphase ist aufgrund der hierfür etablierten histomorphologischen Veränderungen jedoch weiterhin möglich.

1.2.3 Immunzellen im Endometrium

Standardwerte für die Anzahl und Verteilung von Immunzellen im Endometrium anzugeben, ist schwierig. Die Normalverteilung einzelner Lymphozytensubpopulationen im Zyklusverlauf ist großen Schwankungen unterworfen. Umso wichtiger ist es für das Verständnis endometrialer Entzündungsprozesse, Zahl, Verteilung und Funktion der relevanten Zellarten zu kennen.

1.2.3.1 Uterine NK-Zellen

Uterine natürliche Killer-Zellen (uNK) sind eine Hauptgruppe der Leukozyten des Uterus. Uterine NK-Zellen können anhand der relativen Expressionsintensität der Oberflächenmarker (Cluster of Differentiation, CD) CD56^{hell} und CD16^{schwach} von NK-Zellen des peripheren Blutes (CD56^{schwach} und CD16⁺) unterschieden werden. Funktionell besitzen uNK nur eine geringe zytotoxische Aktivität [7, 8]. Eine wichtige Funktion wird ihnen bei der Implantation des Embryos und im Prozess der Plazentation des Trophoblasten durch vaskuläre Umbauprozesse zugeschrieben [9-11]. Hierzu passend findet sich eine zyklusabhängig um den Faktor zehn schwankende uNK-Zell-dichte, die zu Beginn der sekretorischen Phase niedrig ist und kurz vor der Menstruation bis zu 40% aller Stromazellen beträgt [12, 13]².

1.2.3.2 CD8⁺ T-Lymphozyten

Zytotoxische, CD8⁺ T-Lymphozyten stellen den Großteil endometrialer T-Lymphozyten dar [14, 15]. Innerhalb der Functionalis ist neben einer diffusen, stromalen Verteilung die Bildung perivasculärer und periglandulärer Aggregate beschrieben, die eine genaue Quantifizierung erschweren [12, 16]. Ferner sind CD8⁺-prädominante lymphozytäre Aggregate in der Basalis zu finden [17]. Ihnen wird eine wichtige Funktion im Kontext der materno-fetalen Immuntoleranz zugeschrieben [18].

1.2.3.3 Plasmazellen

Ob Plasmazellen (PZ) grundsätzlich einen Teil des physiologischen endometrialen Zellbildes bilden können, ist umstritten [19]. Gewisse Einigkeit besteht in der Feststellung, dass ein „zellreiches“ Plasmazellinfiltrat zumeist als pathologisch zu werten sei, vereinzelte Plasmazellen unter Umständen noch als physiologisch gelten können. Die Schwierigkeiten der Grenzziehung und aktuelle Vorschläge zur Quantifizierung von Plasmazellen werden an gegebener Stelle ausführlich diskutiert und bilden den Kernpunkt in der kritischen Auseinandersetzung mit der Diagnose und Entität der chronischen Endometritis.

1.3 Endometritis – Überblick

Entzündliche Prozesse der Gebärmutter schleimhaut lassen sich anhand ihres zeitlichen Verlaufs und klinisch/pathologischen Erscheinungsbildes in *akute* und *chronische* Endometritiden unterteilen. Diese Gliederung wird unter Hervorhebung der chronischen Endometritis auch im Folgenden gewahrt.

² In den hier zitierten, maßgeblichen Studien von Russel werden Durchschnittswerte von 180 bis 250 uNK/mm² für Proliferations- und frühe Sekretionsphase gegeben, mit einem Anstieg auf bis zu 2000 uNK/mm² prämenstrual.

1.3.1 Akute Endometritis

Akute Endometritiden außerhalb des Wochenbetts sind selten [2]. Zumeist handelt es sich um aszendierende, bakterielle Infektionen mit Mikroorganismen aus Zervix und Vagina oder operative Komplikationen eines Kaiserschnitts (u.a. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) [20-22]. Die klinische Symptomatik umfasst Fieber, Unterleibsschmerzen und blutigen vaginalen Ausfluss³. Histologisch erkannt man einen floriden Entzündungsprozess, reich an neutrophilen Granulozyten und Mikroabszessen. Neben einer symptomatischen Therapie, ist eine erregergerechte Antibiotikatherapie indiziert [20]. Eine Gewebsprobe zur histologischen Diagnostik wird nur selten gewonnen.

1.3.2 Chronische Endometritis

1.3.2.1 Ätiologie und Klinik

Die chronische Endometritis ist eine persistierende, plasmazellreiche Entzündung der endometrialen Mukosa.

Klinisch kann eine unspezifische Symptomatik mit abnormer uteriner Blutung, Dyspareunie, Unterleibsschmerzen und Leukorrhoe vorliegen [23, 24]. Viele Fälle verlaufen jedoch völlig asymptomatisch. Von großer klinischer Bedeutung ist die chronische Endometritis wegen ihres möglichen Zusammenhangs mit Infertilität, der in den letzten Jahren zum Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses geworden ist [25-29].

Die Hauptursache der chronischen Endometritis ist eine subklinische mikrobielle Infektion, wobei sich das Erregerspektrum von dem der akuten Verlaufsformen unterscheidet [22]⁴. Zu den häufigen Erregern zählen u.a. *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Mycoplasmen*, *Proteus*, *Gardnerella vaginalis*, und *Hefen* [30, 31]. Das Mikrobiogramm des Endometriums ist zu dem von Zervix und Vagina distinkt [22].

1.3.2.2 Histologische Diagnostik

Die Diagnose einer chronischen Entzündung kann in den meisten Geweben des menschlichen Körpers einfach getroffen werden. Im Endometrium ist dies schwierig. Zyklusabhängig wird ein Teil der endometrialen Schleimhaut rhythmisch regeneriert und abgestoßen, wobei ein buntes, makrophagen- und lymphozytenreiches Entzündungszellinfiltrat Teil des physiologischen Zellbesatzes der Menstruationsphase ist (vgl. Kap. 1.3.3: „Immunzellen im Endometrium“).

Über einen Zeitraum von mehr als einem Jahrhundert ist der Plasmazelle eine sonderbare Rolle in der Diagnose der chronischen Endometritis zugefallen⁵.

Eine Gewebeprobe wird meist über eine Endometriumsbiopsie via Pipette, seltener durch eine Kürettage gewonnen. Diagnostischer Goldstandard der chronischen Endometritis ist der histologische Nachweis einer plasmazellreichen Entzündung in der endometrialen Schleimhaut [32].

³ Sog. Becken- oder Unterleibsentzündung, im englischen Sprachraum Pelvic Inflammatory Disease (PID).

⁴ Auch mechanische Alterationen durch Fremdkörper (wie ein intrauterines Pessar) oder eine veränderte Anatomie (Leiomyomknoten, Endometriumpolyphen, anatomische Varianten etc.) können zu einer chronischen Endometritis führen.

⁵ F.Hitschmann, L.Adler: Die Lehre von der Endometritis, Zeitschrift für Geburtshilfe, 1907

Daneben finden sich weitere, variabel ausgeprägte morphologische Veränderungen, die für diese Diagnose als typisch, jedoch nicht beweisend gelten. Hierzu zählen reaktive Stromaveränderungen mit Ödem und fibroblastär-spindeliger Formvariation der Stromazellen, eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten und Lymphfollikeln sowie eine alterierte Drüsenentwicklung mit dissoziierter Reifungsstörung [32, 33].

Klare Grenzwerte für die Diagnose einer chronischen Endometritis sind nicht etabliert, auch existieren keine einheitlichen Protokolle zur Bestimmung des Plasmazellgehaltes im Gewebe. Da die sichere Identifikation von Plasmazellen im endometrialen Stroma auch für erfahrene Pathologen schwierig ist⁶, hat sich die Technik einer immunhistochemischen Markierung mit einem Antikörper für CD138 zur Darstellung von Plasmazellen etabliert [34-38].

Die Quantifizierung der Plasmazellen und die Kriterien zur Diagnosestellung einer chronischen Endometritis sind uneinheitlich und variabel. Eine Übersicht der verschiedenen Grenzwerte ist in *Tabelle 11* (Anhang) gegeben.

1.3.2.3 Weitere diagnostische Verfahren

Zu den hysteroskopischen Merkmalen einer chronischen Endometritis zählen ein Mukosaödem, eine fokale oder diffuse endometriale Hyperämie und der Nachweis von Mikropolypen. Angaben zur Sensitivität und Spezifität der Untersuchung schwanken erwartungsgemäß bei unterschiedlichen Definitionen der chronischen Endometritis stark [39, 40].

Verwachsungen und Kalzifikationen durch bereits fortgeschrittene entzündliche Prozesse können sonographisch dargestellt werden [41].

Ein mikrobiologischer Erregernachweis kann die Grundlage einer medikamentösen Therapie bilden [42].

1.3.2.4 Therapie

Ein einheitlich etabliertes Therapiekonzept zur Behandlung der chronischen Endometritis existiert nicht. Die chronische Endometritis gilt als erfolgreich therapiert, wenn im Rahmen einer Kontrollbiopsie ein endometriales Plasmazellinfiltrat nicht mehr nachweisbar ist⁷.

Auf die Frage nach einem Therapieerfolg in Hinsicht auf Konzeption und Schwangerschaft wird gesondert in Kapitel *1.4 Chronische Endometritis in der Reproduktionsmedizin* eingegangen.

Wo eine Erregerdiagnostik (über Kultur oder Polymerase-Kettenreaktion) verfügbar ist, kann eine gezielte Antibiotikatherapie angeboten werden. Auch eine kalkulierte Antibiotikagabe ist mit hohen Heilungsraten von bis zu 99.1% assoziiert [43, 44]. In jedem Fall ist eine biotische Kontrolle des Therapieergebnisses anzustreben. Mögliche Behandlungskonzepte sind im Anhang in *Tabelle 12* hinterlegt.

1.3.3 Seltene spezifische Formen der chronischen Endometritis

Wenige Endometritiden lassen sich durch ein charakteristisches histologisches Erscheinungsbild einem Erreger zuordnen und können deshalb auch als „spezifisch“ bezeichnet werden.

⁶ Bedingt wird dies z.B. durch ein zyklusabhängig besonders zelldichtes Stroma oder morphologische Überschneidungen mit Stromazellen.

⁷ Über die Problematik der Diagnosekriterien vgl. Kap. *1.3.2.2 Histologische Diagnostik*

Die tuberkulöse Endometritis ist eine im südostasiatischen Raum gehäufte granulomatöse Entzündungsreaktion auf das *Mycobacterium tuberculosis* mit hierfür klassischen, zentral nekrotischen, epitheloid- und riesenzellhaltigen Granulomen mit lymphozytärem Randwall [20].

Virale Endometritiden, wie beispielsweise durch das Zytomegalievirus oder Herpes simplex hervorgerufen, können postpartal und unter Immunsuppression auftreten. Histologische Anhaltpunkte für eine Virusinfektion sind zytomegale (viroide) Zellformen mit nukleären Inklusionen [2].

Fungale Endometritiden sind in der Literatur kaum beschrieben.

1.4 Chronische Endometritis in der Reproduktionsmedizin

1.4.1 Überblick

Kaum ein Gebiet der Medizin hat in den letzten 40 Jahren so rasante Fortschritte gezeigt und so an Bedeutung gewonnen, wie die Reproduktionsmedizin. Aufgabengebiet dieses Feldes ist es, die Ursachen von Kinderlosigkeit zu erkennen, zu benennen und zu behandeln. Eine dieser Ursachen mag in dem Krankheitsbild der chronischen Endometritis zu finden sein, mit der sich diese Arbeit befasst.

Neben einer existenziellen Bedeutung als moderner Teil der Familienplanung hat die Reproduktionsmedizin innerhalb der Gynäkologie auch eine besondere finanzielle Bedeutung, da der Anteil privat abgerechneter Leistungen hier besonders hoch ist. Die Verfahren der Reproduktionsmedizin umfassen heutzutage insbesondere In-vitro-Fertilisation (IVF), auch in Kombination mit der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI). Beide Verfahren werden sowohl in Frischzyklen als auch nach Kryokonservation durchgeführt [45].

Bleibt eine Schwangerschaft auch nach mehreren Behandlungszyklen aus, so spricht man von einem „wiederholten Implantationsversagen“ (Repeated Implantation Failure, RIF). Kommt es mehrmals zu Schwangerschaften, die in einem Abort resultieren, wird dies „wiederholter Schwangerschaftsverlust“ (Repeated Pregnancy Loss, RPL) genannt. Eine einheitliche Definition und Handhabe dieser Terminologie existieren zurzeit nicht [45-47]⁸.

1.4.2 Aktuelle Zahlen

Zentral werden in Deutschland seit 1982 Daten reproduktionsmedizinischer Einrichtungen dem Deutschen IVF-Register übermittelt, hier gesammelt und in Form von Jahrbüchern der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

Im Jahr 2017 wurden 54255 Transferbehandlungen durchgeführt, von denen 33,2% in einer Schwangerschaft resultierten. Die tatsächliche Geburtenrate pro Transfer betrug 23,6%, wobei der Erfolg einer Schwangerschaft stark altersabhängig ist, und ab dem 41. Lebensjahr nur noch 15% beträgt [45].

Auf internationaler Ebene ist die Datenlage unvollständiger und muss durch Schätzungen ergänzt werden [47]. Ein internationaler Report für 2011 berichtet mindestens 1.643.912 durchgeführte

⁸ Gängig ist hingegen eine Definition des RIF als ausbleibende Implantation nach kumulativem Transfer von vier Embryonen guter Qualität innerhalb zweier Frisch- oder Auftauzyklen. Als RPL bezeichnet wird der Verlust von zwei oder mehr Schwangerschaften.

Transferzyklen und 297.026 Geburten (wohlgemerkt unter Ausschluss von China). Die Geburtenrate pro Transfer betrug somit 18,1%.

1.4.3 Die Rolle der chronischen Endometritis in der Reproduktionsmedizin

Auch wenn die Verfahren der Reproduktionsmedizin stets verfeinert und verbessert werden, bleibt ein Teil der Kinderwünsche unerfüllt. Wegen eines möglichen Zusammenhangs zwischen der chronischen Endometritis und Infertilität, ist in den letzten Jahren ein großes Interesse an dieser ansonsten häufig asymptomatischen Entität aufgekommen. Die Anzahl der zu dem Thema veröffentlichten Publikationen ist in den letzten zehn Jahren deutlich gestiegen (vgl. Abbildung 4), befindet sich jedoch weiterhin auf einem vergleichsweise niedrigen Niveau. In den aktuellen Leitlinienuntersuchungen findet man die Empfehlung, eine chronische Endometritis als Ur-

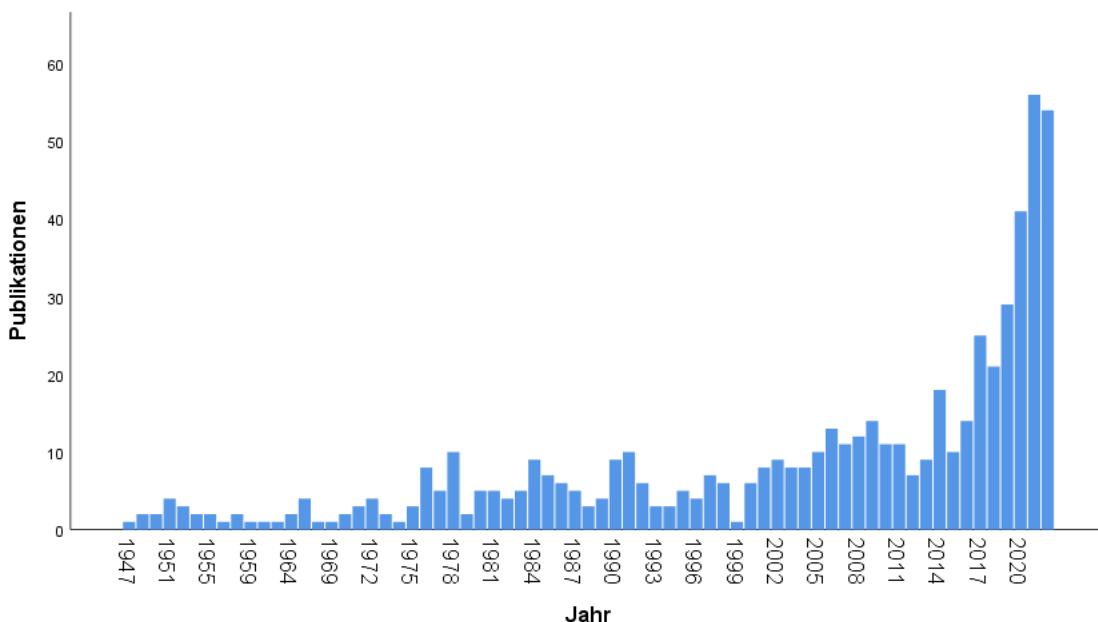


Abbildung 4: PubMed-Publikationen unter dem Stichwort "chronic endometritis"

sache einer ausbleibenden Schwangerschaft auszuschließen [48].

Studien haben gezeigt, dass in einem substantiellen Anteil an Patientinnen mit RIF/RPL eine chronisch-plasmazellreiche Entzündung in gewonnener endometrialer Schleimhaut festgestellt werden konnte [42, 49-54]. Die Angaben zur Prävalenz der chronischen Endometritis schwanken stark und liegen zwischen 2,8 % und 72 % bei Frauen in gebärfähigem Alter [40, 50, 55, 56]. Eine Prävalenz von etwa 24% im Rahmen einer reproduktionsmedizinischen gynäkologischen Probenherhebung erscheint realistisch [57].

Dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einem Plasmazellinfiltrat und RIF/RPL besteht, scheint durch die signifikante erhöhte Implantations- und Schwangerschaftsraten nach erfolgreicher Therapie belegt. Hiermit wurden Heilungsraten von bis zu 99.1% erreicht. Von einem Anstieg der Geburtenrate um bis zu 56% wird berichtet [42, 53]. Der genaue kausale Zusammenhang zwischen chronischer Endometritis und dem komplexen immunologischen Reigen an der mato-fetalen Grenzzone während der Implantation bleibt jedoch bislang unerschlossen.

Auch wenn zumeist eine signifikante Steigerung der Geburtenrate belegt werden konnte [43, 44], bleibt der genaue Kausalzusammenhang von histologischer und mikrobiologischer Diagnostik, antibiotischer Therapie und Bewertung des Therapieerfolgs umstritten [53].

1.4.4 Problematik der chronischen Endometritis

Ein Zusammenhang zwischen der chronischen Endometritis und unerfülltem Kinderwunsch durch wissenschaftliche Studien scheint überzeugend belegt. Gleichzeitig bleiben die Kriterien zur Diagnosestellung und die klinische Konsequenz uneinheitlich. Folgende (auch über diese Arbeit hinausreichenden) Fragestellungen umschreiben das Problemfeld um die Diagnose der chronischen Endometritis:

- Ab welcher Plasmazellzahl ist die Diagnose einer chronischen Endometritis zu stellen?
- Welche Gewebsfläche muss hierzu ausgewertet werden?
- Welches immunhistochemische Protokoll (Antikörper, Verdünnung) ist am besten zur Identifizierung von Plasmazellen geeignet?
- Welcher Stellenwert kommt ergänzenden Untersuchungen wie der Quantifizierung uteriner NK-Zellen zu?
- Wie wird die chronische Endometritis am besten therapiert?
- Welchen Einfluss hat die chronische Endometritis auf die Fertilität?

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Die chronische Endometritis ist eine schon seit über 100 Jahren bekannte und beschriebene Diagnose, die im Prozess der kontinuierlichen Entwicklung der Reproduktionsmedizin erneut besonderes Interesse in der klinischen Aufarbeitung des unerfüllten Kinderwunsches gefunden hat.

Die Disziplin der Pathologie wird im diagnostischen Alltag regelmäßig um die Beurteilung von biotisch gewonnener Endometriumschleimhaut zum Ausschluss einer chronischen Endometritis gebeten.

Explizit wird neben dem Nachweis von Plasmazellen hierbei häufig auch eine immunhistochemische Zusatzuntersuchung zur Charakterisierung des uNK- Zellgehaltes angefordert.

Die folgende Arbeit bildet einen bimodalen Untersuchungsansatz ab.

Unter der Fragestellung nach einer chronischen Endometritis bei unerfülltem Kinderwunsch gewonnene endometriale Schleimhaut wird immunhistochemisch aufgearbeitet, um Zahl und Verteilung uteriner NK-Zellen, zytotoxischer T-Zellen und Plasmazellen auszuwerten. Hierbei wird geprüft, ob sich neben dem etablierten diagnostischen Kriterium eines Plasmazellinfiltrates ein inflammatorisches Begleitmilieu als weiteres diagnostisches Kriterium darstellen lässt.

Danach wird in einem weiterführenden Schritt an einem kleineren Kollektiv das Expressionsprofil von über 500 immunologisch relevanten Genen gemessen und eruiert, ob hierbei auf mRNA-Ebene relevante Unterschiede detektierbar sind, die dabei helfen, das Krankheitsbild der chronischen Endometritis prägnanter zu definieren.

Folgende Fragen gilt es, zu klären:

- Welche Verteilung von Immunzellen ist zu erwarten, wenn in einem großen Probenkollektiv unter der Fragestellung nach einer chronischen Endometritis eine etablierte immunhistochemische Darstellung des Immunzellbesatzes, speziell von Plasmazellen, NK-Zellen und CD8+ T-Lymphozyten, erfolgt?
- Kann durch eine Genexpressionsanalyse immunologisch relevanter Gene ein Milieu charakterisiert werden, das für die chronische Endometritis charakteristisch ist?
- Können weitere Faktoren identifiziert werden, die eine genauere Diagnose und Eingrenzung der chronischen Endometritis ermöglichen?
- Lässt es sich schlussendlich anhand der erhobenen Ergebnisse rechtfertigen, routinemäßig immunhistochemische Zusatzuntersuchung unter der Fragestellung nach einer chronischen Endometritis anzufertigen?

2. Material und Methoden

2.1 Probenkollektiv Immunhistochemie

Die vorliegende Arbeit verfolgt zwei verschiedene Untersuchungsansätze zur näheren Charakterisierung der chronischen Endometritis.

An einem großen Patientinnenkollektiv erfolgte neben der routinemäßig durchgeführten HE-Färbung eine ergänzende immunhistochemische Untersuchung mit den Antikörpern gegen CD56 (uNK-Zellen), CD138 (Plasmazellen) und CD8 (CD8⁺-T-Zellen).

Hierfür wurde ein Kollektiv von 115 Endometriumsbiopsien von Patientinnen erstellt, die zwischen 2017 und 2019 an die Kinderwunschsprechstunde der Frauenklinik des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilian-Universität angebunden waren. Bei allen Patientinnen war unter der Fragestellung einer chronischen Endometritis bei RPF/RIF eine Endometriumsbiopsie gewonnen worden.

Das in Formalin fixierte und Paraffin eingebettete Gewebe wurde dem Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München entnommen. Die zugehörigen histologischen Schnittpräparate wurden lichtmikroskopisch erneut beurteilt. Repräsentativ erfasste Endometriumschleimhaut fand sich dabei in 102 (87%) Fällen.

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme betrug das Durchschnittsalter der Patientinnen 36,6 Jahre (exakte Altersverteilung siehe Abb. 5).

Histologisch zeigten 45 Proben das Bild einer proliferationsaktiven Schleimhaut, 46 Proben eine sekretorische Transformation und eine Probe das Bild einer beginnenden Abbruchsbildung. Funktionell unregelmäßige Schleimhaut zeigte sich in zehn Proben, funktionsarme in einer, siehe Abb. 6, (hierzu vgl. Kap. 2.5.2).

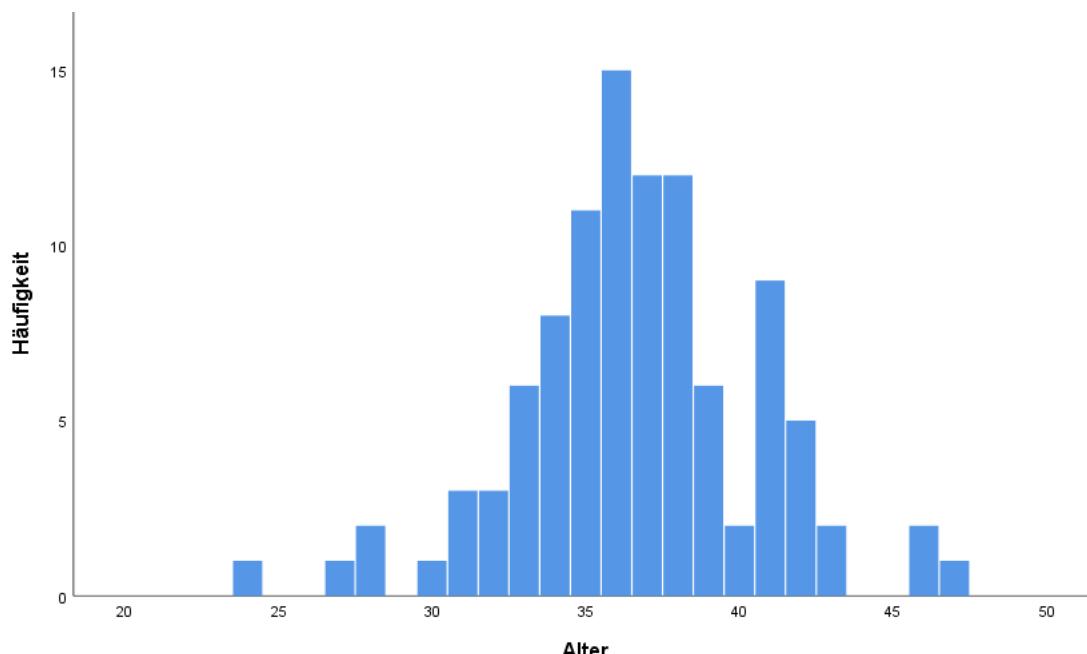


Abbildung 5: Patientinnenalter zum Zeitpunkt der Endometriumsbiopsie

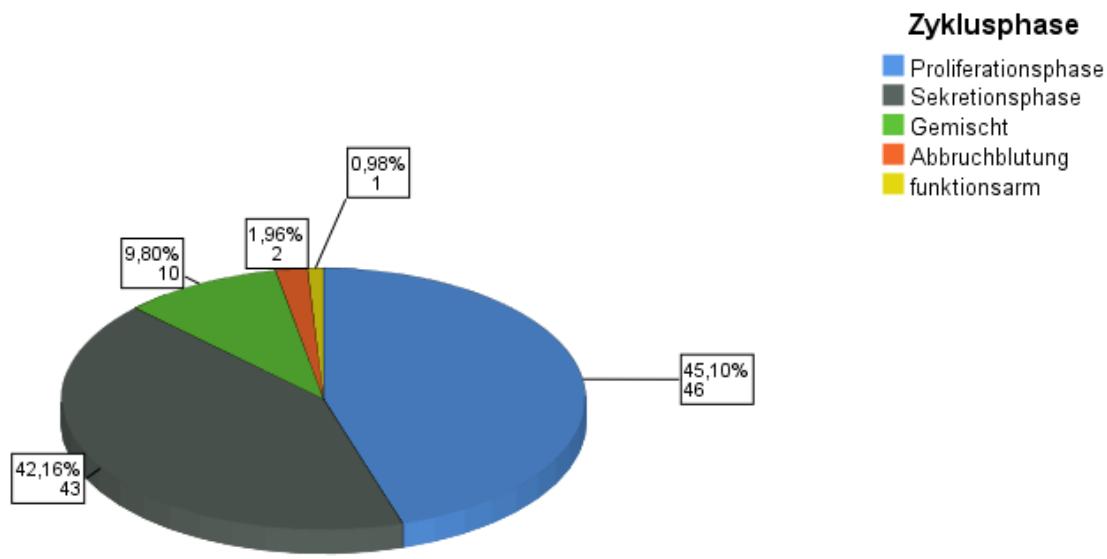


Abbildung 6: Histologische Zyklusphasen der Endometriumsbiopsien

2.2 Probenkollektiv Expressionsanalyse

In einem zweiten Testverfahren wurde mit dem NanoString nCounter® Immunology Panel an zwei kleineren Gruppen eine vergleichende Multigen Expressionanalyse durchgeführt (594 Gene, Anhang, Tabelle 19). Hierfür wurden aus dem bereits gebildeten, 102 Fälle umfassenden Kollektiv 12 geeignete Proben selektiert, die histologisch und immunhistochemisch das Bild einer chronischen Endometritis aufwiesen.

Gegenübergestellt wurden 12 Patientinnen ohne Anhalt für das Vorliegen einer chronischen Endometritis.

2.3 Material

2.3.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Entwässerungsgerät	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Färbeautomat, BenchMark ULTRA IHC	Ventana Medical Systems, Inc., Oro Valley, USA
Färbeautomat, Sakura Tissue-TEK	Sakura Finetek Germany GmbH, Umkirch, Deutschland
Mikroskop, Leica DM 2500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
NanoString FLEX nCounter®	NanoString Technologies, Seattle, USA

Präparatescanner, Leica Aperio	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
QIAcube	QIAGEN GmbH, Venlo, Niederlande
Rotationsmikrotom	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Schlittenmikrotom	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Vortexer, MX-S	Dragon Laboratory Instruments Ltd., Beijing, China

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Kolibri Wischtücher	IGEFA SE & Co, KG, Neumünster, Deutschland
Nanostring Immunology Panel v2 C2328	NanoString Technologies, Seattle, USA
Objekträger, SuperFrost Plus	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Paraffin	Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

2.3.3 Chemikalien

Aqua bidest	Apotheke LMU, München, Deutschland
Ethanol (reinst)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Apotheke LMU, München, Deutschland
Hämatoxylin	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
QiaCube RNEasy Kit	QIAGEN GmbH, Venlo, Niederlande
Skalpellklingen	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Xylol (reinst)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.3.4 Software

Endnote	Clarivate PLC, Philadelphia, PA, USA
IBM SPSS Statistics 26	IBM Co., Armonk, NY, USA
Microsoft Office	Microsoft Co., Redmond, WA, USA
nSolver 4.0	NanoString Technologies, Seattle, USA
PathoPro	Ifms GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Rosalind Ver. 3.38.0.1	ROSALIND, Inc. (San Diego, CA)

2.4 Färbeprotokolle

2.4.1 HE-Färbeprotokoll

Die HE-Färbung wurde standardisiert als Automatenfärbung durchgeführt. Das entsprechende Färbeprotokoll ist in *Tabelle 13* im Anhang hinterlegt.

2.4.2 CD56 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) für CD56 wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper 123C3 des Herstellers Ventana durchgeführt. Es handelt sich um einen ready-to-use Antikörper, es bedarf keiner Verdünnung. Das entsprechende Färbeprotokoll ist in *Tabelle 14* im Anhang hinterlegt.

2.4.3 CD138 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie für CD138 wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper B-A38 des Herstellers Zytomed in der Verdünnung 1:200 durchgeführt. Das entsprechende Färbeprotokoll ist in *Tabelle 15* im Anhang hinterlegt.

2.4.4 CD8 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie für CD8 wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper C8/144B von Cell Marque in der Verdünnung 1:50 durchgeführt. Das entsprechende Färbeprotokoll ist in *Tabelle 16* im Anhang hinterlegt.

2.5 Auswertung

2.5.1 Auswertung des HE-Schnittpräparates

Lichtmikroskopisch wurde geprüft, ob das Probenmaterial mindestens zehn beurteilbare Hauptgesichtsfelder (HPF) endometrialer Schleimhaut abbildet. Schleimhaut aus der Endozervix oder aus dem Isthmusbereich wurde für die nachfolgenden Untersuchungen nicht gewertet und ausschließlich funktionelle Korpusschleimhaut berücksichtigt. Der beispielhafte Materialgewinn einer via Pipette gewonnenen Endometriumsbiopsie ist in *Abbildung 7* illustriert.



Abbildung 7: Materialgewinn einer Pipette-Biopsie, HE, Lupenvergrößerung

2.5.2 Histologische Datierung der endometrialen Schleimhaut

Die histologische Zuordnung der Endometriumsbiopsate erfolgte in Proliferations-, Sekretions- und Menstruationsphase anhand der grundlegenden morphologischen Kriterien, wie sie in der Einleitung beschrieben wurden. Ein klarer Übergang von Proliferation zu Sekretion wurde durch die eindeutige Vakuolisierung von >50% der Drüsenepithelien definiert. Von einer tagesgenauen Datierung der histologischen Veränderungen, wie von Noyes [5] etabliert, wurde aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit abgesehen [3, 4, 6].

Als funktionsarm (oder atroph) wurde Schleimhaut bezeichnet, deren glanduläre Elemente rarefiziert und dilatiert waren, mit konkordant abgeflachtem Epithel, das weder Zeichen von proliferativer noch sekretorischer Aktivität aufwies.

Der Begriff eines funktionell unregelmäßigen Endometriums wurde genutzt, wenn die histologischen Merkmale proliferativer und fortgeschritten sekretorischer Transformation parallel bestanden.

2.5.3 Auswertung Immunhistochemie - Allgemeines

Zielstrukturen der angewandten Färbungen in der Immunhistochemie sind die membranständigen Oberflächenmoleküle CD138, CD56 und CD8. Eine Zelle wurde dann als distinkt markiert gewertet, wenn eine klare, zirkumferentielle Färbung der Zellmembran vorlag. Zur Kontrolle der Färbereaktion ist jedem Schnitt eine exogene Positivkontrolle aufgetragen. Die sichere Zuordnung einer Färbereaktion im Zellverband erfolgte durch morphologische Korrelation in der Gegenfärbung.

2.5.4 Auswertung CD56 Immunhistochemie

Etablierte Studienprotokolle zur Quantifizierung des uNK-Zellbesatzes existieren nicht. Analog der Publikation von Russel [12, 13] wurden CD56⁺ NK-Zellen auf einem HPF von morphologisch durchschnittlicher Zeldichte ausgewertet.

Die Zelldichte wurden zur besseren Übersicht in vier Klassen ähnlicher Klassenbreite unterteilt.

Tabelle 1 Klasseneinteilung uteriner NK-Zellen nach Zelldichte

Zelldichte	Gering	Mäßig	Hoch	Sehr hoch
Anzahl uNK-Zellen pro HPF	0 – 19	20 – 39	40 – 59	> 60

2.5.5 Auswertung CD138 Immunhistochemie

CD138⁺ Plasmazellen wurden auf einer Fläche von 10 HPF im endometrialen Stroma ausgezählt. Hämorrhagisch eingeblutete Areale wurden ausgespart. Da auch endometriale Drüsenepithezel len eine zumeist schwache und basolateral betonte CD138-Expression aufweisen können [34], erfolgte eine genaue morphologische Korrelation in der Gegenfärbung.

Die absoluten Zahlwerte wurden weiter in drei Klassen eingeteilt. Klasse 1 wurde definiert als „≤ 1 Plasmazelle/10HPF“, Klasse 2 als „2 bis 5 Plasmazellen/10HPF“ und Klasse 3 als „≥ 6 Plasmazellen/10HPF“ (*Tabelle 2*). Grundlage dieser Einteilung ist die Zusammenschau der verschiedenen, aktuell diskutierten Diagnosekriterien für die chronische Endometritis, wie in *Tabelle 11* aufgeführt. Für die Diagnose einer chronischen Endometritis wurde analog zu Kitaya 2018 [23] ein Grenzwert von 2 CD138⁺ Plasmazellen auf 10 HPF gewählt.

Tabelle 2: Klasseneinteilung des Plasmazellinfiltrates nach Zelldichte

Plasmazelldichte	Gering	Mittel	Hoch
Anzahl Plasmazellen pro 10 HPF	≤ 1	2 - 5	≥ 6

2.5.6 Auswertung CD8 Immunhistochemie

CD8⁺ T-Zellen wurden auf 10 repräsentativen HPF ausgezählt, wobei perivaskuläre Hot-Spot-Areale nicht mitgezählt wurden [13]. Analog zur Auswertung von Plasma- und uNK-Zellen erfolgte auch hier eine Klasseneinteilung.

Zelldichte	Gering	Mäßig	Hoch	Sehr hoch
Anzahl CD8 ⁺ T-Zellen pro 10 HPF	0 – 100	101 – 200	201 – 300	> 300

2.5.7 Statistik

Die Erstellung und statistische Auswertung der Datenbank erfolgte mit IBM SPSS Statistics.

Über eine Kreuztabelle fand der Chi-Quadrat-Test Anwendung, wo ein statistischer Zusammenhang zwischen nominal- und ordinalskalierten Werten geprüft werden sollte. Der exakte Test nach Fisher wurde durchgeführt, wenn die erwartete Häufigkeit einer Zelle kleiner als 5 und die minimale erwartete Häufigkeit kleiner als eins war.

Ein linearer Zusammenhang zwischen mindestens ordinalskalierten Variablen wurde über eine zweiseitige Rangkorrelationsanalyse nach Spearman überprüft.

Für ausschließlich metrisch skalierte Variablen fand das Korrelationsmaß nach Pearson Anwendung.

2.6 Multigenanalyse

An einem Patientinnenkollektiv von zweimal zwölf Proben wurde eine Expressionsanalyse von 594 Genen durchgeführt, die an immunologischen Funktionen beteiligt sind. Hierfür wurden Leerschnitte der FFPE-Gewebeblöcke angefertigt, adäquates Material manuell mittels Skalpells abgekratzt und anschließend die RNA automatisiert im QiaCube aufgereinigt.

Die Multigenanalyse der RNA erfolgte mit dem nCounter® FLEX Analysesystem. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Web-basierte bioinformatische Plattform Rosalind [58], über die die Rohdaten der NanoString-Analyse analog des NanoString-eigenen Analysetools nSolver Advanced Analysis Software nach gleichen Kriterien verarbeitet werden.

Die RNA-Präparation und praktischen Schritte der NanoString Analyse wurden von Sabine Sa-gebiel-Kohler (AG Jung/Kumbrink) durchgeführt.

2.6.1 Leerschnitte

Von jeder FFPE-Gewebeprobe wurden zehn Leerschnitte mit einer Schnittdicke von 2 µm angefertigt und in ein Wasserbad überführt. Nach Aufnahme durch je einen gläsernen Objekträger trockneten die Schnitte bei 60°C für 12 Minuten. Eine Gewebsfläche von etwa 1cm² galt als erforderlich, um ausreichende RNA gewinnen zu können.

2.6.2 Auskratzen der Leerschnitte

Der bereits aus der Primärdiagnostik vorliegende Hämatoxylin-Eosin (HE)- gefärbte Schnitt wurde mikroskopisch beurteilt und repräsentative Endometriumschleimhaut mit einem Permanentmarker händisch umfahren. Teils miterfasste Anteile von endozervikalem oder myometrialem Gewebe wurde ausgespart und für die nächsten Schritte nicht verwendet.

Unter Vorlage des markierten HE-Schnittes wurde nun auf korrespondierenden Leerschnitten das ausgewiesene Gewebe mit einer Skalpellklinge abgekratzt. Je nach Gewebeanteil wurden entsprechend viele Leerschnitte zur RNA-Isolierung verwendet.

2.6.3 RNA-Isolierung im QiaCube

Die RNA-Isolation erfolgte im QuaCube unter Verwendung des RNeasy FFPE-Kits und des RNeasy-FFPE-Aufreinigungsprotokolls [59].

Zusammengefasst wurde das unter Abschnitt 2.6.2 gewonnen Material für jede Probe in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einer Deparaffinierungslösung versetzt, gevortext und zentrifugiert. Anschließend folgte eine dreiminütige Inkubation bei 56°C. PKD-Puffer wurde zugegeben, nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren und jetzt erneut durch vortexen gemischt. Hiernach wurden die Proben für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert, wodurch sich eine untere, klare Phase bildete, zu der im nächsten Schritt 10µl Proteinase K gegeben wurde. Durch sanftes Auf-Ab-Pipettieren wurde das Material vermengt. Im nächsten Schritt wurde erneut bei 56°C für 15 min inkubiert, nun die Temperatur für weitere 15 min. auf 80°C angehoben. Die tiefere, farblose Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 3 min. auf Eis inkubiert. Nach einer letzten Zentrifugation bei 13500 rpm für 15 min wurde die Probe in den QiaCube überführt, wo die restlichen Schritte der RNA-Isolation über Spin-Columns vollautomatisch und standardisiert durchgeführt wurden.

Die Qualität und Reinheit der RNA wurde über ein Nanodrop Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse sind der *Tabelle 20* dem Anhang zu entnehmen.

2.6.4 nCounter System

2.6.4.1 Prinzip

Die NanoString nCounter-Technologie nutzt optische molekulare Barcodes, um individuelle mRNA-Transkripte zu markieren, die durch eine spezielle Nukleotidsequenz festgelegt sind. Eine hierzu komplementäre, paarige Sonde wird angelagert, die das Zielmolekül identifizieren, selektieren und fixieren kann:

Die paarig angelegten Markierungssonden (das „CodeSet“) bestehen dabei aus sogenannter *Reporter Probe* und *Capture Probe*.

- Die *Reporter Probe* trägt einen sechsteiligen, farbigen Barcode, dessen Zusammensetzung eine genaue Identifikation des markierten Ziels ermöglicht.
- Die *Capture Probe* trägt eine funktionelle Biotingruppe, die nicht-kovalent an eine Streptavidin-Platte bindet und ein Zielmolekül fixieren und immobilisieren kann.

Das Sondenpaar kann nun über die für das Zielmolekül spezifische Nukleotidsequenz direkt mit einem einzelsträngigen RNA-Molekül in Lösung hybridisieren.

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung richten sich die auf einer Streptavidin-Platte fixierten und markierten Komplexe in gleicher Richtung aus und können quantitativ anhand des Barcodes erfasst und mit einem Epifluoreszenzmikroskop ausgezählt werden [60].

2.6.4.2 nCounter Immunology Panel

Das NanoString nCounter System ist modular aufgebaut und erlaubt die Verwendung verschiedener Assays, um in Gewebe unterschiedliche Genprodukte zu erfassen. Im Folgenden verwendet wurde das nCounter Immunology Panel v2 (C2328), das es erlaubt, die Produkte von 594 verschiedenen menschlichen Genen zu quantifizieren (vgl. Genliste im Anhang *Tabelle 19*). Der Schwerpunkt liegt in dem gewählten Panel auf Genen, die insbesondere in immunologischen

Prozessen relevant sind und deren Produkte u.a. Zytokine, Interferone und zahlreiche Rezeptoren umfassen.

2.6.5 Hybridisierung

Verwendet wurde eluierte RNA, wie unter Kap. 2.6.3 beschrieben. Das Hybridisierungsprotokoll ist in *Tabelle 17* im Anhang hinterlegt.

2.6.6 Prep Station

In der Prep Station erfolgt durch vollautomatisches Pipettieren ein Flüssigkeitstransfer, die Probenauftrennung anhand der molekularen Barcodes und die Fixierung und Immobilisierung entlang einer Streptavidin-Platte. Bis zu 12 Proben können innerhalb von etwa 3 Stunden verarbeitet werden. Gewählt wurde das Protokoll für hohe Sensitivität „High Sensitivity Protocol“. Weitere Arbeitsabläufe wurden gemäß der im Nutzerhandbuch hinterlegten Anleitung durchgeführt [60].

2.6.7 Analyzer

Der digitale Analyzer ist ein Mehrkanal-Epifluoreszenzscanner zur Bildgebung der immobilisierten, durch fluoreszierende Barcodes markierten Proben. Über jeweils 280 Fields of View werden die zahlreichen (hunderte bis tausende) Reporter-Probes ausgezählt und die Rohdaten mit absoluten Zählwerten für jede Probe in einer RCC (Reporter Code Count) Datei gespeichert. Die RCC-Daten können über die proprietäre nSolver- Analysis Software weiter analysiert werden oder als CSV- (Comma Separated Values) Datei exportiert werden. Ein dritter Weg ist die Datenverarbeitung über Rosalind, wie sie für diese Arbeit gewählt wurde.

2.6.8 Verarbeitung der Rohdaten

Die weitere Datenverarbeitung erfolgte über Rosalind [58]. Es handelt sich hierbei um eine Cloud-basierte Plattform zur Analyse von Genexpressionsdaten. Eine Kooperation mit NanoString ermöglicht es, direkt mit den Rohdaten in Form der erstellten RCC-Dateien zu arbeiten, ohne auf die Nano-String eigene nSolver-Software zurückgreifen zu müssen. Ein großer Vorteil der Datenanalyse durch Rosalind ist die übersichtlich gegliederte und moderne graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse, die mögliche Zusammenhänge und Pathway-Analysen vereinfacht.

Die automatisierte Verarbeitung der Daten in Rosalind folgt dem nCounter® Advanced Analysis Protokoll zur Normalisierung der Genexpressionsdaten einer RCC-Analyse.

2.6.8.1 Normalisierung der Daten

Die Normalisierung der Rohdaten durch Rosalind erfolgt zum einen anhand von in der NanoString-Analyse mitgeführten Positivkontrolle in Form einer Verdünnungsreihe (POS_A bis POS_E), ferner über Referenzgene, die über den geNorm-Algorithmus des Bioconductor-Pakets NomqPCR ausgewählt werden [61]. Eine händische Implementierung in R ist nicht nötig. Die Normalisierung erfolgt jeweils über den geometrischen Mittelwert.

2.6.8.2 Statistische Analyse der Daten

Ziel ist es, den Effekt der chronischen Endometritis (definiert als > 2 Plasmazellen / 10 HPF) auf das Genexpressionsprofil endometrialer Schleimhaut zu analysieren, wobei durch die Auswahl

des nCounter Immunology-Panels der Schwerpunkt auf immunologisch relevante Gene gelegt wurde.

Die Nullhypothese (H_0) lautet hierbei, dass es keinen Unterschied der Genexpression zwischen chronisch entzündeter endometrialer Schleimhaut und entzündungsfreier endometrialer Schleimhaut gibt.

Die Gegenhypothese (H_1) lautet, dass es einen Unterschied der Genexpression zwischen chronisch entzündeter endometrialer Schleimhaut und entzündungsfreier endometrialer Schleimhaut gibt.

Die Analyse der Daten erfolgte gemäß NanoString-Vorgabe durch die Implementierung eines generalisierten linearen Modells unter der Annahme einer negativen binomialen Verteilung, umgesetzt in der `glm.nb` Funktion in R/MASS [62]. Hiermit wurden fold-change und p-Werte für jedes Gen ermittelt. Die adjustierten p-Werte wurden über die Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR) ermittelt.

2.6.8.3 Visualisierung der Daten

Die Visualisierung der Daten erfolgte über Rosalind. Für die Heatmaps der differentiell exprimierten Gene wurde dafür die PAM (Partitioning Around Medoids) Methode der `fpc-R`-Bibliothek verwendet [58, 63].

2.6.8.4 Weiterführende Datenexploration durch Pathway Enrichment Analysen

Um Genexpressionsdaten in den Kontext funktioneller biologischer Signalwege („Pathways“) zu setzen, kann die Methode einer Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) genutzt werden. Hierdurch werden biologische Signalwege identifiziert, die in einer Genliste stärker angereichert sind, als dies durch puren Zufall zu erwarten wäre [64]. Große und schwer überschaubare Genlisten, wie sie im Rahmen einer Expressionsanalyse erzeugt werden, können auf eine kompaktere Anzahl an Signalwegen reduziert werden, was eine biologisch relevante Interpretation eines Datensatzes vereinfacht.

Um die Anreicherung einer Genliste in einem Signalweg zu bestimmen, werden zwei Enrichment-Scores berechnet.

Der *Global Significance Score* (GSS) misst die zusammenfassende Signifikanz aller Veränderungen innerhalb eines Signalwegs und wird ausschließlich als positiver Wert angegeben. Der GSS misst lediglich ob, nicht jedoch, auf welche Weise, sich die Genexpression innerhalb eines Signalweges verändert. Der GSS gibt keine Aussage darüber, ob gemessene Veränderungen innerhalb eines Signalweges sinnhaft und funktionell kongruent sind.

Der *Directed Significance Score* (DSS) ähnelt dem GSS. Im Unterschied zu diesem misst der DSS jedoch nicht die generelle Tendenz eines Signalwegs, überexprimierte Gene zu beinhalten, sondern berücksichtigt, ob die Gene über- oder unterexprimiert sind. Der DSS kann somit Werte über als auch unter null umfassen.

Die Unterschiede beider Scores werden anhand eines Beispiels deutlicher. Für den Fall eines Signalwegs, der sowohl hoch- als auch runterregulierte Gene beinhaltet, würde der GSS hoch, der DSS nahe Null gehen. Beinhaltet ein Signalweg lediglich hoch- oder runterregulierte Gene, fallen GSS und DSS ident aus. Ein hoher Signifikanzscore ist Anhalt für höhere Relevanz eines Signalwegs.

Über Rosalind ist eine GSEA-Analyse gemäß des NanoString-Algorithmus, wie sie im NanoString Benutzerhandbuch hinterlegt ist, möglich [62].

Die angebotene Pathway-Exploration umfasst neben der NanoString-Annotation u.a. WikiPathways, BioPlanet, MSigDB Pathway Collection.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 CD138⁺ Plasmazellen

In 102 Proben wurden zwischen 0 und 36 Plasmazellen in 10 HPF gezählt. Der statistische Mittelwert an CD138⁺ Plasmazellen auf 10 HPF betrug 2,28, der Median 0. Es fand sich ein Minimum von 0 und ein Maximum von 36 Plasmazellen pro 10 HPF (*Abbildung 8, Abbildung 9*).

In einem Großteil der Fälle (75,53%) fand sich maximal eine Plasmazelle.

Die Daten zur Prävalenz der chronischen Endometritis variieren in Abhängigkeit des zugrundeliegenden Diagnosekriteriums stark (vgl. Kap. 1.3.2, *Tabelle 11*). Die Diagnose einer chronischen Endometritis wurde in dieser Studie bei einem Diagnoseschwellenwert von mindestens 2 CD138⁺ PZ/10HPF gestellt und konnte an 27 Proben gestellt werden. Die Prävalenz der chronischen Endometritis betrug im Probenkollektiv somit 26,5%. Ein ausgeprägtes Plasmazellinfiltrat von über fünf CD138⁺/10 HPF zeigte sich in 10,78% der Fälle.

Legt man als Diagnosekriterium für eine chronische Endometritis den Nachweis bereits einer einzelnen Plasmazelle zugrunde, steigt die Prävalenz auf 42,2%. Wird hingegen ein strengerer Grenzwert von mindestens 5 Plasmazellen/10HPF genutzt, sinkt die Prävalenz auf 12,8% (vgl. *Tabelle 3*).

Tabelle 3: CE Prävalenz in Abhängigkeit des PZ-Infiltrats

Diagnosekriterium	≥ 1 PZ/10HPF	≥ 2 PZ/10HPF	≥ 5 PZ/10HPF
Prävalenz	42,2%	26,5%	12,8%

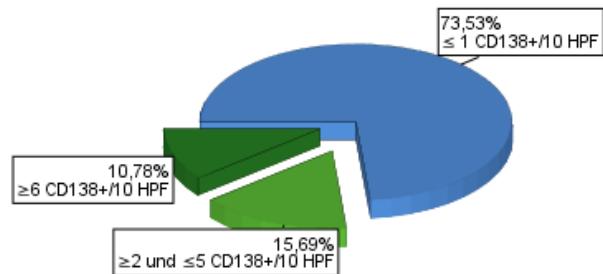


Abbildung 8: Klassierte Verteilung des Plasmazellinfiltrats

Eine statistisch auf dem 0,05-Niveau signifikante zweiseitige Korrelation nach Spearman von 0,04 mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,2 bestand zwischen den Klassen des Plasmazellinfiltrates und der Anzahl CD8⁺ T-Lymphozyten (vgl. *Tabelle 4*).

Eine Korrelation zwischen Plasmazellinfiltrat und CD56⁺ uNK-Zellen oder dem Patientenalter bestand nicht (vgl. *Tabelle 5*).

Auch eine Korrelation zwischen klassiertem Plasmazellinfiltrat und Zyklusphase ließ sich nicht erweisen (asymptotische zweiseitige Signifikanz von 0,083 im Chi-Quadrat nach Pearson).

Tabelle 4: Korrelation des klassierten Plasmazellinfiltrats mit der Anzahl CD8⁺ T-Lymphozyten auf 10 HPF

		CD138-Klasse	CD8 ⁺ in 10 HPF
Spearman-Rho	CD138-Klasse	Korrelationskoeffizient	1,000
		Sig. (2-seitig)	0,040
	CD8 ⁺ in 10 HPF	N	102
		Korrelationskoeffizient	0,203
		Sig. (2-seitig)	0,040
		N	102

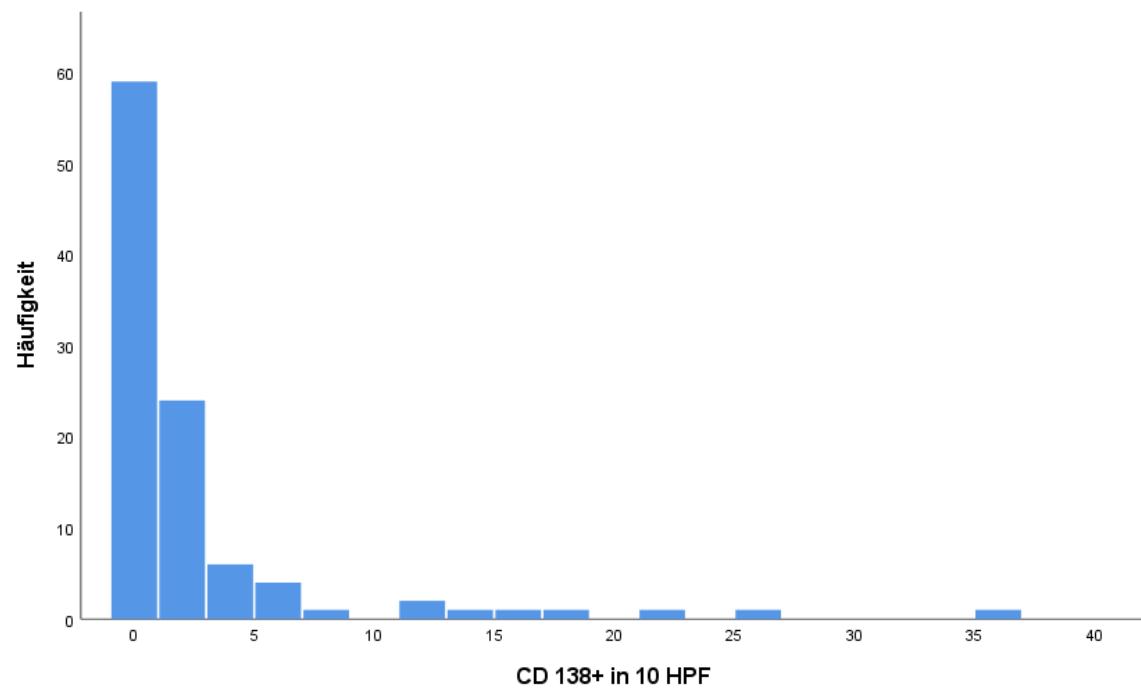


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung des Plasmazellinfiltrats

Tabelle 5 Korrelation des klassierten Plasmazellinfiltrats mit der Anzahl CD56⁺ NK-Zellen/HPF und dem Alter

			CD138-Klasse	CD56/HPF	Alter
Spe- arman- Rho	CD138- Klasse	Korrelationskoef- fizient	1,000	0,137	-0,077
		Sig. (2-seitig)		0,170	0,441
		N	102	102	102
	CD56 ⁺ pro HPF	Korrelationskoef- fizient	0,137	1,0	-0,014
		Sig. (2-seitig)	0,170		0,889
		N	102	102	102
	Alter	Korrelationskoef- fizient	-0,077	-0,014	1,000
		Sig. (2-seitig)	0,441	0,889	
		N	102	102	102

3.1.2 CD56⁺ uterine NK-Zellen

In 102 Proben wurde eine uNK-Zelldichte von mindestens 0 und maximal 166 pro repräsentatives HPF ermittelt. Der Mittelwert betrug 25,99, der Median 20.

Ein Großteil der Fälle ließ sich den beiden ersten Klassen zuordnen, die eine uNK-Zelldichte von 0 – 19 (45,10%) und 20 – 36 (35,29%) abbildeten. Nur insgesamt 19,61% der Fälle zeigten eine höhere uNK-Zellzahl und wurden den Klassen von 40 – 59 (12,75 %) und ≥ 60 (6,86%) zugeordnet (*Abbildung 10*, absolute Häufigkeitsverteilung in *Abbildung 11*). Ein Darstellung des entsprechenden histologischen Bildes zeigt *Abbildung 12*.

Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen absolutem uNK-Zellgehalt und Plasmazellgehalt (0,06), CD8⁺ T-Zellgehalt (0,094) oder dem Patientinnenalter (0,56)⁹.

Auch die Gegenüberstellung des uNK-Zellgehaltes mit der Zyklusphase erbrachte keine statistisch signifikante Korrelation (zweiseitig asymptotische Signifikanz nach Pearson 0,003 im Chi-Quadrat Test).

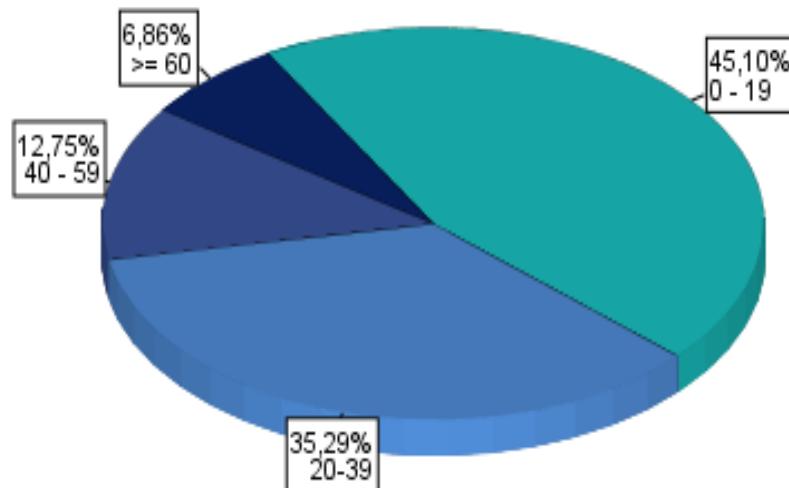


Abbildung 10: Klassierte Verteilung des uNK-Zellbesatzes. Absolute Werte bezeichnen CD56⁺ uNK-Zellen/HPF

⁹ In Klammern angegebene Werte entsprechen der Pearson-Korrelation

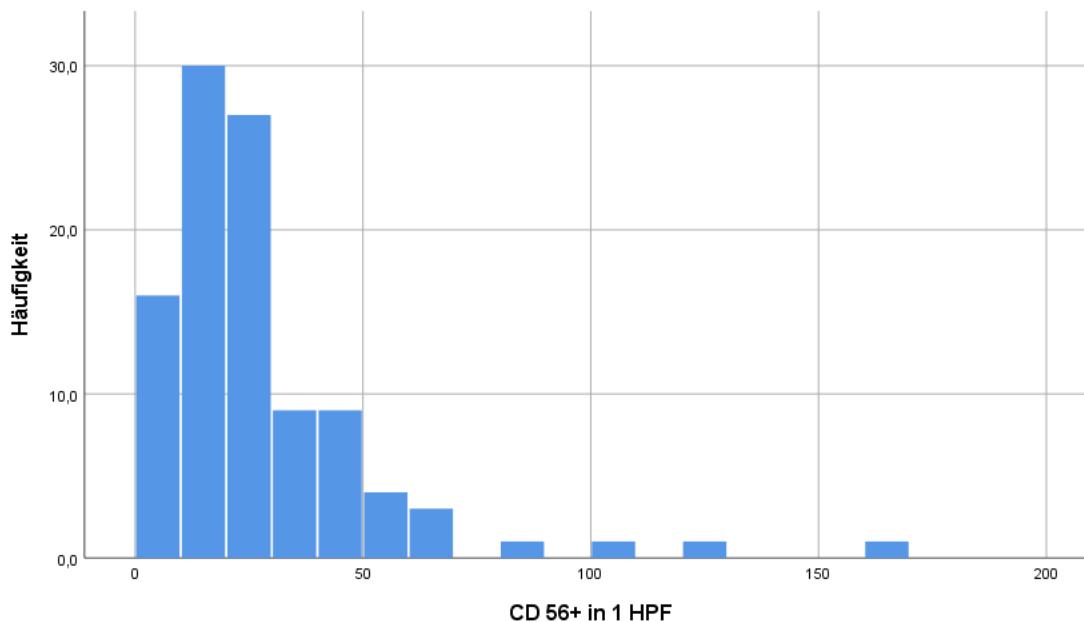


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung CD56+ uNK-Zellen pro HPF

Beschränkt man sich bei der Betrachtung der *Tabelle 6* auf die unterschiedlichen Ausprägungen des uNK-Zellgehaltes zwischen Proliferations- und Sekretionsphase, erkennt man hier zumindest einen Trend, in dem eine hohe oder sehr hohe Zelldichte in 62,8% der Fälle in der Sekretionsphase, jedoch nur in 41,3% der Proben aus der Proliferationsphase gefunden wurden. Entsprechend findet man eine geringe oder mäßige uNK-Zelldichte in einem Großteil (58,7%) der Fälle in der Proliferationsphase, während dies nur in einer Minderheit der Fälle (37,2%) in der Sekretionsphase vorkommt.

Auch wenn die erhobenen Werte keine signifikante Korrelation zwischen Zyklusphase und uNK-Zellgehalt zulassen, illustrieren sie die Beobachtung, dass mit fortschreitendem Zyklus ein tendenziell höherer uNK-Zellgehalt vorliegt.

Tabelle 6: Kreuztabelle der klassierten uNK-Zelldichte und der Zyklusphase

		Proliferationsphase	Sekretionsphase	Abbruchblutung	Funktionsarm	Funktionell unregelm.	Gesamt
uNK-Zell-dichte/HPF	Gering	16	6	0	0	2	24
	Mäßig	11	10	0	0	2	23
	Hoch	12	15	1	0	1	29
	Sehr hoch	7	12	1	1	5	26
Gesamt		46	43	2	1	10	102

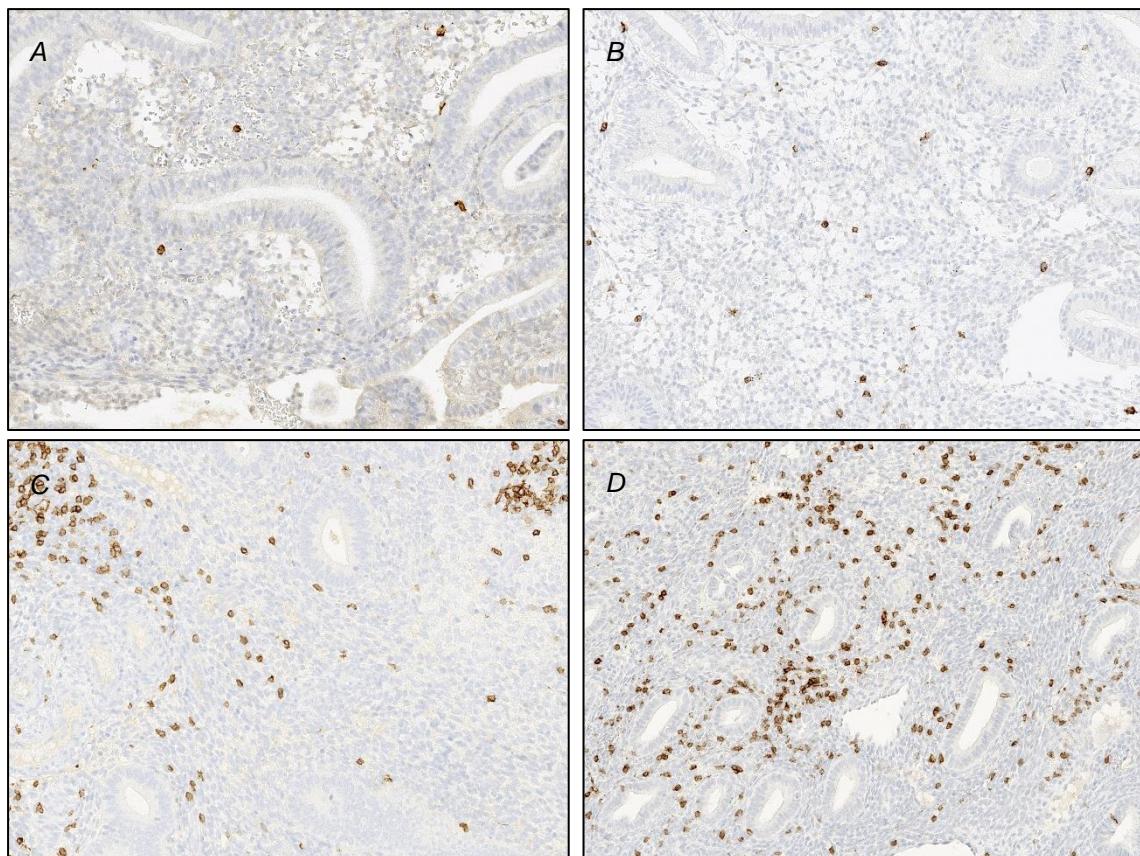


Abbildung 12: CD56, klassiert

Repräsentative Abbildungen, jeweils bei 40x Vergrößerung. Immunhistochemie für CD56, jeweils 400x. In (A) geringe, in (B) mittlere, in (C) hohe und in (D) sehr hohe uNK-Zelldichte.

3.1.3 CD8⁺ zytotoxische T-Zellen

In 102 Proben wurden auf zehn ausgezählten HPF mindestens 26 und maximal 683 CD8⁺ T-Lymphozyten gezählt. Der Mittelwert lag bei 164,4, der Median bei 124,2.

Ähnlich der Verteilung der uNK-Zellen ließ sich ein Großteil der Fälle den beiden ersten Klassen zuordnen, die Zellzahlen von 0 – 100 (35,29%) und 101 – 200 (33,33%) abbildeten. 19,61% der Proben zeigte eine hohe (201 – 300), 11,76% eine sehr hohe (> 300) Zellzahl (Abbildung 13).

Wie unter Abschnitt 2.5.5 erläutert, konnte eine statistisch auf dem 0,05-Niveau signifikante zwei-seitige Korrelation nach Spearman von 0,40 zwischen den definierten Klassen des Plasmazellinfiltrates und der Anzahl CD8⁺ T-Lymphozyten demonstriert werden.

Eine graphische Darstellung der absoluten Zählwerte ist in Abbildung 14 gezeigt, das histologische Bild der verschiedenen Klassen in Abbildung 15.

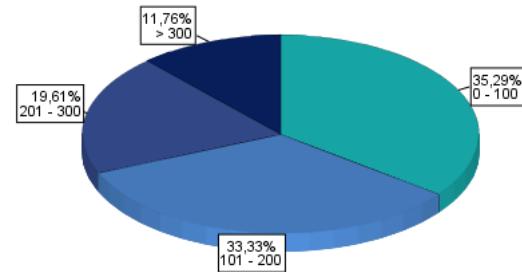


Abbildung 13: Klassierte Darstellung der CD8⁺ Zelldichte pro 10 HPF

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen CD8⁺ T-Zellgehalt und Alter, Zyklusphase oder uNK-Zellgehalt lag nicht vor.

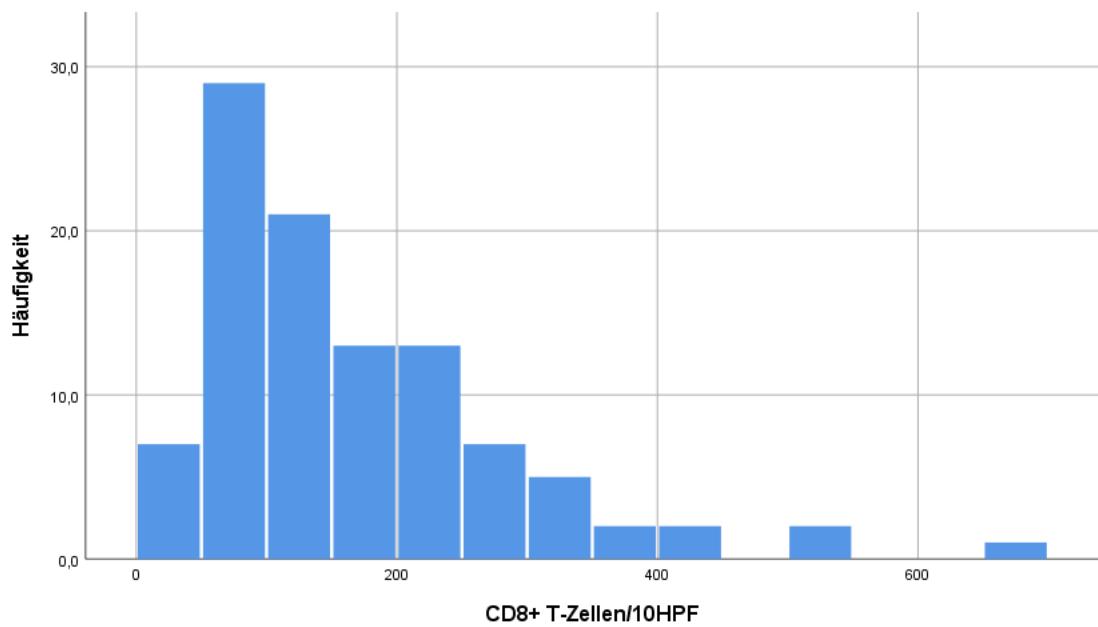


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung CD8⁺ T-Zellen auf 10 HPF

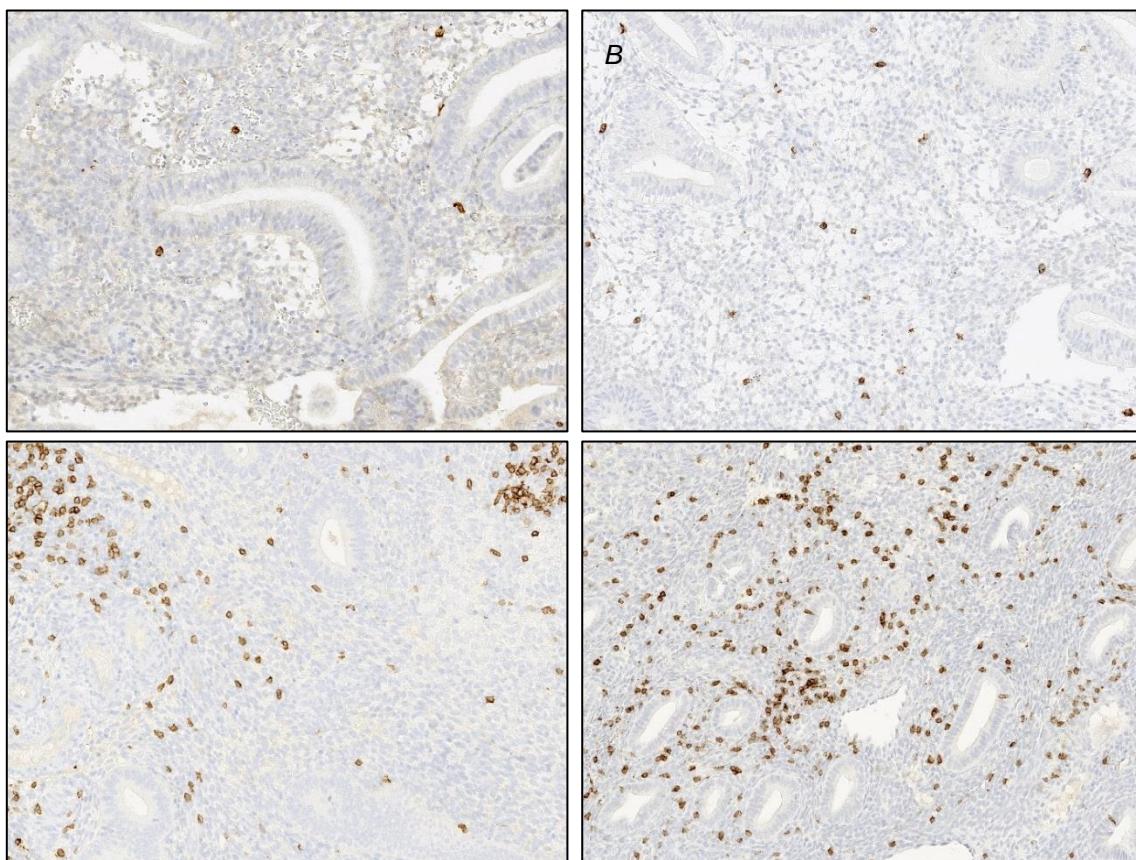


Abbildung 15: CD8, klassiert. Repräsentative Abbildungen der verschiedenen Klassen bei 400x Vergrößerung. In (A) geringe, in (B) mittlere, in (C) hohe und in (D) sehr hohe CD8-Zelldichte.

3.2 Ergebnisse aus der Expressionsanalyse

Die Intention der Genexpressionsanalyse war es, den Effekt der Diagnose einer chronischen Endometritis (definiert als > 2 Plasmazellen / 10 HPF) auf das Genexpressionsprofil endometrialer Schleimhaut zu explorieren. Zwei Gruppen von je 12 Endometriumsbiopsien (histologisch gesicherte chronische Endometritis bei unerfülltem Kinderwunsch vs. entzündungsfreie Normal-schleimhaut) wurden gegenübergestellt und signifikant differentiell exprimierte Gene identifiziert.

Das Kollektiv der chronischen Endometritis umfasste hierbei einen unterschiedlich ausgeprägten Plasmazellbesatz, wie *Tabelle 7* zu entnehmen ist.

In den folgenden Abbildungen und Tabellen mit dem Kürzel „CTRL“ präfigiert sind die Proben der Kontrollgruppe, „POS“ bezeichnet das Kollektiv der chronischen Endometritiden.

Tabelle 7: Plasmazelldichte der Probenkollektive für die Genexpressionsanalyse

CE-Gruppe	PZ/10HPF	Kontrollgruppe	PZ/10HPF
POS1	36	CTRL1	0
POS2	21	CTRL2	0
POS3	17	CTRL3	0
POS4	15	CTRL4	0
POS5	7	CTRL5	0
POS6	7	CTRL6	0
POS7	5	CTRL7	0
POS8	6	CTRL8	0
POS9	3	CTRL9	0
POS10	3	CTRL10	0
POS11	3	CTRL11	0
POS12	4	CTRL12	0

Die NanoString Analyse wurde gewählt, da sie für FFPE-Proben gut geeignet ist und keine Genamplifikation mittels PCR benötigt, wodurch die Verfälschung der Expressionsergebnisse durch eine exponentielle Amplifikation verhindert wird.

3.2.1 Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten

Entscheidend für die weitere Verarbeitung von Daten einer Genexpressionsanalyse ist die initiale Qualitätskontrolle. Die Normalisierung der Rohdaten (sog. RCC-Daten) erfolgte – wie unter Kap. 2.6.8.1 beschrieben – anhand endogener und exogener Positivkontrollen (vgl. *Abbildung 16*). Die Errechnung von fold-changes und p-Werten erfolgte gemäß der NanoString-Vorgaben.

Eine graphische Darstellung der normalisierten Daten durch einen Violin-Plot ist in *Abbildung 18* gezeigt. Eine etwa gleiche Höhe der unterschiedlichen Violin-Plots aller 24 Proben ist Anhalt für eine erfolgreiche Normalisierung.

Eine Heatmap der normalisierten Daten ist in *Abbildung 19* dargestellt. Eine klare Auf trennung der Proben anhand der normalisierten Zählwerte aller Gene durch hierarchisches clustering gelingt nicht.

Illustriert wird dies in der graphischen Darstellung durch einen Multidimensional Scaling Plot, einer visuellen Repräsentation von Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Objekten (*Abbildung 17*). Die Expressionsunterschiede der 24 eingesetzten Proben ergeben ein ungeordnetes Bild, in dem klare Gruppierungen nicht augenfällig werden.

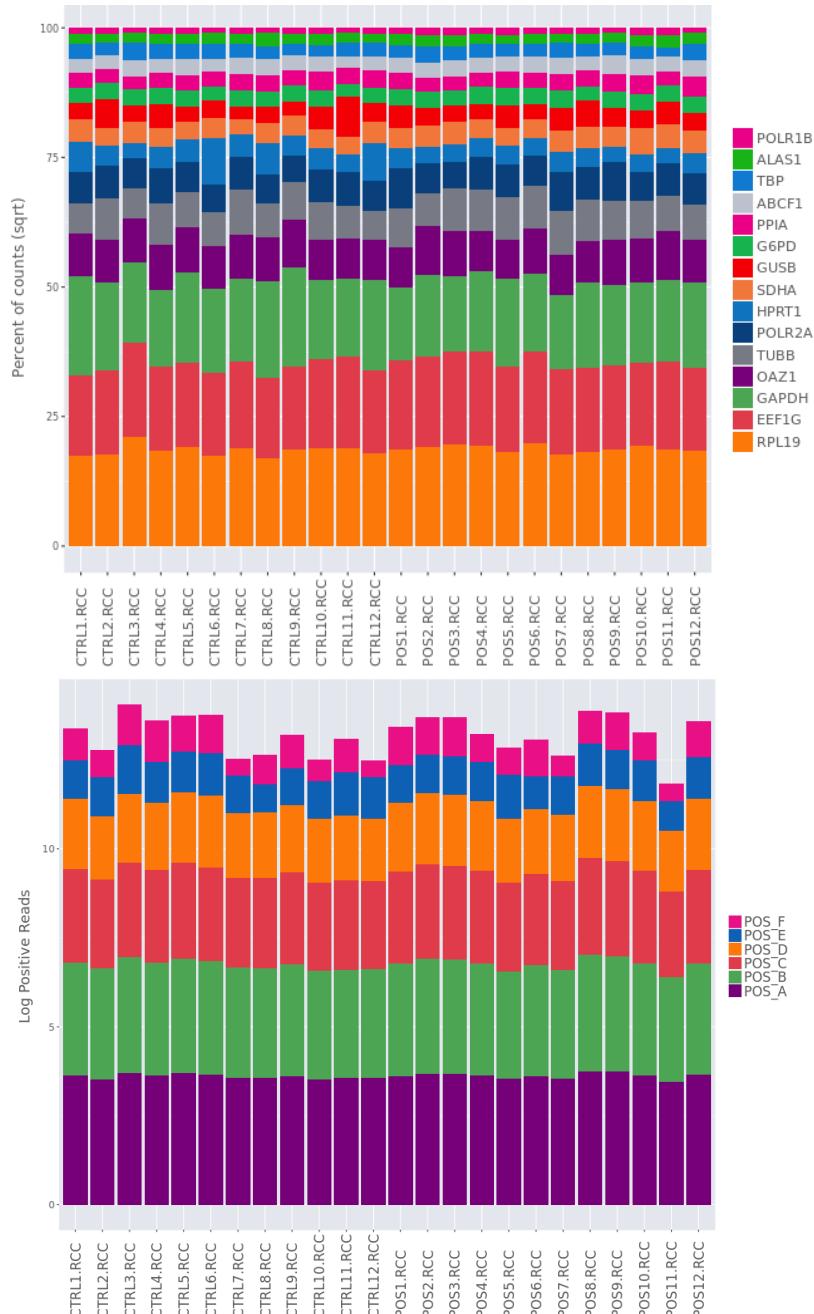


Abbildung 16: Zählwerte der Housekeeper-Gene (oben) als Quadratwurzel des Expressionsniveaus, um niedrigere Zählwerte abzubilden. Log10-transformierte Zählwerte der exogenen Positionskontrolle aller Proben (unten).

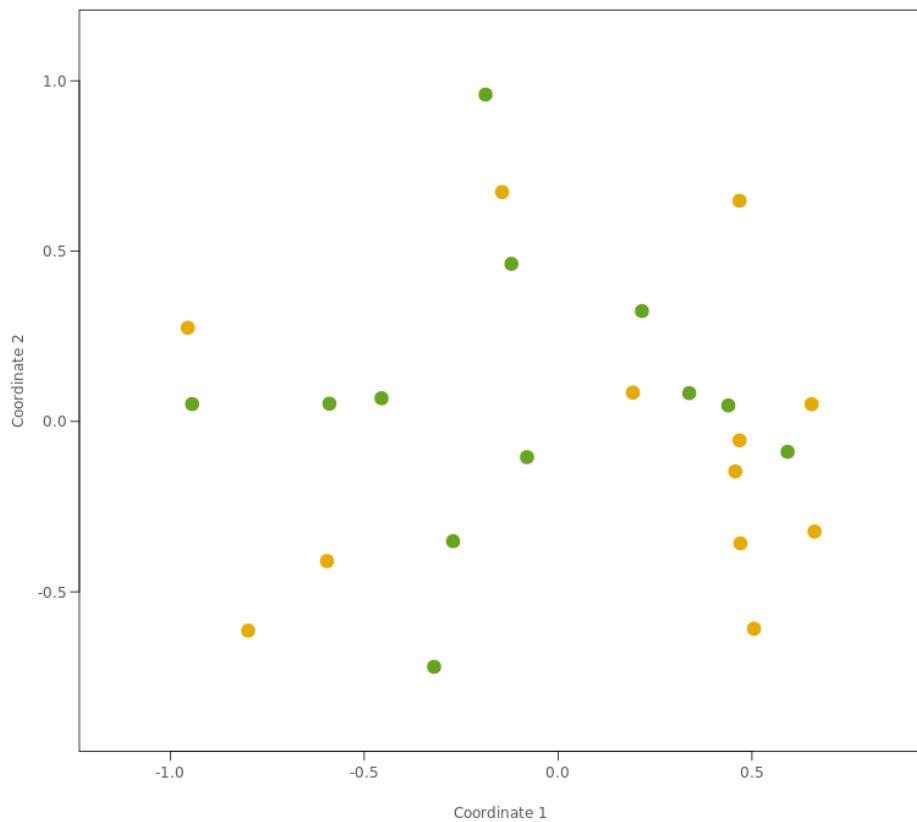


Abbildung 17: Multidimensional Scaling Plot, in dem mit gelb die Proben des Kontrollkollektivs, mit grün die Proben des chronische-Endometritis-Kollektivs dargestellt sind.

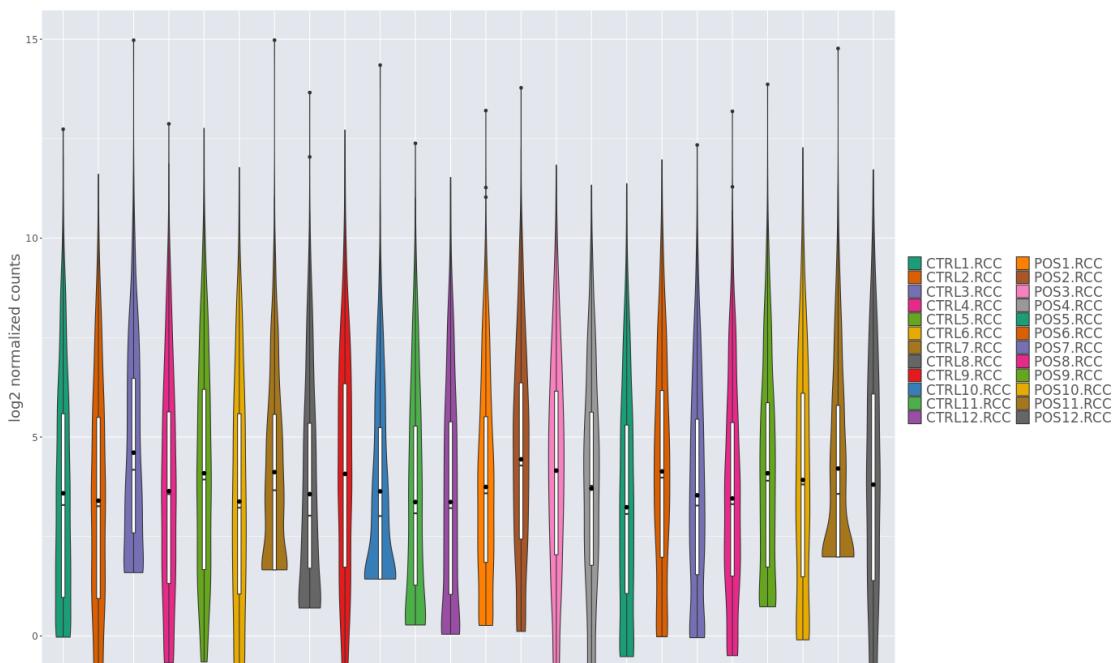


Abbildung 18: Violin-Plot-Darstellung der Datensätze nach erfolgreicher Normalisierung mit vergleichbarer Höhe.

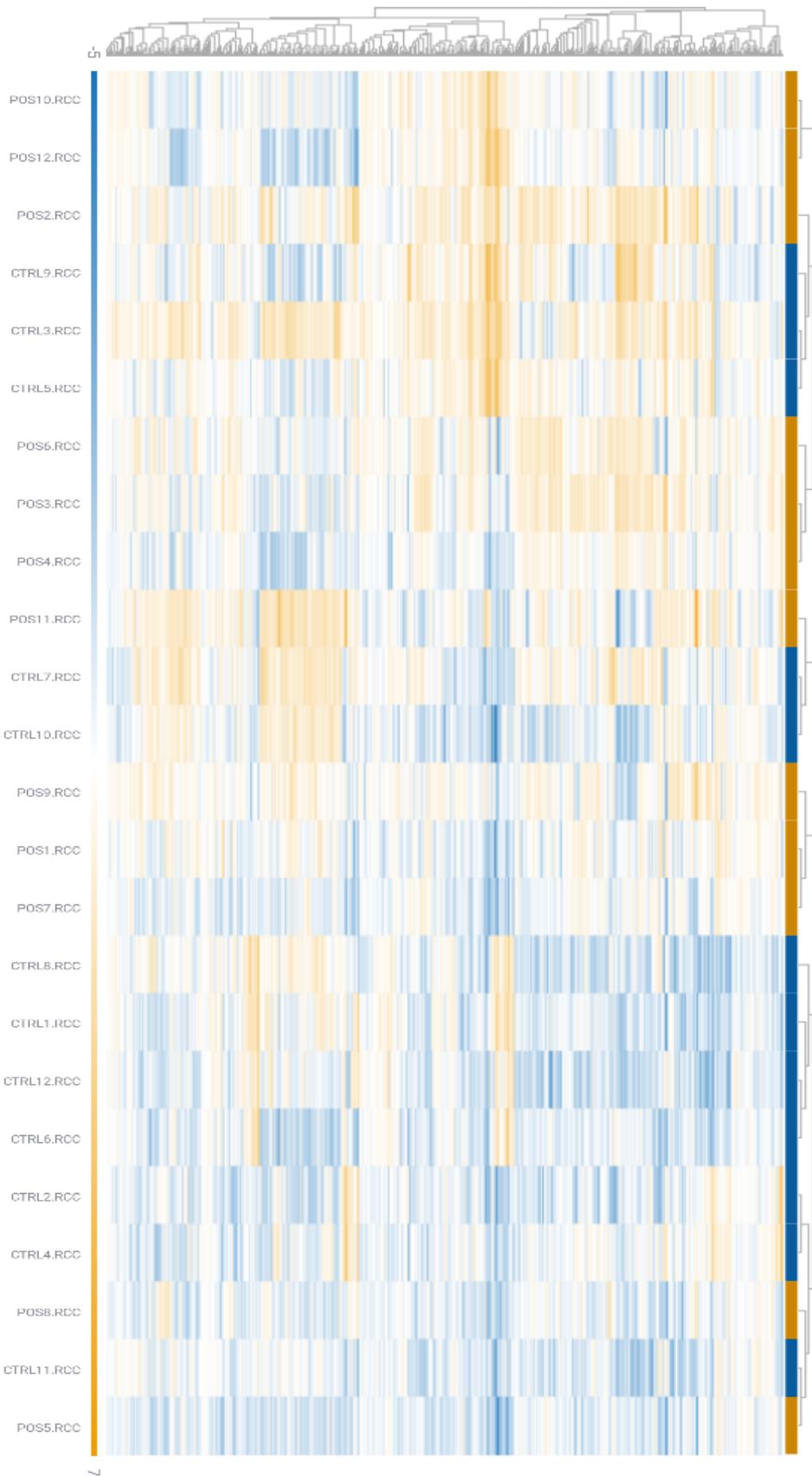


Abbildung 19: Heatmap aller 24 Proben (gelb: CE-Gruppe, blau: Kontrollgruppe) und aller untersuchten Gene

3.2.2 Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse

Wie in Abschnitt 2.6.8.2 beschrieben, erfolgte die weitere Verarbeitung der normalisierten Daten in Rosalind unter der Annahme einer negativen binomialen Verteilung, wonach fold-changes, p-Werte und der adjustierte p-Wert (gemäß Benjamini-Hochberg) berechnet wurden.

Insgesamt sind vier Gene auf einem Signifikanzniveau von <0,05 des adjustierten p-Wertes (p-Adj.) zwischen der CE-Gruppe und der Kontrollgruppe differentiell exprimiert (*Tabelle 8*).

Signifikant überexprimiert wurden LCK¹⁰: Eine Tyrosinkinase der Src-Familie (p-Adj: 0,04, log2 Fold Change: 1,44), PTAFR¹¹: Ein G-Protein gekoppelter Rezeptor der Plättchenaktivierung (p-Adj: 0,04, log2 Fold Change: 1,75), IKBKE¹²: Eine nichtkanonische I-Kappa-B Kinase in der Regulation antiviraler Signalwege (p-Adj: 0,01, log2 Fold Change: 0,86).

Signifikant unterexprimiert wurde HLA-DOB¹³, Teil eines Heterodimers des HLA Klasse II beta-Ketten Paralogs, exprimiert an Antigen-präsentierenden Zellen (p-Adj: 0,04, log2 Fold Change: -3,01).

Tabelle 8: Differentiell exprimierte Gene nach FDR-Korrektur, Vergleich CE- und Kontrollgruppe

Gen	Fold Change	Log2 Fold Change	Adjustierter p-Wert
LCK	2,71	1,44	0,04
PTAFR	3,36	1,75	0,04
IKBKE	1,81	0,86	0,01
HLA-DOB	-8,05	-3,01	0,04

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse wurden für die Erstellung einer Heatmap verwendet (*Abbildung 20*). Es ergibt sich hierbei eine Hierarchie, in der zwei große Gruppen in zahlreiche Subgruppen unterteilt werden. Eine Gruppe umfasst überwiegend Proben des Kontrollkollektivs (88%), die andere Gruppe bildet zu einem Großteil Proben mit chronischer Endometritis ab (73%).

¹⁰ Synonyme: lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase, IMD22, leukocyte C-terminal Src kinase

¹¹ Platelet activating factor receptor

¹² Synonyme: Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon, IKK-E

¹³ Synonyme: Major histocompatibility complex class II, DO beta, MHC Klasse II Antigen DOB

Die Expressionsunterschiede aller untersuchten Gene wurden mithilfe eines Volcano-Plots visualisiert (Abbildung 21). Auf der Y-Achse wird der negative Logarithmus zur Basis 10 der adjustierten p-Werte aufgetragen. Hoch signifikante, niedrige p-Werte erscheinen somit im oberen Teil des Plots und sind einfach identifizierbar. Auf der X-Achse wird der logarithmierte Fold Change zwischen den Gruppen „CE“ und „Kontrolle“ aufgetragen. Jedes Gen wird durch einen Punkt symbolisiert. Drei Gene mit einem Fold Change über 0,5 und einem p-Adj von unter 5% sind zu erkennen (grüne Punkte), ein Gen mit einem Fold Change unter -0,5

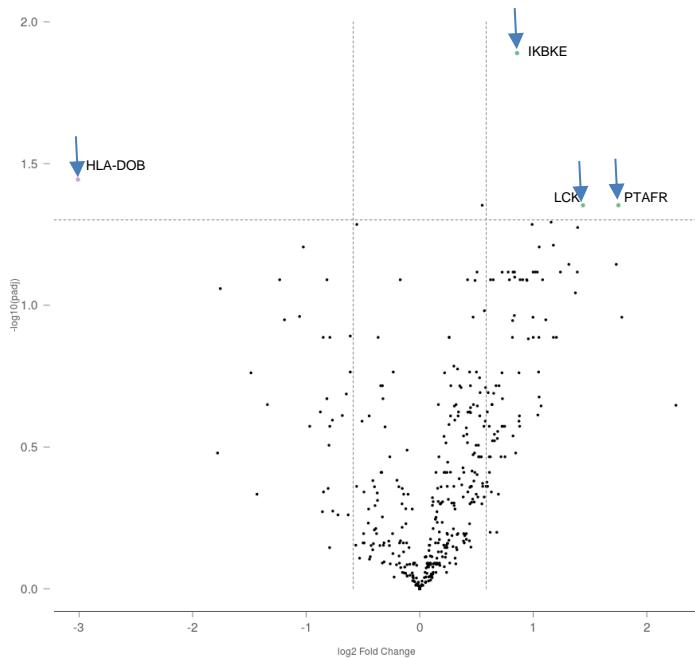


Abbildung 21: Volcano Plot der differentiellen Expressionsanalyse, Vergleich CE ($n=12$) mit Kontrolle ($n=12$)

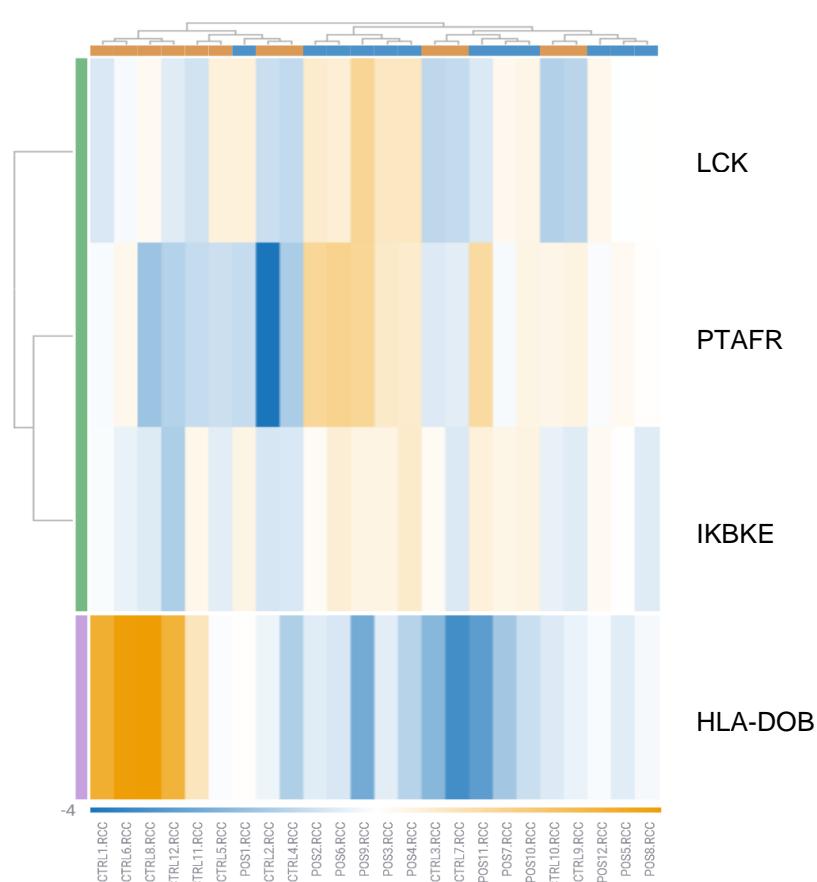


Abbildung 20: Heatmap nach differentieller Genexpressionsanalyse, hierarchisches Clustering von Zeilen und Spalten

und einem p-Adj von unter 5% (lila Punkt).

3.2.3 Gene Set Analyse

Um einen möglichen Effekt der chronischen Endometritis auf funktionelle biologische Signalwege zu explorieren, wurde über Rosalind anhand der im NanoString-Manual hinterlegten Vorgaben eine Gene Set Analyse durchgeführt und für die hierfür etablierten Signalwege jeweils der globale und gerichtete globale Signifikanz-Score errechnet.

Der globale Signifikanzscore misst allgemeine Signifikanzveränderungen eines Gen-Sets innerhalb eines Signalwegs, ohne zu berücksichtigen, ob eine Über- oder Unterexpression vorliegt. Es resultiert ein stets positiver Wert, der Ausdruck einer Summe von signifikanten Expressionsunterschieden darstellt und bildet damit die Tendenz eines Signalweges, differenziell exprimierte Gene zu beinhalten, ab.

Der gerichtete globale Signifikanzscore berücksichtigt das Vorzeichen differenziell exprimierter Gene und gibt somit Auskunft zur Über- oder Unterexpression von Genen innerhalb eines Signalwegs. Er kann deshalb auch negative Werte annehmen, da hier (anders als beim globalen Signifikanzscore) auch das Vorzeichen der differenziell exprimierten Werte berücksichtigt wird (vgl 2.6.8.4).

Je höher der Signifikanzscore, desto ausgeprägter sind die Expressionsveränderungen innerhalb eines Signalwegs.

Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der Pathway-Analyse über die NanoString Annotationen zusammen. Aufgeführt sind alle hierin erfassten 32 Pathways, mit einem DSS zwischen 2.1805 und -1.2236 sowie einem GSS zwischen 2.5344 und 1.1672. Die Signalwege umfassen zwischen 259 und 8 Gene.

Tabelle 9: Tabellarisches Resultat der Gene Set Analyse. DSS: gerichteter globaler Signifikanzscor, GSS: Globaler Signifikanzscore, Genzahl: Anzahl an Genen des Signalwegs.

Signalweg	DSS	GSS	Genzahl
TGF-b Signaling	2.1805	2.1947	9
Treg Differentiation	2.0209	2.0774	10
Th2 Differentiation	1.8897	1.8897	17
Inflammasomes	1.8825	1.8825	8
MHC Class II Antigen Presentation	1.7121	2.5344	14
Type II Interferon Signaling	1.6635	1.7749	36
Cell Adhesion	1.5593	1.9777	56
Lymphocyte Activation	1.4496	1.6635	241
Transcriptional Regulation	1.4186	1.7873	53
Th17 Differentiation	1.4059	1.6978	31
Host-pathogen Interaction	1.3471	1.7598	252

Th1 Differentiation	1.3247	1.6507	14
Cytokine Signaling	1.3228	1.7453	259
TNF Family Signaling	1.3148	1.4856	49
NLR signaling	1.3115	1.6054	64
TLR Signaling	1.2456	1.5803	73
Chemokine Signaling	1.2268	1.4615	63
Type I Interferon Signaling	1.2171	1.5399	28
Lymphocyte Trafficking	1.2146	1.3554	21
Hemostasis	1.2047	1.7751	73
Phagocytosis and Degradation	1.1773	1.9412	48
Complement System	1.1168	1.7504	39
T Cell Receptor Signaling	1.0867	1.7681	57
Innate Immune System	1.0403	1.5968	199
Adaptive Immune System	0.9821	1.7063	137
Apoptosis	0.8189	1.585	54
Oxidative Stress	0.744	1.7456	36
NF-kB Signaling	0.5956	1.5188	62
Autophagy	-0.1043	1.1672	11
MHC Class I Antigen Presentation	-0.7531	1.6281	39
B cell Receptor Signaling	-0.9394	1.4862	35
Immunometabolism	-1.2236	1.6255	32

3.2.4 Alternativer Untersuchungsansatz: Vergleichende Expressionsanalyse der vier fulminantesten Endometritisproben

Die bislang vorgestellten Ergebnisse zeigen Genexpressionsunterschiede zwischen 12 Proben histologisch entzündungsfreier endometrialer Schleimhaut und 12 Proben mit histologisch gesicherter chronischer Endometritis unterschiedlicher Ausprägung.

Vier differentiell exprimierte Gene wurden identifiziert, die eine Aufteilung der Proben in zwei Gruppen erlaubte, von denen eine ganz überwiegend (zu 88%) aus Proben des Kontrollkollektivs bestand, die andere überwiegend (zu 73%) aus Proben der CE-Kohorte (*Abbildung 20*).

Das Probenkollektiv der CE-Kohorte bildete dabei unterschiedlich ausgeprägte Plasmazellinfiltrate in einem Spektrum von 3 bis 36 Plasmazellen pro 10 HPF ab.

Unter der Fragestellung, ob ein isolierter Vergleich der vier ausgeprägtesten CE-Proben (POS1 bis POS4) gegen das Kontrollkollektiv einen schärferen Kontrast in der differentiellen Genexpressionsanalyse zeigen würde, wurde ein zweiter Untersuchungslauf durchgeführt.

In der Gegenüberstellung der vier ausgeprägtesten Fälle chronischer Endometritis (POS1 bis POS4) zu der Kontrollgruppe (CTRL 1 bis CTRL 12) finden sich 70 differentiell exprimierte Gene, hierunter LCK, HLA-DOB und IKBE, nicht jedoch PTAFR (adjustierter p-Wert: 1,0). 13 Gene werden signifikant unter- 57 signifikant überexprimiert (vgl. Volcano-Plot, Abbildung 22 und Tabelle 9 als auch Tabelle 18 im Anhang).

Die Clusterbildung der generierten Heatmap (Abbildung 23) ist deutlich weniger präzise als in der Voruntersuchung. Zwei große Gruppen werden gebildet, von denen eine lediglich vier Proben (sämtlich aus dem Kontrollkollektiv), die zweite zwölf (acht weitere Proben des Kontrollkollektivs und die vier CE-Proben) umfasst.

Es gelingt demnach auf Ebene der differentiell exprimierten Gene keine klarere Gruppenbildung als in der Voruntersuchung (vgl. mit Heatmap in Abbildung 20 und den Ergebnissen aus Kap. 3.2.2).

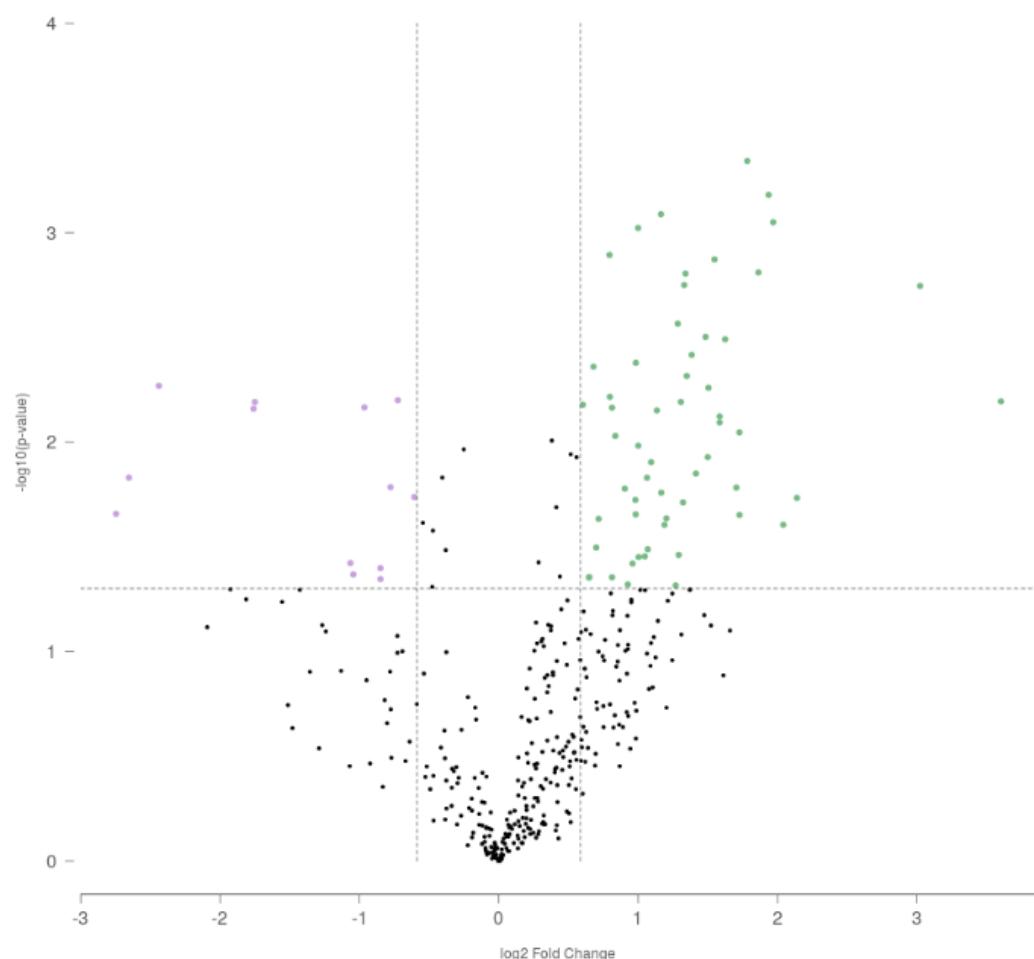


Abbildung 22 Volcano Plot der differentiellen Expressionsanalyse, Vergleich ausgeprägte CE (n=4) mit Kontrolle (n=12)

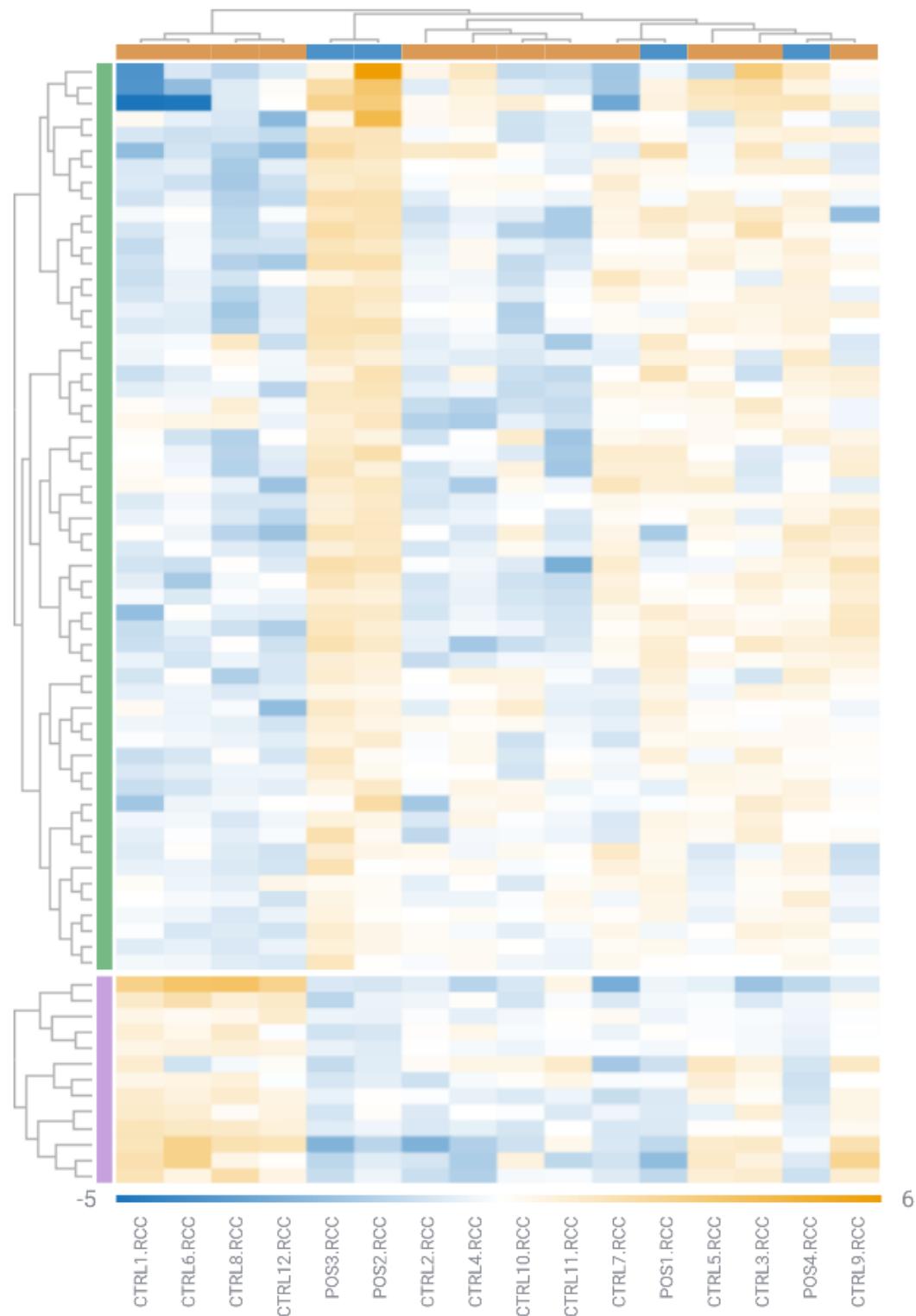


Abbildung 23: Vergleich ausgeprägte chronische Endometritis ($n=4$) mit Kontrolle ($n=12$). Heatmap nach differentieller Genexpressionsanalyse, hierarchisches Clustering von Zeilen und Spalten.

Tabelle 10: Differentiell exprimierte Gene nach FDR-Korrektur, Vergleich ausgeprägte CE- und Kontrollgruppe. Hervorgehobene Gene in der Voruntersuchung differentiell exprimiert (Kap. 3.2.2)

Gen	Fold Change	Log2 Fold Change	Adjustierter p-Wert
CD8A	3,44	1,78	4,55e-4
CD27	3,83	1,94	6,59e-4
MAF	2,24	1,16	8,16e-4
LCK	3,91	1,97	8,91e-4
IKBKE	2,00	1,00	9,50e-4
NFKB2	1,73	0,79	1,28e-3
HLA-DRB3	2,92	1,55	1,34e-3
CR1	3,64	1,86	1,55e-3
CCL5	2,53	1,34	1,57e-3
IRF4	8,13	3,02	1,79e-3
CD74	2,44	1,28	2,72e-3
HLA-DPA1	2,80	1,48	3,14e-3
FCGR2B	3,08	1,62	3,23e-3
PRDM1	2,61	1,39	3,83e-3
C1QA1	1,98	0,98	4,18e-3
TGFB1	1,60	0,68	4,36e-3
CD45R0	2,55	1,35	4,83e-3
CD36	-5,43	-2,44	5,38e-3
HLA-DRA	2,84	1,5	5,50e-3
PDGFRB	1,74	0,80	6,07e-3
PSMD7	-1,65	-0,72	6,31e-3
LTF	12,16	3,60	6,38e-3
KIT	2,48	1,31	6,42e-3
DEFB1	-3,36	-1,75	6,43e-3
FCGRT	1,52	0,60	6,64e-3
CEACAM1	-1,95	-0,96	6,82e-3
STAT5B	1,76	0,81	6,84e-3
RORC	-3,39	-1,76	6,93e-3
MAP4K1	2,20	1,13	7,06e-3

ITGAL	3,00	1,58	7,54e-3
CLEC7A	3,00	1,58	8,05e-3
IKZF3	3,31	1,73	8,98e-3
CLEC4A	1,79	0,84	9,34e-3
C7	-6,29	2,65	0,01
CCR5	2,83	1,50	0,01
SLAMF7	2,67	1,42	0,01
ENTPD1	2,13	1,09	0,01
LAIR1	2,09	1,06	0,01
TCF4	2,00	1,00	0,01
HLA-DOB	-6,71	-2,75	0,02
HLA-DQB1	4,41	2,14	0,02
HLA-DQA1	4,12	2,04	0,02
IL7R	3,31	1,73	0,02
GZMK	3,26	1,70	0,02
CD45RA	2,50	1,32	0,02
PTPN22	2,30	1,20	0,02
COSH	2,28	1,19	0,02
CSF2RB	2,24	1,17	0,02
CD86	1,98	0,98	0,02
CD40	1,97	0,98	0,02
TAGAP	1,87	0,90	0,02
NT5E	-1,71	-0,78	0,02
NFKB1	1,64	0,72	0,02
MIF	-1,52	-0,61	0,02
TIGIT	2,45	1,29	0,03
PTPRC_all	2,10	1,07	0,03
STAT5A	1,62	0,70	0,03
TAP1	-2,09	-1,06	0,04
ADGRE5	2,07	1,05	0,04
FN1	-2,06	-1,04	0,04
ITGB2	2,04	1,00	0,04
RELB	1,95	0,96	0,04
CD9	-1,80	-0,85	0,04

TCF7	1,76	0,81	0,04
LTB4R	1,57	0,65	0,04
CFI	1,57	0,65	0,04
KLRK1	2,41	1,27	0,05
IL16	1,90	0,93	0,05
BST1	-1,80	-0,85	0,05
HLA-DPB1	2,52	1,33	178e-3

4. Diskussion

Die chronische Endometritis ist eine unscharf definierte Erkrankung. Zumeist symptomarm, ist erst in jüngerer Zeit ein lebhafter Austausch der wissenschaftlichen Gemeinschaft zu diesem Thema entfacht, der Ausdruck in reger publizistischer Tätigkeit findet. Die durchschnittliche Anzahl veröffentlichter Artikel zur chronischen Endometritis hat sich binnen weniger Jahren verdreifacht, wie bereits illustriert wurde (vgl. *Abbildung 4*).

Der Grund für die erneute Auseinandersetzung mit einem seit langer Zeit bekannten und lange Zeit wenig relevanten Thema ist auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin zu finden. Ein großer technischer Fortschritt in diesem aus historischer Perspektive recht neuen Fachbereich der Humanmedizin erlaubt es, inzwischen einem immer größeren Anteil ungewollt kinderloser Frauen eine Schwangerschaft zu ermöglichen [45, 65]. Hinzu tritt ein gleichzeitiger gesellschaftlicher Wandel in der sog. westlichen Welt zu späterer und kontrollierter Familiengründung.

Die verfeinerte Methodik der Reproduktionsmedizin umfasst technisch aufwendige, moderne Verfahren zur künstlichen Befruchtung, wie die intrauterine Insemination, In-vitro-Fertilisation oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion, durch die ein zuvor unerfüllbarer Kinderwunsch realisiert werden kann [45].

Anlass zu einer eigenen Auseinandersetzung im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die bestehende große diagnostische Unsicherheit der histologischen Probenaufarbeitung und -interpretation. Dies ist zum einen der Art des Materials geschuldet, da endometriale Schleimhaut bereits physiologisch eine große Spannbreite morphologischer Erscheinungsbilder und Variationen des zu erwartenden Zellbesatzes zeigt und das gewonnene Untersuchungsgut in der Regel spärlich und fragmentiert vorliegt. Darüber hinaus besteht kein Konsens in den anzuwendenden Kriterien, die die Diagnose einer chronischen Endometritis rechtfertigen [20]. Schließlich ist die klinische häufig erwünschte CD56-Quantifizierung ein für den Pathologen unübliches Verfahren im Kontext inflammatorischer Veränderungen, zumal die genaue Funktion CD56 exprimierender uteriner NK-Zellen nicht abschließend bekannt ist [7, 8, 66].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nach aktuellem Wissensstand eine eigene Untersuchung zur chronischen Endometritis durchgeführt. Neben den etablierten histologischen und immunhistochemischen Verfahren (HE, CD138, CD56) wurde eine CD8-IHC zur Bestimmung des zytotoxischen T-Zell-Gehalts ergänzt und kontextualisiert (Kap. 3.1).

In einem weiteren, innovativen Ansatz wurde ferner eine explorative molekularpathologische Gen-Expressionsanalyse an einem selektierten, kleinen Patientinnenkollektiv ergänzt, um weitere Einblicke und Perspektiven zu immunologischen Veränderungen zu gewinnen.

Die gewonnenen Erkenntnisse gilt es im Folgenden kritisch zu diskutieren.

4.1 Patientinnenkollektiv

Die Selektion eines Patientinnenkollektivs in aktuellen und historischen Studien zur chronischen Endometritis ist schwierig.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der chronischen Endometritis vor dem Hintergrund der Reproduktionsmedizin, genauer: dem unerfüllten Kinderwunsch. 102 Endometriumsbiopsien mit

einem Durchschnittsalter der Patientinnen von 36,6 Jahren wurden untersucht, sämtlich eingeschickt mit der klinischen Fragestellung nach chronischer Endometritis und dem Wunsch nach ergänzender immunhistochemischer Aufarbeitung.

Ein idealisiertes Probenkollektiv würde sämtliche möglichen Einflussfaktoren für einen unerfüllten Kinderwunsch und die chronische Endometritis berücksichtigen und isolieren. Denkbar würden hierzu eine ausführliche Anamnese zu Vorerkrankungen (z.B. autoimmun-Erkrankungen, Gerinnungsstörungen), Endokrinologie (hormonelle Dysbalancen), eine Medikamentenanamnese, Wissen zu anatomische Anlagevarianten des weiblichen Genitals, Komorbiditäten, eine Partneranamnese etc. zählen. Auch eine genaue Information zur Zyklusphase des Entnahmepunktes der Endometriumsbiopsie wäre erforderlich.

All dies steht dem diagnostisch tätigen Pathologen erfahrungsgemäß nicht zur Verfügung. Die Beantwortung der Fragestellung nach einer chronischen Endometritis erfolgt üblicherweise anhand spärlicher klinischer Angaben (üblicherweise „RIF/RPL, unerfüllter Kinderwunsch“) und des Patientinnenalters.

Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Studie hierzu analog das Kollektiv aus der Alltagspraxis eines großen Instituts für Pathologie gebildet. Es betont den rein histopathologischen Aspekt der Diagnostik, wobei eine gewisse Verblindung gegenüber dem klinischen Kontext billigend in Kauf genommen wurde. Dieser Ansatz ist allein deshalb gerechtfertigt, da zum jetzigen Zeitpunkt ausschließlich histologische Kriterien für die Diagnosestellung der chronischen Endometritis gelten und ergänzende Patienteninformationen in der täglichen Diagnostik in der Regel nicht zur Verfügung stehen. Es ist dies also ein pragmatisch-praxisorientierter Ansatz.

Keiner uns bekannten Studie liegt ein streng homogenes Patientinnenkollektiv zugrunde, in dem gleichermaßen Klinik, Serologie, Anamnese, Zyklus-adaptierte Probenentnahme und korrespondierende histologische Datierung berücksichtigt würde.

Die tagesgenaue histologische Datierung endometrialer Schleimhautproben, wie sie ursprünglich von Noyes et al. [5] etabliert wurde, ist inzwischen überholt. Trotzdem erschien es sinnvoll, eine zumindest einordnende histologische Datierung vorzunehmen.

Der weitaus größte Probenteil des verwendeten Kollektivs zeigte histologische Schleimhautveränderungen der Proliferations- oder Sekretionsphase (45,10% / 42,16%), während nur ein kleiner Anteil (12,74%) eine hiervon divergierende Histologie aufwies. Ein Zusammenhang zwischen Zyklusphase und chronischer Endometritis ist bislang nicht belegt.

4.2 Ergebnisdiskussion der Immunhistochemie

Ein technisch einfaches Verfahren zur Identifikation von Zellarten und -eigenschaften stellt die Immunhistochemie dar. Farbgekoppelte Antikörper binden spezifische Strukturen und erlauben Aufschluss über konventionell-morphologisch nicht zugängliche Gewebsmerkmale [34]. Zwar stammen die ursprünglichen und immer noch standardmäßig zitierten Publikationen zur chronischen Endometritis (vor allem Greenwood, 1981 [32]) aus einer Zeit vor der Etablierung dieser inzwischen für die Pathologie alltäglichen Zusatzmethode, für die heutige Diagnostik ist sie jedoch essenziell geworden und insbesondere in der hier behandelten Fragestellung integraler Untersuchungsbestandteil.

So verfolgt auch diese Arbeit einen immunhistochemischen Untersuchungsansatz, in dem Plasmazellen mittels CD138, NK-Zellen mit CD56 und zytotoxisch T-Zellen mit CD8 markiert und

quantifiziert wurden. Ein besonderer Stellenwert fällt hierbei dem Plasmazellnachweis als diagnostischem Goldstandard zu. Auf die Problematik der Interpretation und Auswertung der gewonnenen Ergebnisse sei im Folgenden eingegangen.

4.2.1 CD138 – Goldstandard der Diagnostik

Aktueller diagnostischer Goldstandard ist der immunhistochemische Nachweis eines Plasmazellinfiltrates an einer Probe endometrialer Schleimhaut [30]. Wie genau ein Plasmazellinfiltrat zu quantifizieren sei, wie groß die auszuwertende Gewebefläche zu sein habe und welcher Schwellenwert für diese Diagnosestellung geeignet sei, bleibt umstritten [23, 53]. Wie bereits in *Tabelle 11: Verschiedene Diagnosekriterien der CE* illustriert, kann autorenabhängig bereits eine vereinzelte Plasmazelle als ausreichender Beweis für die Diagnose einer chronischen Endometritis gelten. Die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien zur chronischen Endometritis wird hierdurch eingeschränkt, was eine Reihe von Schwierigkeiten im wissenschaftlichen Diskurs mit sich führt und die Grundlage der Diagnose selbst zuweilen zweifelhaft erschienen lässt.

Zwar herrscht eine generelle Übereinkunft, dass jede Art von Plasmazellinfiltrat im Endometrium als potenziell pathologisch anzusehen ist, faktisch untermauern lässt sich diese Aussage jedoch nicht mit Sicherheit, da die Studienlage zum physiologischen Zellbesatzes des Endometriums spärlich ist. Ebenfalls unklar ist, ob der Nachweis vereinzelter Plasmazellen im Endometrium auch dann als Ausdruck einer chronischen Endometritis zu werten ist, wenn keinerlei korrespondierende Klinik (wie ein unerfüllter Kinderwunsch etc.) vorliegt [13, 15, 67].

Die Auswertung jeder Immunhistochemie mit einem so sensiblen Schwellenwert wird zusätzlich erschwert, wenn entnahme- oder zyklusbedingte Gewebshämorrhagien zirkulierende Plasmazellen des strömenden Blutes dem Gewebe untermischen und ein Plasmazellinfiltrat artifiziell suggerieren [68].

Zuletzt ist die Sensitivität der Methode eng an die technische Ausführung gekoppelt. Die Art des verwendeten Antikörpers und insbesondere die Verdünnung, mit der dieser aufgetragen wird, haben einen deutlichen Einfluss auf die Detektion von Plasmazellen.

Im hier vorgestellten Untersuchungsansatz wurde unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur (vgl. *Tabelle 11*, Anhang) ein Grenzwert von 2 Plasmazellen auf 10 HPF für die Diagnose einer chronischen Endometritis gewählt, dies in Anlehnung an Kitaya et al. [23]. Die Flächenauswertung von 10 HPF ist parallelen Studienansätzen entlehnt, sowie dem praktizierenden Pathologen von zahlreichen anderen Scoring-Systemen bekannt und leicht reproduzier- und anwendbar. Die Antikörperverdünnung erfolgte in einem Verhältnis von 1:200.

Die Inzidenz der chronischen Endometritis lag im untersuchten Kollektiv bei 26,5%, wobei anschaulich die Abhängigkeit der Inzidenz vom angewandten Diagnose-Grenzwert demonstriert werden kann und von 42,2% (≥ 1 PZ/10HPF) bis 12,8% (≥ 5 PZ/10HPF) reichen kann (*Tabelle 3*). Diese Heterogenität spiegelt die aktuelle Datenlage, in der untersuchte Kollektive von RIF-Patientinnen eine Inzidenz zwischen 45% [69] und 14% [56] zeigen.

Eine statistisch signifikante, moderate Korrelation lag lediglich im Vergleich des klassierten Plasmazellinfiltrates mit der (nicht-klassierten) Anzahl CD8⁺ T-Lymphozyten vor. Dies lässt sich zumindest als hinweisend auf einen möglichen biologischen Zusammenhang zwischen der Diagnose der chronischen Endometritis und begleitendem zytotoxischen T-Zell-Infiltrat werten. Allerdings existieren nach aktuellem Wissenstand noch keine vergleichbaren Untersuchungen unter

diesem Gesichtspunkt, sodass für eine finale Einordnung des Ergebnisses ein breiterer wissenschaftlicher Studienkontext wünschenswert wäre.

Insbesondere spannend erscheint die Möglichkeit eines funktionellen Zusammenhangs der chronischen Endometritis mit zytotoxischen T-Zellen unter Berücksichtigung der Pathogenese, in der als krankheitsursächlich ein (niederschwelliger) infektiöser Fokus gilt, der konsequent antibiotisch behandelt werden kann [70, 71].

4.2.2 CD56

Wie bereits unter Kap. 1.2.3.1 beschrieben, ist die genaue Funktion natürlicher Killerzellen im Endometrium nicht vollständig ergründet und wird im weiten Kontext der Plazentation verordnet, wo ihnen „immunmodulatorische“ Eigenschaften und eine Beteiligung an vaskulären Umbauprozessen zugeschrieben werden [9, 10, 72]. Zytotoxische Eigenschaften stehen nicht im Vordergrund dieser Zellpopulation im Endometrium.

Zu beachten ist, dass NK-Zellen, wie sie in der Untersuchung endometrialer Schleimhaut anzutreffen sind, einer speziellen Subgruppe angehören, die sich durch ihren Immunphänotyp ($CD56^{hell}$, $CD16^{schwach}$) und ihre Funktion von NK-Zellen des peripheren Blutes ($CD56^{schwach}$, $CD16^+$) unterscheiden. Die Nomenklatur unterstreicht diesen Unterschied in der Differenzierung als „uterine NK-Zelle“. Der genaue Zusammenhang uteriner NK-Zellen mit NK-Zellen des peripheren Blutes ist noch nicht bekannt. Zwar wird spekuliert, dass $CD56^{hell}$ -NK-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit Vorläufer $CD56^{schwach}$ -NK-Zellen seien, das genaue Verhältnis dieser Subgruppen und ihre Rekrutierung in unterschiedliche Kompartimente des menschlichen Körpers ist jedoch noch unbekannt [73, 74].

Ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl uteriner NK-Zellen und einem unerfüllten Kinderwunsch oder chronischer Endometritis besteht, ist hochumstritten und lässt sich nach aktueller Studienlage nicht belegen. Neben Arbeiten, die einen erhöhten endometrialen NK-Zellbesatz bei Patientinnen mit RIF belegen [66], existieren solche mit diametral entgegengesetzten Ergebnissen [75]. Völlig unklar bleibt die Grundlage und Art der Quantifizierung von uterinen NK-Zellen, deren Anzahl im Endometrium schon rein physiologisch eine große Spannbreite während der unterschiedlichen Zyklusphasen aufweist [12, 13].

All diesen Schwierigkeiten zum Trotz existieren mehrere wissenschaftliche Texte, die immunmodulatorische Therapien¹⁴ auf der Basis einer (wie auch immer gearteten) NK-Zell Quantifizierung untersuchen und hieraus vermeintliche Therapiekonzepte bei unerfülltem Kinderwunsch ableiten [76-78]. Wissenschaftlich anerkannt sind diese Untersuchungen nicht [79-81] und eine begründete NK-Zell-Bestimmung bei unerfülltem Kinderwunsch bzw. RIF lässt sich aus der momentanen Datenlage nicht ableiten. Allein die verbleibende Ambivalenz einer „unklaren“ Datenlage mag ausreichend sein, eine Bestimmung des NK-Zellgehaltes an histologischem Probenmaterial zu veranlassen.

Da keinerlei etablierte Methoden zur Auszählung uteriner NK-Zellen existieren, wurde in vorliegender Arbeit ein Ansatz der „gerichteten“ Quantifizierung innerhalb eines HPFs „durchschnittlicher Zelldichte“ gewählt. Ein analoger Prozess wurde in der Arbeit von Russel [12, 13, 82] gewählt, um orientierende Referenzwerte für Immunzellen in endometrialer Schleimhaut zu etablieren. Die untersucherabhängige Selektion eines Gewebeareals, das für die Auszählung geeignet scheint, ist ein methodisches Zugeständnis an praktische Umsetzbarkeit. Allein die große Menge

¹⁴ Beispielsweise Kortikosteroide, Intralipid, Aspirin etc.

uteriner NK-Zellen, der hierdurch große Zählaufwand und die teils geballte und heterogene Ansammlung in Hot-Spots und um Arteriolen verbietet eine mittelnde Quantifizierung über größere Gewebeoberflächen durch visuelles Auszählen am Mikroskop. Zumal sich durchaus mit etwas Erfahrung ein homogen verteilter NK-Zell „Hintergrund“ abseits der Hot-Spot Areale abgrenzen lässt, der in einer gegebenen Probe gleichmäßig verteilt erscheint und auch durch repräsentative Auszählung anhand eines HPF sinnvoll erfassbar ist.

Solange schlussendlich kein – beispielsweise digital unterstütztes und hierdurch evtl. objektiviertes – alternatives Auszählverfahren in der alltäglichen Praxis etabliert ist, bleibt eine durch ein gewisses Maß an Subjektivität beeinflusste Technik kaum vermeidbar.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen eine große Varianz des NK-Zellbesatzes, die weder eine signifikante Korrelation zu der Anzahl an Plasmazellen noch zu der Anzahl an CD8⁺ T-Zellen zeigte. Dies überrascht wenig vor dem Hintergrund der großen Skepsis der wissenschaftlichen Gemeinschaft zu dieser Zusatzuntersuchung und illustriert, dass ein einfacher Zusammenhang zwischen natürlichen Killerzellen und Plasmazellen im Endometrium – somit der chronischen Endometritis allgemein – in der routinemäßigen Auswertung endometrialer Schleimhautproben nicht zulässig konstruiert werden kann.

Berücksichtigt man darüber hinaus die schon physiologisch große Varianz der endometrialen NK-Zelldichte, die Heterogenität des Verteilungsmusters und die weiterhin zu großen Teilen völlig unklare Rolle der NK-Zelle innerhalb des diffusen Themenfeldes der Fertilität und speziell im unerfüllten Kinderwunsch, erscheint eine – wie auch immer geartete – Quantifizierung am histologischen Schnitt aus heutiger Sicht nicht sinnvoll [12, 13, 83].

4.2.3 CD8

Arbeiten zur Verteilung CD8-exprimierender zytotoxischer T-Zellen im Endometrium existieren kaum. Allein die schon zitierte Arbeit von Russel [12] beschäftigte sich in den letzten Jahren mit der Untersuchung der zu erwartenden Normverteilung von CD8⁺ T-Zellen im Endometrium. Wie auch in der Quantifizierung der CD56⁺ NK-Zellen, ist bei der Auszählung CD8⁺ T-Zellen ein gerichteter Ansatz gewählt worden. Hierbei wird berücksichtigt, dass CD8⁺ T-Zellen in diffuser als auch fokal akzentuierter, periglandulär betonter Lagerung zu beobachten sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden auf 10 HPF zytotoxische T-Zellen ausgezählt, hierbei wurden die „Hot-Spot“ Areale ausgeklammert und die Zählung auf diffus verteilte T-Zellen innerhalb des endometrialen Stromas konzentriert, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit der Zählwerte gegeben sein dürfte.

Dass die Verteilung zytotoxischer T-Zellen ausgeprägten Schwankungen unterliegt, wird deutlich, wenn man sich das Intervall der gemessenen Werte vor Augen führt, wobei zum Mindesten 26, maximal jedoch 687 Zellen ausgezählt wurden. Der zeitliche Aufwand einer rein händisch-visuellen Auszählung ist erheblich.

Wie schon in der Ergebnisdiskussion der CD138⁺ Plasmazellen berichtet, konnte ein Zusammenhang zwischen zytotoxischem T-Zell-Infiltrat und Plasmazellbesatz des Endometriums belegt werden, wenn die absolute Anzahl an Plasmazellen mit der semiquantitativen Erfassung des klassierten Plasmazellinfiltrates korreliert wurde.

Gänzlich überraschend ist dieses Ergebnis nicht, obwohl bei allem – besonders in letzter Zeit entfachten – Interesse an der Entität der chronischen Endometritis gerade dieser Zusammenhang kaum Aufmerksamkeit erhielt.

Einige wenige Studien zeigen ähnliche Resultate, in denen ein Anstieg des T-Zell-Infiltrates allgemein, der zytotoxischen T-Zellen speziell, im Kontext der chronischen Endometritis dokumentiert werden konnte [84, 85].

Die Studienlage zur genauen Ergründung des möglichen immunologischen Zusammenhangs ist bislang unzureichend. Trotzdem scheint es zumindest naheliegend, dass die chronische Endometritis als inflammatorische Reaktion auf eine unterschwellige endometriale Keimbesiedelung neben einem plasmazellreichen Entzündungsfiltrat auch eine Komponente zytotoxischer T-Zellen beinhaltet, wie dies bei infektiösen Erkrankungen regelhaft zu beobachten ist.

4.3 Diskussion Genexpressionsanalyse

Neben immunhistochemischen Untersuchungen an einem größeren Patientinnenkollektiv, die im aktuellen wissenschaftlichen Diskurs zur Diagnostik der chronischen Endometritis überwiegen, wurde in dieser Arbeit eine explorative Genexpressionsanalyse mittels NanoString-Technologie durchgeführt.

Das Verfahren war am Pathologischen Institut der LMU München etabliert und wurde auch in der Routinediagnostik verwendet (z.B. ProSigna-Test bei Mammakarzinomen) und erlaubt, über eine kleine Menge an isolierter RNA aus Paraffinmaterial in einem technisch einfach gehaltenen Rahmen eine potenzielle Informationsfülle zu gewinnen, deren bioinformatische Verarbeitung durch NanoString selbst und die kooperative Plattform Rosalind übersichtlich gestaltet ist.

4.3.1 NanoString-Kollektiv und Methode

Im Unterschied zu Verfahren wie den vorgestellten immunhistochemischen Untersuchungen, die dazu einladen, große Kollektive vergleichend zu untersuchen, ist die Technik der NanoString-Genexpressionsanalyse kostenintensiv und zwingt zu einer gewissenhaften Probenselektion. Technisch limitiert, bietet das eingesetzte Immunologie-Panel Platz für die gleichzeitige Analyse von bis zu 12 Proben, sodass die naheliegende Gegenüberstellung eines „Positivkollektives“ gegenüber einer Kontrollgruppe die Untersuchung von 24 Proben gestattet.

Innerhalb des „Postivkollektivs“ an Proben mit einer histologisch gesicherten chronischen Endometritis im Kontext eines unerfüllten Kinderwunsches wurde auf eine unterschiedliche Ausprägung des Plasmazellinfiltrates geachtet, das von 4 bis 36 PZ/10 HPF reicht.

Wie bereits mehrfach thematisiert, ist die rein physiologisch große Heterogenität endometrialer Schleimhaut insbesondere bei der Verwendung kleinerer Probenkollektive problematisch. Die RNA-Gewinnung einer NanoString-Analyse beginnt durch händisches Auskratzen markierter Leerschnitte, sodass ein Großteil der gewonnenen RNA „ortsständigen“ Zellen entstammt: etwa den Epithelien der Schleimhaut, Lymphozyten, NK-Zellen, Endothelien, Makrophagen, Stroma-zellen. Das allenfalls dezente Plasmazellinfiltrat, das rein histologisch und immunhistochemisch das entscheidende Differenzierungsmerkmal von Kontroll- und Positivkohorte darstellt, bildet nur einen Bruchteil der erfassten Zellpopulation ab und trägt einen verschwindend geringen Anteil an der gewonnenen Proben-RNA.

Gerade in der Exploration des Krankheitsbildes der chronischen Endometritis hat diese Technik jedoch einen besonderen Wert und Reiz, weil über das winzige Plasmazellkompartiment hinaus funktionelle Zusammenhänge eines ganzen Gewebsverbands untersucht werden können.

Die Fragestellung ist hier also nicht nur, ob ein Plasmazellinfiltrat messbaren Einfluss auf die Genexpression endometrialer Schleimhaut mit einer chronischen Endometritis ausübt, sondern ob die anhand der Immunhistochemie getroffene Diagnose einer chronischen Endometritis möglicherweise über das Plasmazellinfiltrat hinaus Veränderungen und Prozesse zeigt, die in einer vergleichenden Analyse auf Ebene der Genexpression manifest werden.

Da nach aktueller Literaturrecherche keine vergleichbaren Untersuchungen in anderen Studien vorliegen, ist eine Validierung der erhobenen Daten durch einfachen Vergleich nicht möglich. Auch Kausalschlüsse dürfen nur vorsichtig vermutet werden, da ohne Komparation nicht sicher unterschieden werden kann, in welchem Maße die erhobenen Werte und differentiell exprimierten Gene Ausdruck einer chronischen Endometritis sind, oder vielmehr einer noch unklaren Störvariable.

4.3.2 Differentiell exprimierte Gene

Ein Ergebnis der Expressionsanalyse im Vergleich des Positivkollektivs chronischer Endometritis-Proben mit dem Kontrollkollektiv ist die Identifizierung von vier, zwischen den beiden Gruppen differentiell exprimierten Genen: LCK, PTAFR und IKBKE werden über-, HLA-DOB unterexprimiert.

LCK ist eine Src-verwandte Proteinkinase und spielt eine Rolle in der komplexen Selektion und Reifung von T-Zellen. In einer vereinfachenden Anschauung bindet die Proteinkinase LCK nach der Interaktion einer T-Zelle mit einer antigenpräsentierenden Zelle an die zytoplasmatische Domäne der CD8- oder CD4- Korezeptoren. Im Zusammenspiel mit dem T-Zell-Rezeptor kommt es zu einer LCK-vermittelten Phosphorylierung sog. Immunorezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotive (immunoreceptor tyrosine-based activation models, ITAMS) an der zytoplasmatischen Domäne des CD3-Rezeptors, wodurch die Proteinkinase ZAP70 aktiviert wird [86, 87]. In diesem Kontext bildet LCK einen integralen Bestandteil innerhalb des T-Zell-Rezeptor-Signalweges.

Der *Plättchen-aktivierende Faktor Rezeptor* (Platelet-Activating Factor Receptor, PTAFR oder PAFr) ist der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugehörig und in Zusammenspiel mit dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) an diversen biologischen Prozessen beteiligt. Hierzu zählen proinflammatorische Stoffwechselprozesse, insbesondere im Respirationstrakt [88, 89], aber auch eine Rolle in der Reproduktion, als Sekretionsprodukt menschlicher Embryonen. Die genaue Signaltransduktion von rezeptorgebundenem PAF ist komplex und nicht vollständig eruiert [90].

Der *Inhibitor der nukleären Faktor Kappa B Kinase, Untereinheit Epsilon* (IKBKE oder IKKE) ist zusammen mit der TANK bindenden Kinase 1 (TBK1) Bestandteil des sogenannten nicht-kanonischen Aktivierungsweges der nukleären Faktor Kappa B Kinase (NF κ B) [91, 92]. Über NF κ B-Proteine kann die Expression vieler hundert Gene reguliert und entscheidender Anteil an zentralen zellulären Regulationsprozessen wie Inflammation, Zelltod und Zellproliferation genommen werden. Die diversen Krankheitsprozesse, die mit einer Expression von IKBKE einhergehen, bilden die fundamental-mannigfachen Funktion des NF κ B- Signalwegs ab und umfassen ein Bouquet ganz unterschiedlicher Erkrankungen wie Diabetes, Rheumatoide Arthritis, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und Übergewicht [93].

MHCII-Proteine werden auf Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert und binden fremde wie eigene Peptide, um sie an der Zelloberfläche der Interaktion mit CD4 $^{+}$ T-Zellen anheim zu stellen und also einen entscheidenden Bestandteil

der adaptiven Immunabwehr zu bilden. *HLA-DO* zählt als nicht-klassisches MHCII-Protein, da es selbst nicht direkt an der Antigen-präsentierenden Peptidbindung teilnimmt. Vielmehr ist es eine vorbereitende und begleitende Interaktion von HLA-DO mit dem ebenfalls nicht-klassischen HLA-DM, das ein effektive Peptidbindung von MHCII bedingt, wobei die genauen Mechanismen noch nicht endgültig dargelegt werden konnten [94, 95].

4.3.3 Ergebnisse der Gene Set Enrichment Analyse

Nachdem im Rahmen der vergleichenden Genexpressionsanalyse eine ausgewählte Zahl von differentiell exprimierten Genen zwischen der Gruppe chronischer Endometritiden und der Kontrolle identifiziert werden konnte, kann es von Interesse sein, eine GSEA durchzuführen. Insbesondere für in der Untersuchung von Tumorerkrankungen etabliert, ist eine GSEA der Versuch, von der alleinigen Aufzählung differentiell exprimierter Gene überzugehen und den Effekt der gemessenen Expressionsunterschiede auf komplexere, funktionelle Systeme und etablierte Signalwege zu übertragen [64].

Ein pointiert überspitztes Ergebnis lässt sich im Kontext der in dieser Arbeit durchgeföhrten Untersuchung für den Einfluss des Faktors „chronische Endometritis“ auf funktionelle Prozesse nicht ohne weiteres formulieren. In Betrachtung von *Tabelle 9* zeigen diverse Gene Sets einen kongruent hohen DSS und GSS und bilden diverse, im immunologischen Kontext anzusiedelnde Pfade und Signalwege ab. Darunter fallen insbesondere solche mit Assoziation zu adaptiver Immunantwort und T-Zellen auf (TGF- β Signaling, Treg Differentiation, Th2 Differentiation, MHC Class II Antigen Presentation, Lymphocyte Activation), neben breiteren Signalkaskaden wie dem Typ 2 Interferon-Signalweg.

Die zahlreichen aufgelisteten Signalwege scheinen ein reiches Panoptikum immunologischer Prozesse abzubilden, die in einen simplen Sinnzusammenhang sicherlich nicht zu bringen sind und allenfalls eine vorsichtig formulierte Tendenz zu adaptiv/T-Zell vermittelten Prozessen zeigen.

4.3.4 Ergebnisse des alternativen Untersuchungsansatzes

Um die bereits beschriebenen Ergebnisse einer vergleichenden Untersuchung von Positiv- zu Normkollektiv zu akzentuieren, wurde ein gewissermaßen überspitzer Vergleich der vier ausgeprägtesten Fälle einer chronischen Endometritis gegenüber dem Normkollektiv angeschlossen.

Die Ergebnisse sind hierbei ernüchternd. Zwar lässt sich eine Vielzahl differenziell exprimierter Gene gewahren. Eine bessere Gruppierung der Proben anhand der erzeugten Heatmap gelang allerdings nicht, was vermuten lässt, dass das von 24 auf 16 reduzierte Probenkollektiv zwar eine stärker ausgeprägte Gen-Expressionsschwankung zeigt, selbige aber offenbar einen weniger ersichtlichen Bezug zum Unterscheidungsmerkmal der chronischen Endometritis hat.

4.3.5 Fazit der Genexpressionanalyse

Die Genexpressionsanalyse identifizierte im Vergleich zweier, jeweils 12 Proben umfassender Gruppen – chronische Endometritis vs. Normkollektiv – vier differentiell exprimierte Gene. Die Genprodukte umfassen hierbei Rezeptoren, Rezeptorbausteine und Kinasen mit teils noch nicht vollständig bekannter Funktion. Es sind dies Kleinstbestandteile unterschiedlicher Signalwege, die unter größeren Überschriften wie „MHC-Komplex“, „NF κ B“ oder „PAF“ zentrale immunologische Mechanismen abbilden.

Ein einfacher Kontext zwischen den identifizierten Proteinen ist nicht problemlos konstruierbar. Auch eine direkte oder mittelbare Interaktion findet in keinem Fall statt. Die zugrunde liegenden immunologischen Prozesse sind verschieden, kreisen bisweilen um das Themenfeld „T- Zelle“ (LCK und HLA-DAB), können aber nicht weiter aufgelöst werden.

Als belanglos sollten die gewonnenen Ergebnisse einstweilen nicht gesehen werden. Dass die genutzte Untersuchungsmethode der Genexpressionsanalyse als Mittel zur vertiefenden Einsicht in die Diagnose der chronischen Endometritis keinen einfachen Signalweg abbildet oder eine klare funktionelle Tendenz der Expressionsunterschiede aufweist, mag erwartbar genannt werden. Dies dürfte auch der Unschärfe geschuldet sein, mit der schon die klinischen wie auch histologischen Beschreibungen selbst der chronischen Endometritis im momentanen Diskurs weiterhin behaftet sind, und welche also auch im Rahmen der NanoString Analyse beobachtet werden können.

Die Distinktion zwischen einer Probe „normaler“ endometrialer Schleimhaut und der Affektation durch eine chronische Endometritis liegt aktuell allein in der Identifikation weniger Plasmazellen und wird durch immunhistochemische Zusatzuntersuchungen erhärtet. In der durchgeföhrten Genexpressionsanalyse geht die Feinheit dieses rein quantitativen Unterschiedes freilich verloren, da die Dissektion des Gewebes einen Verbund abertausender Zellen umfasst und vereinzelte Plasmazellen auf die erhobenen Daten praktisch keinen messbaren Einfluss haben dürften.

Inwiefern ein über das Plasmazellkriterium hinaus fassbarer Prozess das Endometrium im Rahmen einer chronischen Endometritis beeinflusst – und ob ein solcher durch eine NanoString Analyse überhaupt greifbar wäre – ist die zentrale Frage, die unter Berücksichtigung der erhobenen Ergebnisse nicht einfach beantwortet werden kann.

Dass die identifizierten Genprodukte Teil eines noch verborgenen Mechanismus darstellen können, ist jedenfalls durchaus denkbar und müsste im Rahmen weiterführender Untersuchungen auch an größeren Probenkollektiven überprüft werden. Die hier vorgestellte Untersuchung mag dafür ein Grundstein sein.

4.4 Zusammenschau der immunhistochemischen und molekularpathologischen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem größeren Patientinnenkollektiv eine Quantifizierung von Plasmazellen, CD8⁺ T-Zellen und CD56⁺ NK-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Inzidenzrate für die CE, wie sie auch in vergleichbaren Kollektiven anderer Studien beobachtet wurde.

Auf der Ebene immunhistochemischer Untersuchungen konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen klassiertem CD8⁺ T-Zell-Infiltrat und dem Plasmazellbesatz einer endometrialen Schleimhautprobe demonstriert werden. Denkbar erscheint die Hypothese, dass eine chronische Endometritis mit einer T-Zell-Reaktion einhergeht, wofür das im Rahmen einer chronischen Endometritis gesteigerte T-Zell-Infiltrat und die in der Expressionsanalyse gemessene LCK-Expressionssteigerung Anhaltspunkte sind.

Die explorative Untersuchung des Genexpressionsprofils mittels NanoString- Verfahren identifizierte in den gewählten Kollektiven vier differentiell exprimierte Gene zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe chronischer Endometritiden. Wie bereits kritisch diskutiert, verbietet sich eine simplizistische Reduktion der Genexpressionsanalyse auf einen einzelnen Signalweg. Berechtigt

ist hingegen die Überlegung, Teil eines Puzzles erfasst zu haben, in dem die chronische Endometritis nicht allein auf ein Plasmazellinfiltrat reduziert ist, sondern möglicherweise komplexere Interaktionen abbildet. So weisen zumindest zwei der vier identifizierten, differentiell exprimierten Gene (LCK, HLA-DOB) auf einen T-Zell vermittelten Kontext hin.

Einen Anstoß, in der aktuellen Diskussion über die chronische Endometritis als noch unzureichend scharf definierte Diagnose unter Umständen weiter zu greifen und ergänzende Beobachtungen unter diesem Aspekt anzustellen, stellen sie allemal dar.

4.5 Abschließende, praktische Überlegungen

Ist es zu verantworten, eine Diagnose zu stellen, die selbst nicht klar definiert ist? Welchen Wert hat die Diagnose einer chronischen Endometritis? Wie ist diese Diagnose zu stellen?

Die Spannungslage um die chronische Endometritis findet Ausdruck in diesen Fragen. Sicherlich ist die chronische Endometritis bislang noch kein in Bronze gegossener Pfeiler der Reproduktionsmedizin. Treffender wäre es wohl, in ihr eine Art von „Emerging Entity“ zu sehen, deren Existenzberechtigung durch die aktuelle Studienlage gestützt wird.

Das Feld der Reproduktionsmedizin nimmt sich existentiell zu nennenden Sorgen und Nöten an, die im Falle eines unerfüllbaren Kinderwunsches in der Familienplanung hochpersönliche Problematiken umfasst.

Die chronische Endometritis bildet ein kleines diagnostisches Puzzlestück in der Aufklärung eines komplexen Sachverhaltes. Ein diagnostischer Wert des Konzepts der chronischen Endometritis scheint gegeben, da mehrere Studien – wie weiter oben beschrieben – nach antibiotischer Therapie des Plasmazellinfiltrates höhere Schwangerschaftsraten beschreiben.

Darüber hinaus rechtfertigt die aktuelle Literaturlage keine weiterführenden Untersuchungen. Für den diagnostischen Alltag ausreichend ist eine CD138-Immunhistochemie zur Identifikation von Plasmazellen. Eine Auswertung von 10 HPF ist alltagspraktikabel, reproduzierbar und zeitsparend. Unter der Maßgabe „Eine ist keine“ folgte diese Arbeit einem Schwellenwert von 2 PZ/10HPF. Nach unserer Meinung ist von einer harten Diagnosestellung abzuraten, da die Kriterien hierfür nach aktuellem Wissensstand noch zu unklar definiert sind. Anzuraten ist eine kommentierende Befundung, die beispielsweise lauten kann:

„Endometriale Schleimhaut mit leicht vermehrtem Plasmazellinfiltrat. Der Befund ist im entsprechenden klinischen Kontext vereinbar mit einer chronischen Endometritis, wobei für diese Diagnose keine einheitlichen Grenzwerte etabliert sind.“

Der Erfahrung des behandelnden klinischen Kollegen ist nun das weitere therapeutische Vorgehen überlassen und die Möglichkeit einer antibiotischen Therapie gegeben. Sollten weitere immunhistochemische Untersuchungen (wie CD56) durch den Einsender gewünscht sein, ist eine transparente, persönliche Kommunikation der einfachste Weg, unnötigen Kosten vorzubeugen.

5. Zusammenfassung

Die chronische Endometritis ist eine meist subklinisch verlaufende, oft völlig symptomfreie Erkrankung, die klinisch abklärungswürdig nur in der Reproduktionsmedizin im Kontext eines unerfüllten Kinderwunsches ist. Wiederholtes Implantationsversagen oder Schwangerschaftsverluste sind multifaktoriell bedingt und bedürfen einer gewissenhaften anamnestischen Aufarbeitung. Die chronische Endometritis wird als ein möglicher Auslöser eines unerfüllten Kinderwunsches verstanden und meist durch eine symptomarme bakterielle Besiedelung des Cavum uteri hervorgerufen [2, 20, 51].

Die Diagnostik der chronischen Endometritis wird durch eine Probengewinnung endometrialer Schleimhaut und den histologischen Nachweis eines Plasmazellinfiltrates erbracht. Hysteroskopische Veränderungen können die Diagnose nahelegen, jedoch nicht beweisen. Üblicherweise ist das Endometrium praktisch plasmazelfrei. Eine immunhistochemische Zusatzuntersuchung für CD138 wird ergänzt, um die Identifikation von Plasmazellen im endometrialen Stroma zu vereinfachen. Eine klinisch häufig gewünschte Zusatzuntersuchung ist die Quantifizierung des NK-Zellgehaltes (CD56), einer Zellpopulation, die in zyklusabhängig großer Zahl physiologisch im Endometrium gefunden werden kann und deren genaue Funktion weiterhin unbekannt ist [8].

Einheitliche Kriterien für die Diagnosestellung einer chronischen Endometritis existieren nicht. Welche Anzahl von Plasmazellen im Endometrium als pathologisch zu gelten habe, welche Gewebsfläche zu untersuchen sei und welche Antikörperverdünnung zum Plasmazellnachweis anzuwenden sei, ist variabel. Aktuelle Studien zu diesem Thema sind deshalb oft nur schwer vergleichbar und die Inzidenzzahlen schwanken stark. Die Rolle CD56-exprimierender uteriner NK-Zellen ist umstritten.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die chronische Endometritis an einem eigenen Probenkollektiv zu untersuchen. Neben dem Nachweis endometrialer Plasmazellen und NK-Zellen wurden zytotoxische T-Zellen quantifiziert, deren Anzahl möglicherweise einen Zusammenhang zur chronischen Endometritis darstellen könnte.

Anschließend wurde mit der Intention, jenseits des Plasmazellinfiltrates mögliche funktionelle Grundlagen der chronischen Endometritis zu beleuchten, eine auf immunologisch relevante Proteine fokussierte Genexpressionsanalyse an einem kleineren, selektierten Kollektiv durchgeführt.

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich eine Inzidenz der chronischen Endometritis wie sie (unter vergleichbaren Prämissen) auch in der Literatur zu finden ist. Eine Korrelation zwischen Plasmazell- und NK-Zellzahl ergab sich nicht. Dies deckt sich mit der großen Skepsis aktueller Studien, die keine ausreichenden Belege für einen Zusammenhang uteriner NK-Zellen und einer chronischen Endometritis zeigen [66, 96]. Vor diesem Hintergrund scheint aktuell keine Berechtigung für eine CD56-Zusatzuntersuchung an Endometriumbiopsien zu existieren, zumal keine validierten Auswertungsprotokolle vorliegen und die genaue Funktion uteriner NK-Zellen in Plazentation und Fertilität noch zu schlecht definiert ist. Eine Korrelation zwischen NK-Zelldichte und T-Zelldichte lag nicht vor, auch konnte kein Zusammenhang zwischen NK-Zelldichte und Zyklusphase demonstriert werden, obwohl dies in der Literatur beschrieben ist [13].

Die Untersuchung der zytotoxischen T-Zellen zeigte eine weite Spannbreite der Zelldichte. Eine statistisch signifikante Korrelation konnte zwischen klassiertem T-Zell-Infiltrat und Plasmazellzahl gezeigt werden. Möglicherweise ist also die chronische Endometritis nicht nur durch das Plasma-

zellinfiltrat, sondern auch durch eine T-zelluläre Reaktion gekennzeichnet. Wichtig für die Etablierung eines Zusammenhangs wäre es hierbei sicherlich, den physiologischen Zellbesatz des Endometriums genauer zu definieren und vergleichbare Zählmethoden und Normwerte zu bestimmen. Der teils hohe zeitliche Aufwand der T-Zell-Quantifizierung durch Auszählen mehrerer HPFs hoher Zelldichte dürfte bisweilen unpraktikabel bleiben.

Untersuchungen zum Genexpressionsprofil endometrialer Schleimhaut bei chronischer Endometritis existieren außerhalb dieser Arbeit bislang nicht. Das Verfahren wurde mit der Intention, möglicherweise markante Expressionsunterschiede von chronischer Endometritis zu plasmazellfreier endometrialer Schleimhaut aufzudecken, gewählt. Wie weiter oben beschrieben, bilden Plasmazellen selbst hierbei einen vernachlässigbar kleinen Anteil an den gezählten mRNA-Reads, sodass der funktionelle Gesamtverband des Endometriums selbst, incl. Stromazellen, Epithelien, Endothelien, Leukozyten etc. Gegenstand der Untersuchung ist.

Differentiell exprimiert wurden vier Gene: LCK, PTAFR, IKBKE und *HLA-DOB*. Diese Genprodukte stellen Kleinstbausteine unterschiedlicher Signalwege dar.

In einen weiteren Kontext der T-Zell-Aktivierung einordnen lassen sich hierbei LCK – als Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs – und HLA-DOB – im weiteren Rahmen der Antigenpräsentation und T-Zell-Interaktion.

Für PTAFR und IKBKE fällt die Kontextualisierung schwieriger. Diese Genprodukte sind Kleinstbausteine breiter Signalwege, die teils noch unvollständig erschlossen sind. Ob hier klarere Rollen im Prozess der chronischen Endometritis etabliert werden können, bleibt abzuwarten.

Interessant wären über die vorliegende Arbeit hinausführende Untersuchungen zur Frage nach einer T-Zell-vermittelten inflammatorischen Reaktion im Rahmen der chronischen Endometritis. Dies könnte zum weiteren Verständnis der Diagnose und zur Erhärting und Präzisierung der diagnostischen Grundlagen wegweisend sein.

Jeder Pionierarbeit ist nun diese Einschränkung gemein, dass häufig der Wert einer Untersuchung, der verborgene Sinn erhobener Ergebnisse, erst in der Kontextualisierung mit nachfolgenden Studien möglich wird. Das für die Diagnostik der chronischen Endometritis notwendige wissenschaftliche Fundament zu stützen und zu erweitern, war Ziel der vorliegenden Arbeit. Den zukünftigen Studien darf mit Spannung entgegengesehen werden.

Literaturverzeichnis

1. Mills, S.E., *Histology for Pathologists*. 2012: Lippincott Williams and Wilkons.
2. Murdock, T.A., *Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curettings*. 2019: Springer.
3. Li, T.C., et al., *A new method of histologic dating of human endometrium in the luteal phase*. Fertil Steril, 1988. **50**(1): p. 52-60.
4. Fadare, O. and W. Zheng, *Histologic dating of the endometrium: accuracy, reproducibility, and practical value*. Adv Anat Pathol, 2005. **12**(2): p. 39-46.
5. Noyes, R.W., A.T. Hertig, and J. Rock, *Dating the endometrial biopsy*. Am J Obstet Gynecol, 1975. **122**(2): p. 262-3.
6. Alfer, J., et al., *Endometrial Dating Method Detects Individual Maturation Sequences During the Secretory Phase*. In Vivo, 2020. **34**(4): p. 1951-1963.
7. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.
8. Diaz-Hernandez, I., et al., *Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction*. Hum Reprod Update, 2021. **27**(4): p. 720-746.
9. Xiong, S., et al., *Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation*. J Clin Invest, 2013. **123**(10): p. 4264-72.
10. Robson, A., et al., *Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 4876-85.
11. Pace, D., L. Morrison, and J.N. Bulmer, *Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes throughout menstrual cycle and early pregnancy*. J Clin Pathol, 1989. **42**(1): p. 35-9.
12. Russell, P., et al., *The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure I: Techniques*. Journal of reproductive immunology, 2011. **91**: p. 90-102-90-102.
13. Russell, P., et al., *The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. III: Further observations and reference ranges*. Pathology, 2013. **45**: p. 393-401-393-401.
14. Agostinis, C., et al., *Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 2387-2387.
15. Lee, S.K., et al., *Immune cells in the female reproductive tract*. Immune network, 2015. **15**: p. 16-26-16-26.
16. Salamonsen, L.A. and L.J. Lathbury, *Endometrial leukocytes and menstruation*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(1): p. 16-27.
17. Yeaman, G.R., et al., *CD8+ T cells in human uterine endometrial lymphoid aggregates: evidence for accumulation of cells by trafficking*. Immunology, 2001. **102**(4): p. 434-40.
18. Liu, L., et al., *Decidual CD8(+)T cells exhibit both residency and tolerance signatures modulated by decidual stromal cells*. J Transl Med, 2020. **18**(1): p. 221.
19. Yasuo, T. and K. Kitaya, *Challenges in Clinical Diagnosis and Management of Chronic Endometritis*. Diagnostics (Basel), 2022. **12**(11).
20. Singh, N. and A. Sethi, *Endometritis - Diagnosis, Treatment and its impact on fertility - A Scoping Review*. JBRA Assist Reprod, 2022. **26**(3): p. 538-546.
21. Cincinelli, E., et al., *Chronic endometritis: correlation among hysteroscopic, histologic, and bacteriologic findings in a prospective trial with 2190 consecutive office hysteroscopies*. Fertility and sterility, 2008. **89**: p. 677-684-677-684.
22. Cincinelli, E., et al., *Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis*. Gynecol Obstet Invest, 2009. **68**(2): p. 108-15.

23. Kitaya, K., et al., *Endometritis: new time, new concepts*. Fertility and sterility, 2018. **110**: p. 344–350-344–350.
24. Eckert, L.O., et al., *Endometritis: the clinical-pathologic syndrome*. American journal of obstetrics and gynecology, 2002. **186**: p. 690–695-690–695.
25. Polisseni, F., E.A. Bambirra, and A.F. Camargos, *Detection of chronic endometritis by diagnostic hysteroscopy in asymptomatic infertile patients*. Gynecologic and obstetric investigation, 2003. **55**: p. 205–210-205–210.
26. Wild, R.A., J.S. Sanfilippo, and A.A. Toledo, *Endometrial biopsy in the infertility investigation. The experience at two institutions*. J Reprod Med, 1986. **31**(10): p. 954-7.
27. Kasius, J.C., et al., *The impact of chronic endometritis on reproductive outcome*. Fertil Steril, 2011. **96**(6): p. 1451-6.
28. Cincinelli, E., et al., *Detection of chronic endometritis at fluid hysteroscopy*. Journal of minimally invasive gynecology, 2005. **12**: p. 514–518-514–518.
29. Johnston-MacAnanny, E.B., et al., *Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2010. **93**(2): p. 437-41.
30. Kitaya, K. and T. Yasuo, *Immunohistochemical and clinicopathological characterization of chronic endometritis*. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), 2011. **66**: p. 410–415-410–415.
31. Cincinelli, E., et al., *Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy*. Hum Reprod, 2015. **30**(2): p. 323-30.
32. Greenwood, S.M. and J.J. Moran, *Chronic endometritis: morphologic and clinical observations*. Obstet Gynecol, 1981. **58**(2): p. 176-84.
33. Brudenell, J.M., *Chronic endometritis and plasma cell infiltration of the endometrium*. J Obstet Gynaecol Br Emp, 1955. **62**(2): p. 269-74.
34. Bayer-Garner, I.B., J.A. Nickell, and S. Korourian, *Routine syndecan-1 immunohistochemistry aids in the diagnosis of chronic endometritis*. Archives of pathology and laboratory medicine, 2004. **128**: p. 1000–1003-1000–1003.
35. Chen, Y.-Q., et al., *Analysis of the diagnostic value of CD138 for chronic endometritis, the risk factors for the pathogenesis of chronic endometritis and the effect of chronic endometritis on pregnancy: a cohort study*. BMC women's health, 2016. **16**: p. 60-60.
36. Crum, C.P., et al., *Chronic endometritis: the role of immunohistochemistry in the detection of plasma cells*. American journal of obstetrics and gynecology, 1983. **147**: p. 812–815-812–815.
37. Fan, X., et al., *Endometrial CD138 count appears to be a negative prognostic indicator for patients who have experienced previous embryo transfer failure*. Fertility and sterility, 2019. **112**: p. 1103–1111-1103–1111.
38. Kannar, V., H.K.M. Lingaiah, and V. Sunita, *Evaluation of endometrium for chronic endometritis by using syndecan-1 in abnormal uterine bleeding*. Journal of laboratory physicians, 2012. **4**: p. 69–73-69–73.
39. Yang, R., et al., *The hysteroscopy and histological diagnosis and treatment value of chronic endometritis in recurrent implantation failure patients*. Archives of gynecology and obstetrics, 2014. **289**: p. 1363–1369-1363–1369.
40. Zolghadri, J., et al., *The value of hysteroscopy in diagnosis of chronic endometritis in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion*. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, 2011. **155**: p. 217–220-217–220.
41. Shah, H.U., et al., *Hysterosalpingography and ultrasonography findings of female genital tuberculosis*. Diagn Interv Radiol, 2015. **21**(1): p. 10-5.
42. Cincinelli, E., et al., *Chronic endometritis in patients with unexplained infertility: Prevalence and effects of antibiotic treatment on spontaneous conception*. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), 2018. **79**.

43. Kitaya, K., et al., *Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure*. American Journal of Reproductive Immunology, 2017. **78**(5): p. e12719-e12719.
44. Cincinelli, E., et al., *Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link*. Fertility and sterility, 2017. **108**: p. 289–295.e1-289–295.e1.
45. Eshre Guideline Group, R.P.L., et al., *ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss*. Human reproduction open, 2018. **2018**: p. hoy004-hoy004.
46. Cakiroglu, Y. and B. Tiras, *Determining diagnostic criteria and cause of recurrent implantation failure*. Current opinion in obstetrics and gynecology, 2020. **32**: p. 198–204-198–204.
47. American Society for Reproductive Medicine, P.C., *Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss a committee opinion*. Fertility and sterility, 2012. **98**: p. 1103–1111-1103–1111.
48. Toth, B., et al., *Recurrent Miscarriage: Diagnostic and Therapeutic Procedures. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k-Level, AWMF Registry Number 015/050)*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2018. **78**: p. 364–381-364–381.
49. Johnston-MacAnanny, E.B., et al., *Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization*. Fertility and sterility, 2010. **93**: p. 437–441-437–441.
50. Kasius, J.C., et al., *The impact of chronic endometritis on reproductive outcome*. Fertility and sterility, 2011. **96**: p. 1451–1456-1451–1456.
51. Kitaya, K., et al., *Chronic Endometritis: Potential Cause of Infertility and Obstetric and Neonatal Complications*. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), 2016. **75**: p. 13–22-13–22.
52. Park, H.J., et al., *Chronic endometritis and infertility*. Clinical and experimental reproductive medicine, 2016. **43**: p. 185–192-185–192.
53. Vitagliano, A., et al., *Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic review and meta-analysis*. Fertility and sterility, 2018. **110**: p. 103–112.e1-103–112.e1.
54. McQueen, D.B., et al., *Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss*. Fertility and sterility, 2015. **104**: p. 927–931-927–931.
55. Paavonen, J., et al., *Chlamydial endometritis*. Journal of clinical pathology, 1985. **38**: p. 726–732-726–732.
56. Bouet, P.E., et al., *Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis*. Fertil Steril, 2016. **105**(1): p. 106-10.
57. Song, D., et al., *Prevalence and confounders of chronic endometritis in premenopausal women with abnormal bleeding or reproductive failure*. Reprod Biomed Online, 2018. **36**(1): p. 78-83.
58. Rosalind Available from: <https://www.rosalind.bio/>.
59. Qiagen, *RNeasy FFPE Handbook*. 2021.
60. NanoString Technologies, I., *nCounter Analysis System User Manual*, I. NaNOString Technologies, Editor. 2018, NanoString Technologies, Inc.
61. Perkins, J.R., et al., *ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 296.
62. NanoString Technologies, I., *nCoutner Advanced Analysis 2.0 Plugin for nSolver Software*, I. NanoString Technologies, Editor. 2018.
63. Hennig, C. PAM. Available from: <https://www.rdocumentation.org/packages/fpc/versions/2.2-9/topics/pamk>.

64. Reimand, J., et al., *Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap*. Nat Protoc, 2019. **14**(2): p. 482-517.
65. RPL, E.G.G.o., et al., *ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022*. Hum Reprod Open, 2023. **2023**(1): p. hado002.
66. Santillan, I., et al., *Where and when should natural killer cells be tested in women with repeated implantation failure?* J Reprod Immunol, 2015. **108**: p. 142-8.
67. Achilles, S.L., A.J. Amortegui, and H.C. Wiesenfeld, *Endometrial plasma cells: do they indicate subclinical pelvic inflammatory disease?* Sex Transm Dis, 2005. **32**(3): p. 185-8.
68. Gilmore, H., D. Fleischhacker, and J.L. Hecht, *Diagnosis of chronic endometritis in biopsies with stromal breakdown*. Hum Pathol, 2007. **38**(4): p. 581-4.
69. Kushnir, V.A., et al., *Systemic Inflammation and Autoimmunity in Women with Chronic Endometritis*. American Journal of Reproductive Immunology, 2016. **75**(6): p. 672-677.
70. Moreno, I., et al., *Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure*. Am J Obstet Gynecol, 2016. **215**(6): p. 684-703.
71. Mlodzik, N., et al., *Endometrial microbiota - do they mean more than we have expected?* Ginekologia polska, 2020. **91**: p. 45-48-45-48.
72. Koopman, L.A., et al., *Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1201-12.
73. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4947-55.
74. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 89-94.
75. Matteo, M., et al., *Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis*. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), 2009. **61**: p. 322-329-322-329.
76. Winger, E.E., et al., *Elevated preconception CD56+ 16+ and/or Th1:Th2 levels predict benefit from IVIG therapy in subfertile women undergoing IVF*. Am J Reprod Immunol, 2011. **66**(5): p. 394-403.
77. Alhalabi, M., et al., *Prednisolone improves implantation in ICSI patients with high peripheral CD69 + NK Cells*. Human Reproduction, 2011. **26**: p. i219.
78. Moraru, M., et al., *Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56(+) cells*. Am J Reprod Immunol, 2012. **68**(1): p. 75-84.
79. Moffett, A. and N. Shreeve, *First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction*. Hum Reprod, 2015. **30**(7): p. 1519-25.
80. Wong, L.F., T.F. Porter, and J.R. Scott, *Immunotherapy for recurrent miscarriage*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **2014**(10): p. CD000112.
81. Martini, A.E., et al., *Evaluating the Utility of Intralipid Infusion to Improve Live Birth Rates in Patients with Recurrent Pregnancy Loss or Recurrent Implantation Failure*. J Hum Reprod Sci, 2018. **11**(3): p. 261-268.
82. Tremellen, K.P. and P. Russell, *The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages*. Journal of reproductive immunology, 2012. **93**: p. 58-63-58-63.
83. Seshadri, S. and S.K. Sunkara, *Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(3): p. 429-38.
84. Li, Y., et al., *Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure*. Fertil Steril, 2020. **113**(1): p. 187-196 e1.
85. Galgani, M., et al., *Regulatory T cells, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in women with defective endometrial receptivity*. Fertil Steril, 2015. **103**(6): p. 1579-86 e1.

86. Gaud, G., R. Lesourne, and P.E. Love, *Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(8): p. 485-497.
87. Bozso, S.J., J.J.H. Kang, and J. Nagendran, *The role of competing mechanisms on Lck regulation*. Immunol Res, 2020. **68**(5): p. 289-295.
88. Upton, J.E.M., et al., *Platelet Activating Factor (PAF): A Mediator of Inflammation*. Biofactors, 2022. **48**(6): p. 1189-1202.
89. Grigg, J., *The platelet activating factor receptor: a new anti-infective target in respiratory disease?* Thorax, 2012. **67**(9): p. 840-1.
90. Ishii, S. and T. Shimizu, *Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice*. Prog Lipid Res, 2000. **39**(1): p. 41-82.
91. Zinatizadeh, M.R., et al., *The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases*. Genes Dis, 2021. **8**(3): p. 287-297.
92. Mitchell, S., J. Vargas, and A. Hoffmann, *Signaling via the NF κ B system*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016. **8**(3): p. 227-41.
93. Xiao, Q.A., et al., *Role of IKK ϵ in the Metabolic Diseases: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 888588.
94. Painter, C.A. and L.J. Stern, *Conformational variation in structures of classical and non-classical MHCII proteins and functional implications*. Immunol Rev, 2012. **250**(1): p. 144-57.
95. Guce, A.I., et al., *HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(1): p. 90-8.
96. Tuckerman, E., et al., *Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage*. Human reproduction (Oxford, England), 2007. **22**: p. 2208–2213-2208–2213.
97. Kitaya, K., *Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages*. Fertility and sterility, 2011. **95**: p. 1156–1158-1156–1158.
98. McQueen, D.B., et al., *Redefining chronic endometritis: the importance of endometrial stromal changes*. Fertil Steril, 2021. **116**(3): p. 855-861.
99. Wu, D., et al., *Chronic endometritis modifies decidualization in human endometrial stromal cells*. Reprod Biol Endocrinol, 2017. **15**(1): p. 16.
100. Sfakianoudis, K., et al., *Efficient treatment of chronic endometritis through a novel approach of intrauterine antibiotic infusion: a case series*. BMC Womens Health, 2018. **18**(1): p. 197.
101. Tersoglio, A.E., et al., *Repeated implantation failure in oocyte donation. What to do to improve the endometrial receptivity?* JBRA Assist Reprod, 2015. **19**(2): p. 44-52.

Anhang: Tabellen

Tabelle 11: Verschiedene Diagnosekriterien der CE

Publikation	Diagnosekriterium
Bouet 2016[56]	IHC ≥ 5 Plasmazellen/10 HPF
Chen 2016[35]	IHC, ≥ 1 Plasmazellen/HPF
Cincinelli 2018[42]	IHC, 1-5 Plasmazellen/HPF
Johnston-MacAnally 2010[29]	IHC, ≥ 1 Plasmazelle/HPF
Kitaya 2011[97]	IHC ≥ 1 Plasmazelle/10HPF, nicht klar definiert
Kitaya 2018[23]	IHC ≥ 2 Plasmazellen
Kushnir 2016[69]	IHC, ≥ 1 Plasmazelle/Schnitt
McQueen 2021[98]	IHC, ≥ 1 Plasmazelle/10HPF mit passenden Stromaveränderungen (z.B. Ödem, Pigment, Hyperzellulartität, spindelige Stromazellen)
Song 2018[57]	IHC, ≥ 1 Plasmazelle/10HPF
Wu 2017[99]	IHC, ≥ 2 Plasmazellen in einem HPF
Zolghadri 2011[40]	≥ 1 Plasmazelle/Schnitt

Tabelle 12: Antibiotische Behandlungskonzepte der chronischen Endometritis

Publikation	Therapie
Cincinelli 2018[42]	Gram- negativer Erreger: Ciprofloxacin 200mg 2x/Tag für 10 Tage Gram-positiver Erreger: Amoxicillin + Clavulansäure 1g 2x/Tag für 8 Tage Mycoplasma/Ureaplasma: Josamicin 1g 2x/Tag für 12 Tage, bei Persistenz Minozyklin oder Doxycyclin 100mg 2x/d Negative Kultur: Ceftriaxon 250mg i.m. als Einmaldosis + Doxycyclin 100mg 2x/Tag für 14 Tage
Johnston-MacAnally 2010[29]	Kalkulierte Therapie, Doxycyclin 100mg 2x/Tag für 2 Wochen, bei persistierender CE anschließend Ciprofloxacin und Metronidazol jeweils 500mg 2x/Tag für 2 Wochen
Kitaya 2017[43]	Kalkulierte Therapie: Vibramyxin 100mg 2x/Tag für 14 Tage
Sfakianoudis 2018[100]	Antibiogrammgerecht, incl. Doxycyclin
Tersoglio 2015[101]	Erregergerecht, falls möglich.

Falls kein Erreger isoliert werden kann: Doxycyclin 200mg/Tag für 14 Tage, anschließend Metronidazol 1g/Tag + Ciprofloxacin 1g/Tag für 14 Tage

Tabelle 13: Automatisches HE-Färbeprotokoll am Pathologischen Institut der LMU

Schritt	Aktion	Dauer in Minuten
1	Startposition	12
2	Trockenstation	2
3	Xylol	2
4	Xylol	1
5	100% Ethanol	0,5
6	96% Ethanol	1
7	70% Ethanol	1
8	Reinigungsstation	0,5
9	Hämalaun	6
10	Reinigungsstation	4
11	70% Ethanol	1
12	Eosin alk.	2,5
13	96% Ethanol	1
14	96% Ethanol	1
15	100% Ethanol	1
16	Xylol	2,5
17	Endposition	

Tabelle 14: BenchMark ULTRA IHC Färbeprotokoll CD56

Schritt	Aktion	Dauer in Minuten
1	Erwärmen des Objekträgers auf 75°C, Inkubation	4
2	Entparaffinierung	
3	Hitzevorbehandlung	
4	ULTRA Conditioner 1 (CC1)	
5	Erwärmen des Objekträgers auf 95°C, Inkubation	8
6	Ultra Conditioner 1	56

7	Erwärmen des Objekträgers auf 37°C, Inkubation	4
8	1 Tropfen CD56 AK auftragen, LCS auftragen, Inkubation	28
9	1 Tropfen CD56 AK auftragen, LCS auftragen, Inkubation	8
10	Gegenfärbung mit einem Tropfen Hämatoxylin, LCS auftragen, Inkubation	4
11	Gegenfärbung mit 1 Tropfen Bluing Agent, LCS auftragen, Inkubation	4

Tabelle 15: BenchMark ULTRA IHC Färbeprotokoll CD138

Schritt	Aktion	Dauer in Minuten
1	Erwärmen des Objekträgers auf 75°C, Inkubation	4
2	Entparaffinierung	
3	Hitzevorbehandlung	
4	ULTRA Conditioner 1 (CC1)	
5	Erwärmen des Objekträgers auf 95°C, Inkubation	8
6	Ultra Conditioner 1	56
7	Erwärmen des Objekträgers auf 37°C, Inkubation	4
8	Handauftrag des CD 138 AK, Inkubation	28
9	Gegenfärbung mit einem Tropfen Hämatoxylin, LCS auftragen, Inkubation	4
10	Gegenfärbung mit 1 Tropfen Bluing Agent, LCS auftragen, Inkubation	4

Tabelle 16: BenchMark ULTRA IHC Färbeprotokoll CD8

Schritt	Aktion	Dauer in Minuten
1	Erwärmen des Objekträgers auf 75°C, Inkubation	4
2	Entparaffinierung	
3	Hitzevorbehandlung	
4	ULTRA Conditioner 1 (CC1)	
5	Erwärmen des Objekträgers auf 95°C, Inkubation	8
6	Ultra Conditioner 1	172
7	Erwärmen des Objekträgers auf 37°C, Inkubation	4
8	Handauftrag des CD8 AK, Inkubation	24

9	Gegenfärbung mit einem Tropfen Hämatoxylin, LCS auftragen, Inkubation	4
10	Gegenfärbung mit 1 Tropfen Bluing Agent, LCS auftragen, Inkubation	4

Tabelle 17: Hybridisierungsprotokoll NanoString

Schritt	Aktion
1	Reporter und Capture Probe werden dem Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut.
2	Pipettierung von 70 µl Hybridisierungspuffer in das Reporter CodeSet Tube, Vermengung durch mehrmaliges Wenden zur Erzeugung des Master Mixes.
3	2 µl Master Mix werden in jedes der zwölf beschrifteten Hybridisierungstubes gefüllt, jedes mit einer frischen Pipette.
4	5 µl der entsprechenden eluierten RNA-Probe werden nun in die korrekten Tubes gegeben
5	Das Capture ProbeSet Tubes wird manuell gewendet und sanft geschüttelt, um es zu homogenisieren.
6	2 µl homogenisiertes ProbeSet wird in jedes Probengefäß pipettiert, die Tubes verschlossen und der Inhalt durch sanftes Schütteln vermengt.
7	Die zwölf Proben werden in den auf 65°C vorgeheizten Thermal Cycler gegeben und für 16 Stunden über Nacht inkubiert.
8	Die Reaktion wird danach auf 4°C gekühlt und automatisiert im nCounter FLEX System ausgewertet.

Tabelle 18: Differentiell exprimierte Gene in der Gegenüberstellung ausgeprägter Endometritiden zum Kontrollkollektiv.

ADGRE5	CD9	HLA-DOB	KIT	PSMD7
BST1	CEACAM1	HLA-DPA1	KLRK1	PTPN22
C1QA	CFI	HLA-DPB1	LAIR1	PTPRC_ALL
C7	CISH	HLA-DQA1	LCK	RELB
CCL5	CLEC4A	HLA-DQB1	LTB4R	RORC
CCR5	CLEC7A	HLA-DRA	LTF	SLAMF7
CD27	CR1	HLA-DRB3	MAF	STAT5A
CD36	CSF2RB	IKBKE	MAP4K1	STAT5B
CD40	DEFB1	IKZF3	MIF	TAGAP
CD45R0	ENTPD1	IL16	NFKB1	TAP1
CD45RA	FCGR2B	IL7R	NFKB2	TCF4
CD74	FCGRT	IRF4	NT5E	TCF7
CD86	FN1	ITGAL	PDGFRB	TGFB1
CD8A	GZMK	ITGB2	PRDM1	TIGIT

Tabelle 19: Genliste nCounter Immunology Panel

ABCB1	C8A	CD2	CDH5	CXCR2
ABL1	C8B	CD209	CDKN1A	CXCR3
ADA	C8G	CD22	CEACAM1	CXCR4
AHR	C9	CD24	CEACAM6	CXCR6
AICDA	CAMP	CD244	CEACAM8	CYBB
AIRE	CARD9	CD247	CEBPB	DEFB1
APP	CASP1	CD27	CFB	DEFB103A
ARG1	CASP10	CD274	CFD	DEFB103B
ARG2	CASP2	CD276	CFH	DEFB4A
ARHGDI1	CASP3	CD28	CFI	DPP4
ATG10	CASP8	CD34	CFP	DUSP4
ATG12	CCBP2	CD36	CHUK	EBI3
ATG16L1	CCL11	CD3D	CIITA	EDNRB
ATG5	CCL13	CD3E	CISH	EGR1
ATG7	CCL15	CD3EAP	CLEC4A	EGR2
ATM	CCL16	CD4	CLEC4E	ENTPD1
B2M	CCL18	CD40	CLEC5A	EOMES
B3GAT1	CCL19	CD40LG	CLEC6A	ETS1
BATF	CCL2	CD44	CLEC7A	FADD
BATF3	CCL20	CD45R0	CLU	FAS
BAX	CCL22	CD45RA	CMKLR1	FCAR
BCAP31	CCL23	CD45RB	CR1	FCER1A
BCL10	CCL24	CD46	CR2	FCER1G
BCL2	CCL26	CD48	CRADD	FCGR1A/B
BCL2L11	CCL3	CD5	CSF1	FCGR2A
BCL3	CCL4	CD53	CSF1R	FCGR2A/C
BCL6	CCL5	CD55	CSF2	FCGR2B
BID	CCL7	CD58	CSF2RB	FCGR3A/B
BLNK	CCL8	CD59	CSF3R	FCGRT
BST1	CCND3	CD6	CTLA4-TM	FKBP5
BST2	CCR1	CD7	CTLA4_all	FN1
BTK	CCR10	CD70	CTNNB1	FOXP3
BTLA	CCR2	CD74	CTSC	FYN
C14orf166	CCR5	CD79A	CTSG	GATA3
C1QA	CCR6	CD79B	CTSS	GBP1
C1QB	CCR7	CD80	CUL9	GBP5
C1QBP	CCR8	CD81	CX3CL1	GFI1
C1R	CCRL1	CD82	CX3CR1	GNLY
C1S	CCRL2	CD83	CXCL1	GP1BB
C2	CD14	CD86	CXCL10	GPI
C3	CD160	CD8A	CXCL11	GPR183
C4A/B	CD163	CD8B	CXCL12	GZMA
C4BPA	CD164	CD9	CXCL13	GZMB
C5	CD19	CD96	CXCL2	GZMK
C6	CD1A	CD97	CXCL9	HAMP
C7	CD1D	CD99	CXCR1	HAVCR2

HFE	IL13	IRAK2	LAG3	MYD88
HLA-A	IL13RA1	IRAK3	LAIR1	NCAM1
HLA-B	IL15	IRAK4	LAMP3	NCF4
HLA-C	IL16	IRF1	LCK	NCR1
HLA-DMA	IL17A	IRF3	LCP2	NFATC1
HLA-DMB	IL17B	IRF4	LEF1	NFATC2
HLA-DOB	IL17F	IRF5	LGALS3	NFATC3
HLA-DPA1	IL18	IRF7	LIF	NFIL3
HLA-DPB1	IL18R1	IRF8	LILRA1	NFKB1
HLA-DQA1	IL18RAP	IRGM	LILRA2	NFKB2
HLA-DQB1	IL19	ITGA2B	LILRA3	NFKBIA
HLA-DRA	IL1A	ITGA4	LILRA4	NFKBIZ
HLA-DRB1	IL1B	ITGA5	LILRA5	NLRP3
HLA-DRB3	IL1R1	ITGA6	LILRA6	NOD1
HRAS	IL1R2	ITGAE	LILRB1	NOD2
ICAM1	IL1RAP	ITGAL	LILRB2	NOS2
ICAM2	IL1RL1	ITGAM	LILRB3	NOTCH1
ICAM3	IL1RL2	ITGAX	LILRB4	NOTCH2
ICAM4	IL1RN	ITGB1	LILRB5	NT5E
ICAM5	IL2	ITGB2	LITAF	PAX5
ICOS	IL20	ITLN1	LTA	PDCD1
ICOSLG	IL21	ITLN2	LTB4R	PDCD1LG2
IDO1	IL21R	JAK1	LTB4R2	PDCD2
IFI16	IL22	JAK2	LTBR	PDGFB
IFI35	IL22RA2	JAK3	LTf	PDGFRB
IFIH1	IL23A	KCNJ2	LY96	PECAM1
IFIT2	IL23R	KIR3DL1	MAF	PIGR
IFITM1	IL26	KIR3DL2	MALT1	PLA2G2A
IFNA1/13	IL27	KIR3DL3	MAP4K1	PLA2G2E
IFNA2	IL28A	KIR_Activating_Sub-group_1	MAP4K2	PLAU
IFNAR1	IL28A/B	KIR_Activating_Sub-group_1	MAP4K4	PLAUR
IFNAR2	IL29	KIR_Activating_Sub-group_2	MAPK1	PML
IFNB1	IL2RA	KIR_Inhibiting_Sub-group_1	MAPK11	POU2F2
IFNG	IL2RB	KIR_Inhibiting_Sub-group_1	MAPK14	PPARG
IFNGR1	IL2RG	KIR_Inhibiting_Sub-group_2	MAPKAPK2	PPBP
IGF2R	IL3	KIT	MARCO	PRDM1
IKBKAP	IL32	KLRAP1	MASP1	PRF1
IKBKB	IL4	KLRB1	MASP2	PRKCD
IKBKE	IL4R	KLRC1	MBL2	PSMB10
IKBKG	IL5	KLRC2	MBP	PSMB5
IKZF1	IL6	KLRC3	MCL1	PSMB7
IKZF2	IL6R	KLRC4	MIF	PSMB8
IKZF3	IL6ST	KLRD1	MME	PSMB9
IL10	IL7	KLRF1	MR1	PSMC2
IL10RA	IL7R	KLRF2	MRC1	PSMD7
IL11RA	IL8	KLRG1	MS4A1	PTAFR
IL12A	IL9	KLRG2	MSR1	PTGER4
IL12B	ILF3	KLRK1	MUC1	PTGS2
IL12RB1	IRAK1		MX1	PTK2

PTPN2	SLAMF7	TFRC	TNFRSF14	XBP1
PTPN22	SLC2A1	TGFB1	TNFRSF17	XCL1
PTPN6	SMAD3	TGFBI	TNFRSF1B	XCR1
PTPRC_all	SMAD5	TGFBR1	TNFRSF4	ZAP70
PYCARD	SOCS1	TGFBR2	TNFRSF8	ZBTB16
RAF1	SOCS3	THY1	TNFRSF9	ZEB1
RAG1	SPP1	TICAM1	TNFSF10	sCTLA4
RAG2	SRC	TIGIT	TNFSF11	ABCF1
RARRES3	STAT1	TIRAP	TNFSF12	ALAS1
RELA	STAT2	TLR1	TNFSF13B	EEF1G
RELB	STAT3	TLR2	TNFSF15	G6PD
RORC	STAT4	TLR3	TNFSF4	GAPDH
RUNX1	STAT5A	TLR4	TNFSF8	GUSB
S100A8	STAT5B	TLR5	TOLLIP	HPRT1
S100A9	STAT6	TLR7	TP53	OAZ1
S1PR1	SYK	TLR8	TRAF1	POLR1B
SELE	TAGAP	TLR9	TRAF2	POLR2A
SELL	TAL1	TMEM173	TRAF3	PPIA
SELPLG	TAP1	TNF	TRAF4	RPL19
SERPING1	TAP2	TNFAIP3	TRAF5	SDHA
SH2D1A	TAPBP	TNFAIP6	TRAF6	TBP
SIGIRR	TBK1	TNFRSF10C	TYK2	TUBB
SKI	TBX21	TNFRSF11A	UBE2L3	
SLAMF1	TCF4	TNFRSF13B	VCAM1	
SLAMF6	TCF7	TNFRSF13C	VTN	

Tabelle 20: NanoString-Kollektiv, RNA-Extraktion

Interne Nr	Gruppe	RNA-Konz. ng/µg (Nanopdrop)	Ratio 260/280	150ng RNA/ max 5µg	Einsatz Hybridi- sierung µg	H ₂ O µl	NanoString Cartridge id
1	+	53,59	1,73	2,8	2,8	2,2	C1
2	+	19,01	1,86	7,9	5,0	0,4	C1
3	+	116,75	1,95	1,3	1,3	3,7	C1
4	+	312,39	1,96	0,5	0,5	4,5	C1
5	+	154,63	1,97	1,0	1,0	4,0	C1
6	+	139,3	1,9	1,1	1,1	3,9	C1
13	-	36,07	1,89	4,2	4,2	0,8	C1
14	-	483,17	1,96	0,3	0,3	4,7	C1
15	-	81,69	1,65	1,8	1,8	3,2	C1
16	-	200,09	1,88	0,7	0,7	4,3	C1
17	-	228,92	1,79	0,7	0,7	4,3	C1
18	-	383,54	1,92	0,4	0,4	4,6	C1
7	+	96,13	1,94	1,65	1,6	3,4	C2
8	+	32,26	1,76	4,6	4,6	0,4	C2
9	+	25,94	1,72	5,8	5,0	0,2	C2
10	+	31,07	1,96	4,8	4,8	0,2	C2
11	+	111,38	1,64	1,3	1,3	3,7	C2
12	+	410,01	1,97	0,4	0,4	4,6	C2
19	-	9,83	1,97	15,3	5,0	0,2	C2
20	-	92,97	1,71	1,6	1,6	3,4	C2
21	-	484,01	2	0,3	0,3	4,7	C2
22	-	139,84	1,64	1,1	1,1	3,9	C2
23	-	113,55	2	1,3	1,3	3,7	C2
24	-	238,58	1,98	0,6	0,6	4,4	C2

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuerst Frau Prof. Dr. med Doris Mayr, die mich durch ihre Begeisterung für Gynäkopathologie zu dem Projekt der chronischen Endometritis führte und mit Fachwissen, Empathie und Geduld jederzeit unterstützt hat.

In gleichem Maße zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg Kumbrink. Nicht nur in der Methodik und Interpretation des molekularpathologischen Teiles, sondern auch darüber hinaus beantwortete er meine Fragen mit Rat und Expertise, Ruhe und Nachsichtigkeit. Ohne Ihn wäre mir die Vollendung dieser Arbeit nur schwer möglich gewesen.

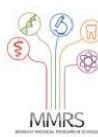
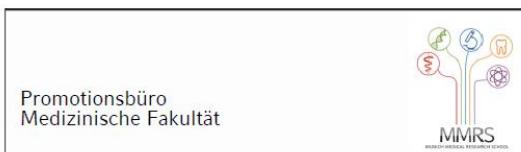
Bedanken möchte ich mich darüber hinaus herzlich bei Frau Sabine Sagebiel-Kohler für die verlässliche Schnelligkeit und Präzision in der RNA-Präparation und Nanostring-Analyse.

Ich danke Frau PD Dr. med. Elisa Schmoeckel für die Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Christian Thaler und Frau Dr. med. Corinna Mann danke ich für die ertragreiche und harmonische Kooperation.

Schließlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Frederick Klauschen und Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner sowie dem Archiv und Labor des Pathologischen Instituts der LMU für ihre andauernde und große Unterstützung.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Erdelkamp, Robert

Name, Vorname

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

***Die chronische Endometritis im Kontext der Kinderwunschdiagnostik:
Morphologische, immunhistochemische und molekulare Untersuchungen an Endometri-
umsbiopsien bei unerfülltem Kinderwunsch***

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.

München, den 17.03.2024

Robert Erdelkamp

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Publikationsliste

Tritschler S, Erdelkamp R, Stief C, Henrich M. *Neuroendokrines Prostatakarzinom [Neuroendocrine prostate cancer]*. Pathologe. 2018 Jul;39(4):333-343.