

Freie Universität



Berlin

Expression und Regulation des Trefoil factor 3-Peptides in klinischer und experimenteller Endometriose

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diana Henze

aus Moskau

Januar 2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2011 bis Dezember 2013 in der Abteilung *Gynecological Therapies* der Bayer Pharma AG in Berlin unter der wissenschaftlichen Leitung und Betreuung von Dr. Isabella Gashaw und Dr. Wolf-Dietrich Döcke durchgeführt.

1. Gutachter: Dr. med. Thomas M. Zollner

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias F. Melzig

Disputation am: 09.05.2014

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Isabella Gashaw und Dr. Wolf-Dietrich Döcke für ihre ausgezeichnete Betreuung während meiner Doktorarbeit bei der Bayer Pharma AG bedanken. Nur durch ihre unermüdliche Unterstützung und ihre ständige Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen war diese Arbeit überhaupt erst möglich.

Herrn Dr. Thomas M. Zollner danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung *Gynecological Therapies* der Bayer Pharma AG anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig gilt mein Dank für das Vertreten dieser Arbeit vor dem Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin und für seine Bereitschaft bei Fragen aller Art stets zur Stelle zu sein.

Frau Dr. Kathrin Machens (Bayer Pharma AG) danke ich für die Bereitstellung der humanen Serumproben und Frau Prof. Dr. Daniela Hornung (ehemals Universitätskrankenhaus Lübeck) für die Bereitstellung der humanen Peritonealflüssigkeiten.

Dr. Oliver von Ahsen und Kirsten Steiner-Hahn (Bayer Pharma AG) danke ich für die Durchführung der In-situ-Hybridisierung und die kritische und hilfreiche Diskussion der Daten.

Inoncent Agueusop danke ich für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen aller Art.

Mein ganz besonderer Dank gilt Martina Backhus, Michaela Nieter, Stefan Wisniewski und allen hier nicht genannten fleißigen Operateuren, die mich bei der Durchführung der Tierstudien so tatkräftig unterstützt haben. Daniela Eisenbeiser, Antje Häußler sowie Anne Yakubu möchte ich herzlich danken, dass sie mir diverse Methoden der Molekularbiologie und Zellkultur näher gebracht haben und mir bei Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Den Doktoranden, Postdocs und lieben Kollegen von Bayer, insbesondere Michael Krzemien, danke ich ganz herzlich für die Unterstützung, den Beistand und für all die Aktivitäten abseits der Arbeit. Ganz besonderer Dank gilt dabei auch dir Anna, da du mir so manchen Büro- und Laboralltag verschönert hast und bei Rückschlägen immer ein offenes Ohr hattest.

Eric, dir möchte ich für deine Geduld und liebevolle Unterstützung danken, die du mir stets entgegen bringst.

Meine Promotion und der Weg dorthin, wären ohne die Inspiration und bedingungslose Unterstützung meiner Familie nicht denkbar gewesen. Den allergrößten Dank möchte ich daher meinen Eltern, meinen Großeltern, Maria und Oliver aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Endometriose	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Krankheitsbild	2
1.1.3 Definition und Klassifizierung	3
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese	3
1.1.5 Diagnostik	4
1.1.6 Hormonelle Aspekte	4
1.1.7 Therapie	6
1.1.7.1 Operative Therapie	6
1.1.7.2 Medikamentöse Therapie	7
1.1.8 Ausgewählte Pathophysiologie	9
1.1.8.1 Immunologische und inflammatorische Aspekte	9
1.1.8.2 Bedeutung epithelialer Zell-Zell-Kontakte	10
1.1.8.3 Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen	11
1.1.8.4 Bedeutung von Wachstumsfaktoren	12
1.1.9 Tiermodelle	12
1.2 Trefoil factor 3	14
1.2.1 Familie der Trefoilpeptide	14
1.2.2 Vorkommen und Funktion von TFF3	15
1.3 Arbeitshypothese und Fragestellung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Verwendete Materialien	17
2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen	17
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Proteine und Arzneimittel	18
2.1.3 Kits, Assays und Mastermixe	19

2.1.4	Labor- und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.5	Laborgeräte	20
2.1.6	Verwendete Software	21
2.2	Probenmaterial von Patientinnen mit Endometriose	22
2.2.1	Eutopes und ektopes Endometrium	22
2.2.2	Peritonealflüssigkeit	22
2.2.2.1	Probengewinnung und Patientenkollektiv	22
2.2.2.2	Multiplexanalyse von Proteinen in Peritonealflüssigkeiten	23
2.2.3	Serum	24
2.2.3.1	Probengewinnung und Patientenkollektiv	24
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von TFF3 in Seren	25
2.3	Tierexperimentelle Methoden	26
2.3.1	Versuchstiere	26
2.3.2	Syngenes Transplantationsmodell	26
2.3.2.1	Experimentelles Design	26
2.3.2.2	Narkose	28
2.3.2.3	Gewinnung von Uterusfragmenten	28
2.3.2.4	Transplantation von Uterusfragmenten	28
2.3.2.5	Sektion und Probengewinnung	29
2.3.2.6	Aufarbeitung von Peritoneallavagen und Blutproben	30
2.4	Zellbiologische Methoden	31
2.4.1	Verwendete Zellen und Zellkulturmedien	31
2.4.2	Zellkultivierung	32
2.4.3	TFF3-Stimulation in ECC-1-Zellen	32
2.4.4	Herstellung von estrogenfreiem Serum	33
2.4.5	17 β -Estradiol-Stimulation in ECC-1-Zellen	33
2.4.6	Zellviabilitäts-Assays	34
2.4.6.1	CellTiter-Glo [®] Viabilitäts-Assay	34
2.4.6.2	ApoLive-Glo [™] Multiplex Viabilitäts- und Apoptose-Assay	34
2.4.6.3	BrdU Cell Proliferation ELISA	36
2.5	Immunologische und molekularbiologische Methoden	37
2.5.1	Histologische Untersuchung zur TFF3-Expression in Endometrium	37
2.5.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	37
2.5.1.2	Immunhistochemie	37
2.5.1.3	In-situ-Hybridisierung	38

2.5.2	TFF3-Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten mittels ELISA	39
2.5.2.1	TFF3-Bestimmung in humanen Seren	39
2.5.2.2	TFF3-Bestimmung in murinen Peritoneallavagen und Seren	40
2.5.3	Bestimmung Akuter-Phase-Proteine in murinen Seren	41
2.5.4	Genexpressionsanalyse von Zellysaten mittels RT-PCR	42
2.5.4.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellysaten	42
2.5.4.2	Quantitative Analyse isolierter RNA	42
2.5.4.3	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	42
2.5.4.4	Real-Time TaqMan® PCR	43
2.5.4.5	Berechnung der relativen Expression von Zielgenen	44
2.6	Statistische Analyse	45
3	Ergebnisse	47
3.1	TFF3-Studien in klinischer Endometriose	47
3.1.1	TFF3-Expression in eutopem und ektopem Endometrium	47
3.1.2	Proteinanalyse in Peritonealfüssigkeiten	49
3.1.2.1	TFF3-Konzentrationen in Peritonealfüssigkeiten	49
3.1.2.2	Regulierte Proteine in Peritonealfüssigkeiten	50
3.1.2.3	Zusammenhang von TFF3-Spiegeln mit denen regulierter Proteinen	50
3.1.3	TFF3-Spiegel in Seren	53
3.2	TFF3-Studien im Mausmodell für Endometriose	55
3.2.1	Syngenes Transplantationsmodell	55
3.2.1.1	Hormonstatus der Tiere anhand des Uterusgewichts	55
3.2.1.2	Wachstum und Entwicklung der Läsionen über die Zeit	56
3.2.2	Milzgewicht als Indikator für systemische Inflammation	58
3.2.3	Akute-Phase-Proteine in Seren	60
3.2.4	TFF3-Konzentrationen in Peritoneallavagen	62
3.2.5	TFF3-Konzentrationen in Seren	64
3.2.6	TFF3-Expression in Läsionen und Uteri	65
3.3	TFF3-Studien im endometrialen Zellkulturmodell	66
3.3.1	TFF3-Regulation durch Stimulation mit 17 β -Estradiol und TNF α	66
3.3.2	Stimulation mit rekombinantem TFF3	69
3.3.2.1	Genexpression nach Stimulation mit TFF3 und Kostimulation mit TNF α	69
3.3.2.2	Zellviabilität, Apoptose und Proliferation nach Stimulation mit TFF3 und Kostimulation mit TNF α	72

4 Diskussion	77
4.1 TFF3 in klinischer und experimenteller Endometriose	78
4.1.1 Regulierte Proteine in der Peritonealflüssigkeit	78
4.1.1.1 TFF3	78
4.1.1.2 Auswahl relevanter Proteine	79
4.1.2 TFF3 im Rahmen systemischer Inflammation	82
4.1.3 TFF3-Expression in eutopem und ektopem Endometrium	84
4.1.4 Regulation systemischer TFF3-Spiegel	86
4.1.4.1 TFF3-Regulation bei Endometriose	86
4.1.4.2 TFF3-Regulation während des Menstruationszyklus	87
4.1.5 TFF3 im endometrialen Zellkulturmodell	88
4.1.5.1 TFF3-Regulation durch 17 β -Estradiol	88
4.1.5.2 Funktionelle Wirkung von TFF3	89
4.2 TFF3 und seine potenzielle Beteiligung an der Pathogenese der Endometriose . .	91
4.3 Ausblick	94
Zusammenfassung	95
Summary	97
Literaturverzeichnis	99
Publikationen	113
Lebenslauf	115

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APC	Adenomatous polyposis coli
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromdesoxyuridin
C	naive Kontrollgruppe
CA 19-9	Cancer-Antigen 19-9
CA 125	Cancer-Antigen 125
CCS	<i>Charcoal Stripped Serum</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	17 β -Estradiol
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER α	Estrogenrezeptor α
ER β	Estrogenrezeptor β
ERE	estrogenresponsives Element
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	fötale Kälberserum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
HET-CAM	Hühnerei-Test an der Chorion-Allantois-Membran
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin

KG	Körpergewicht
L	Läsion (auch: Liter)
LH	luteinisierendes Hormon
MAP	<i>Multi Analyte Profiling</i>
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktorprotein-1
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NSARs	nicht-steroidale Antirheumatika
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Peroxidase
PR	Progesteronrezeptor
rAFS	<i>revised American Fertility Society</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAA-3	Serum Amyloid A3
SAP	Serum Amyloid P
SD	Standardabweichung
S	Suturen (Fäden)
TFF	<i>Trefoil Factor Family</i>
TFF3	<i>Trefoil factor 3</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
Wnt	<i>Wingless/int</i>
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Exzitationswellenlänge

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Endometriose

Die Endometriose¹ ist eine der häufigsten, gutartigen gynäkologischen Erkrankungen junger Mädchen und Frauen. Sie ist eine chronische, inflammatorische Erkrankung, bei der endometriales Drüsengewebe² ektop, also außerhalb der Gebärmutterhöhle auftritt. Endometriotische Läsionen befallen dabei unterschiedliche Gewebe und Organe des Bauchraums. Überwiegend betroffen sind das Peritoneum³, die Ovarien und Tuben⁴, das Myometrium⁵, die Blasen- und Darmwand sowie der Bereich zwischen Vagina und Kolon (siehe Abbildung 1.1). In sehr seltenen Fällen werden Endometrioseherde auch außerhalb der Bauchhöhle beschrieben, wie beispielsweise in der Lunge, der Nasenschleimhaut oder dem Gehirn (184, 212).

1.1.1 Epidemiologie

Die Endometriose zählt neben den Myomen zu der häufigsten, gutartigen proliferativen Erkrankung der Frau im geschlechtsreifen Alter. Schätzungsweise sind 10 bis 15 % der Frauen im Alter zwischen 15 und 50 Jahren von der Erkrankung betroffen. Für Deutschland bedeutet das etwa 1,5 Millionen Endometriosepatientinnen und etwa 40.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Weltweit sind es bis zu 176 Millionen Frauen, die an Endometriose leiden (190). Hinzu kommt, dass ein Teil der Frauen asymptomatisch ist und eine Diagnose in vielen Fällen erst sehr spät gestellt wird.

¹von altgr. *endon* 'innen', *metra* 'Gebärmutter' und *osis* 'Erkrankung'

²Gebärmutterschleimhaut

³Bauchfell

⁴Eierstöcke und Eileiter

⁵glatte Muskulatur der Gebärmutter

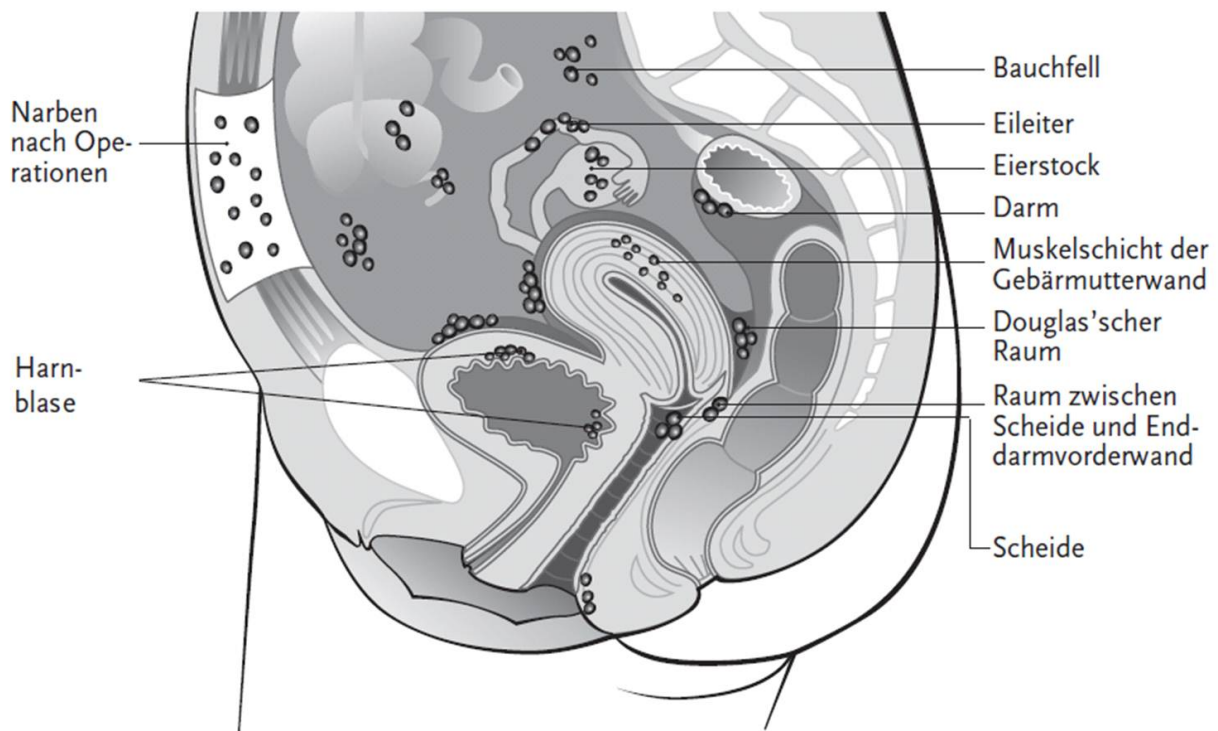


Abbildung 1.1: Mögliches Vorkommen der Endometrioseläsionen im Bauchraum der Frau (15).

1.1.2 Krankheitsbild

Endometriose ist assoziiert mit einer Vielzahl von Symptomen. Die meisten Frauen leiden vor allem unter starken chronischen Unterbauchschmerzen. Diese können sich auch als sekundäre Dysmenorrhö⁶, Dyspareunie⁷ oder Rückenschmerzen äußern. Je nach Ausprägung der Symptome sind Leistungs- und Arbeitsfähigkeit, Sexualleben sowie die allgemeine Lebensqualität mehr oder weniger stark beeinträchtigt (190). Nicht zu unterschätzen ist auch die psychische und mentale Belastung, unter der die betroffenen Frauen leiden.

Darüber hinaus wird ein enger Zusammenhang zwischen Endometriose und Infertilität beschrieben. Studien konnten zeigen, dass 25 bis 50 % der Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch an Endometriose leiden (150). Umgekehrt ist bei jeder zweiten Endometriosepatientin eine reduzierte Fertilität zu beobachten (150). Die genaue Ursache ist noch unklar. Vermutet wird unter anderem, dass die erhöhten Spiegel verschiedener Entzündungsmediatoren, induziert vor allem durch Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interferon gamma (IFN γ) die Spermienmotilität sowie die Implantation des Embryos negativ beeinflussen (155, 233).

⁶mit krampfartigen Schmerzzuständen einhergehende Menstruation

⁷Schmerzen beim Geschlechtsverkehr

1.1.3 Definition und Klassifizierung

Als Endometriose wird das Vorkommen von endometriumähnlichen Zellverbänden aus Epithel und Stroma außerhalb der Gebärmutterhöhle bezeichnet. Verschiedene Wachstumsformen werden als kleinherdig-peritoneal, zystisch-ovariell oder tief infiltrierend beschrieben (154). Anhand ihrer Lokalisation wird die Endometriose in der deutschsprachigen Literatur in drei verschiedene Formen unterteilt (80):

- *Endometriosis genitalis interna*:
auch *Adenomyosis uteri* genannt, Lokalisation innerhalb des Myometriums;
- *Endometriosis genitalis externa*:
Lokalisation im Bereich der inneren weiblichen Genitalien (insbesondere an den Ovarien);
- *Endometriosis extragenitalis*:
Lokalisation z. B. an Darm, Harnblase, Vagina, Lunge und allen weiteren Organen.

Die Klassifizierung der Endometriose wird noch immer unterschiedlich gehandhabt. Es gibt verschiedene Ansätze, die Vergleichbarkeit der Befundausprägung zu ermöglichen. Dabei werden verschiedene Kriterien, wie die Lokalisation, die Ausdehnung und die Größe der Herde sowie deren Folgeschäden herangezogen. Verschiedene Schweregrade werden heute meist mit Hilfe des *revised American Fertility Society* (rAFS)-Systems klassifiziert (242). Dieses ist international am weitesten verbreitet und arbeitet mit einem Punktesystem, bei dem in vier Stadien von *leicht* bis *schwer* unterschieden wird (154). Beurteilt werden Größe und Infiltrationstiefe von Läsionen im Bereich des Peritoneums und der Ovarien sowie die Ausdehnung und Beschaffenheit von Adhäsionen. Anhand der Gesamtpunktzahl erfolgt die Einteilung in die Stadien rAFS I bis rAFS IV. Extragenitale Befunde gehen in die Beurteilung jedoch nicht mit ein und auch tief infiltrierende Endometriose wird in dieser Einteilung nicht berücksichtigt (154).

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Obwohl die Endometriose bereits im späten 17. Jahrhundert erstmals beschrieben wurde (112), sind Ursache und Pathophysiologie bis heute ungeklärt. Es existieren verschiedene Theorien über die Entstehung, wobei keine davon allgemeingültig die bekannten Formen erklären kann. Vermutlich findet ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren statt. Die unterschiedlichen Hypothesen lassen sich auf zwei Grundideen zurückführen: Eine geht davon aus, dass Endometriumszellen unter anderem über lymphatische oder vaskuläre Wege sowie bei invasiven chirurgischen Eingriffen verschleppt werden. Anschließend sind diese aufgrund noch ungeklärter immunologischer Veränderungen in der Lage, am Peritoneum und den betroffenen Organen zu adhären. Die bekannteste und verbreitetste Theorie dieser Gruppe ist die „Transplantationstheorie“ nach Sampson, die auf der Annahme beruht, dass vitale Endometriumszellen durch retrograde Menstruation in das Abdomen gelangen und dort Läsionen ausbilden (180).

Weniger verbreitet sind Theorien über metaplastische Vorgänge im Peritoneum. Diese besagen, dass pluripotente Zellen des Zölomepithels in der Lage sind, sich durch verschiedene Stimuli (z. B. Inflammation oder Hormone) in Endometriumszellen umzuwandeln (143). Gerne wird diese Theorie mit der Beobachtung begründet, dass in Ausnahmefällen auch Männer mit Prostatakarzinom unter Estrogentherapie endometriumähnliches Gewebe ausbildeten (158, 164). Unerwähnt bleibt meist, dass es sich dabei um Läsionen im Karzinomgewebe der Prostata und nicht etwa auf dem Peritoneum handelte. Dies weist vielmehr auf durch Estrogentherapie stimulierte Überreste des Müller'schen Gangs hin (59).

1.1.5 Diagnostik

Typische Symptomatiken wie starke Unterbauchschmerzen und andere uncharakteristische Bauch- und Rückenbeschwerden können nur als Hinweis auf eine vorhandene Endometriose dienen. Problematisch ist die fehlende Spezifität sowie die Tatsache, dass auch asymptomatische Formen auftreten können. Da die Symptomatik so variabel und individuell ist, kommt es meist zu einer erheblichen Verzögerung der Diagnosestellung von durchschnittlich sechs Jahren (189). Eine frühzeitige Diagnose ist jedoch ausgesprochen wichtig, da frühe Erkrankungsformen noch deutlich besser auf medikamentöse Therapien ansprechen (187). Dies liegt unter anderem daran, dass in den frühen Stadien noch eine höhere Aktivität der Läsionen vorliegt und es zu einer vermehrten Prostaglandin- und Zytokinausschüttung kommt als in fortgeschrittenen Stadien (190).

Zur differentialdiagnostischen Abklärung werden unter anderem folgende nicht-invasive Untersuchungsmethoden herangezogen: gründliche Anamnese, Beurteilung der Schmerzintensität, gynäkologische Untersuchung und bildgebende Verfahren wie Ultraschall oder Magnetresonanztomographie. Biochemische Marker wie Cancer-Antigen 125 (CA 125) können erhöht sein, haben sich zur Diagnosestellung der Endometriose jedoch nicht bewährt (152). Keine dieser Methoden ist in der Lage, den Goldstandard, die Biopsie mit histologischer Sicherung von endometrialem Drüsengewebe aus Stroma- und Epithelzellen zu ersetzen. Die histologische Abklärung muss im Rahmen einer Laparoskopie erfolgen und ist bis heute die einzige sichere Möglichkeit der Diagnosestellung in der Endometriose. Alle Bemühungen, die Endometriose nicht invasiv anhand von verschiedenen potenziellen Biomarkern im peripheren Blutkreislauf zu diagnostizieren, waren bisher vergeblich.

1.1.6 Hormonelle Aspekte

Die Endometriose tritt fast ausschließlich bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter auf und bildet sich in der Menopause oder nach Ovariectomie wieder zurück (149). Dies beruht vor allem auf dem Einfluss von Estrogen, welches das Wachstum endometrialer Zellen steuert und somit auch für die Aktivität von Endometrioseherden verantwortlich ist.

Im Rahmen des Menstruationszyklus durchläuft das eutope Endometrium im Uterus verschiedene Phasen des Auf- und Abbaus (siehe Abbildung 1.2). In der Proliferationsphase regeneriert sich unter dem Einfluss von Estradiol die bei der Menstruation abgestoßene Funktionalis (oberste Endometriumsschicht) und wird neu aufgebaut. Nach der Ovulation kommt es zu einer vermehrten Produktion von Progesteron durch das Corpus luteum (Gelbkörper). Dies bewirkt die Differenzierung der endometrialen Stromazellen in Deziduazellen, welche durch eine gesteigerte sekretorische Aktivität das Endometrium optimal für die mögliche Einnistung einer befruchteten Eizelle vorbereiten. Bei nicht erfolgter Befruchtung kommt es durch Niedergang des Corpus luteums zu einem Abfall des Progesteronspiegels und zu einer Minderdurchblutung der Funktionalis mit der Folge nekrotischer Veränderungen. Durch Einleiten der Menstruation kommt es schließlich zur Ausscheidung des abgestoßenen Gewebes.

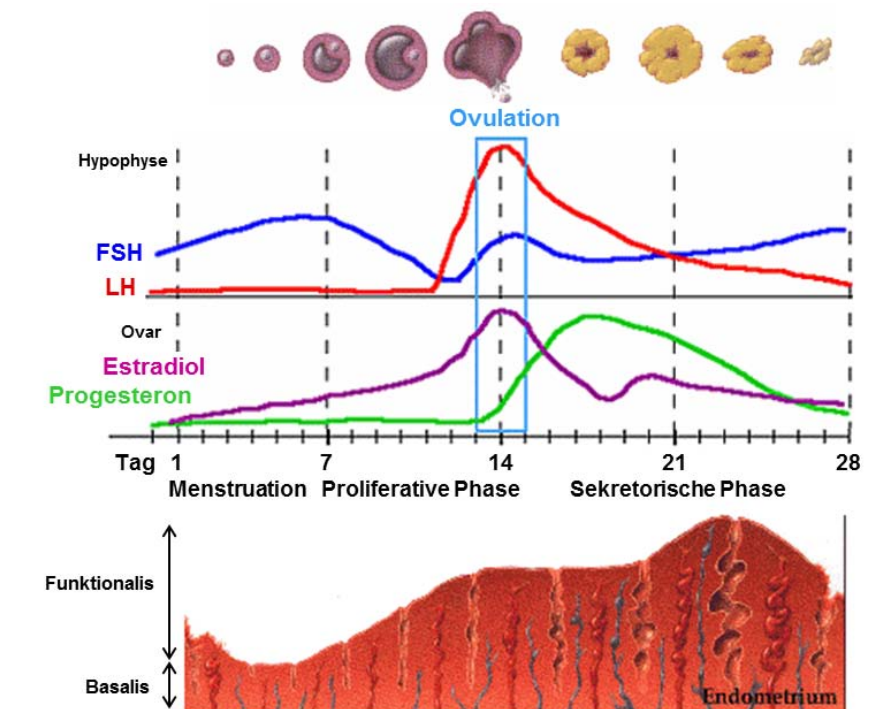


Abbildung 1.2: Menstruationszyklus der Frau (Abb. modifiziert nach (16)). Die Dauer eines Menstruationszyklus beträgt im Durchschnitt 28 Tage. Die hormonelle Regulation wird durch die Synthese und Sekretion von Follikel-stimulierendem (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) durch die Hypophyse gesteuert. Der erste Tag des Zyklus beginnt mit der *Menstruation*, bei der die oberste Schicht des Endometriums, die Funktionalis, abgestoßen und mit der Menstruationsblutung ausgeschieden wird. Während der darauf folgenden *proliferativen Phase* reifen in den Ovarien mehrere Follikel heran. Der dadurch ansteigende Estrogenspiegel führt zu einer Regeneration und Proliferation des Endometriums. Zwischen dem 12. und 14. Zyklustag kommt es zu einem maximalen Estrogenanstieg, welcher durch eine positive Rückkopplung zu einer massiven Freisetzung von LH aus der Hypophyse führt. Durch diesen LH-Peak kommt es etwa 24 h später zur Ruptur des ausgereiftesten Follikels und somit zur Ovulation. Der kollabierte Follikel wandelt sich anschließend unter Einfluss von LH in das Progesteron-ausschüttende Corpus luteum (Gelbkörper) um. Unter dem Einfluss des Progesterons kommt es in der *sekretorischen Phase* zu einer Umwandlung des Endometriums (Dezidualisierung), welches anschließend optimal für die Einnistung einer befruchteten Eizelle vorbereitet ist. Erfolgt keine Befruchtung, geht das Corpus luteum zu Grunde. Dies führt zum Absinken des Progesteronspiegels und somit zu einer regressiven Veränderung der Funktionalis. Durch die Verengung von Gefäßen kommt es zu einer lokalen Minderdurchblutung (Ischämie) mit nachfolgender Gewebeschädigung. Kontraktionen des Myometriums bewirken anschließend die Ausscheidung der abgestoßenen Funktionalis im Rahmen der *Menstruation* mit Beginn eines neuen Zyklus.

Die zyklischen Veränderungen im Endometrium werden vorwiegend durch das Zusammenspiel von Estrogen und Progesteron gesteuert. Ihre Wirkung wird durch intrazelluläre Rezeptoren vermittelt: Estrogenrezeptor α (ER α) und β (ER β) bzw. Progesteronrezeptor A (PR-A) und B (PR-B). In den Rezeptoren kommt es nach Bindung der Liganden zu einer Konformationsänderung mit anschließender Dimerisierung. Die Rezeptorpaare sind nun in der Lage, als Transkriptionsfaktoren an bestimmten Erkennungssequenzen der DNA, den estrogenresponsiven Elementen (ERE), anzudocken und somit eine gesteigerte Abschreibung estrogenregulierter Gene zu bewirken.

Zahlreiche Studien zeigten ein abweichendes Expressionsmuster von Progesteron- und Estrogenrezeptoren in den Endometrioseherden, im Vergleich zum normalen Endometrium (19, 29, 168). Zum einen fiel die Rezeptordichte in den ektopen Läsionen insgesamt deutlich niedriger aus, was eine Ursache für die Therapieresistenz gegenüber Steroidhormonen, insbesondere Progesteron, sein könnte (28). Zum anderen wird eine von Läsion zu Läsion variierende Verteilung beider Rezeptorarten beschrieben, was vermutlich die unterschiedliche Erfolgsrate der Hormontherapie bei Endometriose erklärt (30, 130). Des Weiteren wurde ein verändertes Verhältnis der beiden Estrogenrezeptoren zugunsten des ER β beschrieben (32). Während durch den ER α vor allem die proliferative Wirkung von Estradiol vermittelt wird, führt die Aktivierung des ER β zu einer verstärkten Expression von Cyclooxygenase 2 (COX-2) (10). COX-2 katalysiert die Synthese verschiedener Prostaglandine, die wiederum die Inflammation verstärken und als Schmerzmediatoren agieren. Prostaglandin E₂ ist durch Stimulation der Aromatase-Expression auch an der lokalen Estrogenproduktion beteiligt (157). Aromatase steuert die Synthese von Estradiol aus Androgenen und wurde in ektopen Läsionen, nicht aber im eutopen Endometrium beschrieben (27). Andere Autoren halten hingegen nicht etwa eine gesteigerte Aromataseaktivität, sondern vielmehr einen veränderten Estrogenmetabolismus für die lokal erhöhte Estradiolkonzentration verantwortlich (51).

1.1.7 Therapie

Es gibt bis heute keine dauerhafte Heilung für Endometriose. Basierend auf der noch immer ungeklärten Pathogenese stehen nur symptomatische, aber keine kausalen Therapieansätze zur Verfügung. Diese bestehen aus medikamentöser oder operativer Behandlung sowie aus einer Kombination von beiden. Schmerzsymptomatik, Alter und eventueller Kinderwunsch sind bei der Auswahl der Therapie entscheidende Faktoren.

1.1.7.1 Operative Therapie

Standardmäßig werden heute minimal-invasive Operationstechniken angewandt. Im Rahmen der diagnostischen Laparoskopie mit histologischer Sicherung werden kleinere und mittlere Befunde meist im selben Eingriff entfernt (190). Ziel der Operation ist in der Regel die Beseitigung

aller sichtbaren Endometrioseherde, was zu einer nachweislichen Reduktion der Schmerzsymptomatik führt (101). Die operative Entfernung der Läsionen ist allerdings kein Garant für das Ausbleiben der Beschwerden. Retrospektive Studien zeigten, dass in etwa der Hälfte aller operierten Frauen innerhalb eines Jahres erneut Schmerzen auftraten und jede vierte Frau sich einer weiteren Operation unterziehen musste (222). Auffallend ist, dass die Wahrscheinlichkeit sich einem neuen Eingriff unterziehen zu müssen, bei Frauen unter 30 Jahren um ein Vielfaches höher war. Bis heute fehlen kontrollierte Studien; somit sollte der langfristige Wert einer alleinigen operativen Behandlung nicht überschätzt werden (190).

1.1.7.2 Medikamentöse Therapie

Ziele der medikamentösen Therapie sind zum einen die Reduktion der Schmerzsymptomatik und zum anderen die Hemmung der proliferativen Estrogenwirkung in den Endometrioseherden. Darauf basierend können die aktuellen Medikationsmöglichkeiten in zwei Gruppen unterteilt werden: Schmerztherapie und Hormontherapie.

Schmerztherapie

Zur Behandlung der oft durch inflammatorische Prozesse hervorgerufenen chronischen Schmerzen werden als Mittel der Wahl nicht-steroidale Antirheumatika (NSARs) eingesetzt. Durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese werden Schmerz- und Entzündungsprozesse reduziert, was bei 72 % der betroffenen Frauen zu einer Schmerzreduktion führte (219). In erster Linie werden Ibuprofen und Diclofenac eingesetzt, die in ihrer Wirksamkeit in etwa vergleichbar sind (154). Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen treten jedoch bei einer regelmäßigen Einnahme nicht zu vernachlässigende gastrointestinale Schädigungen auf.

Da die vermehrte Prostaglandinausschüttung auf einer erhöhten Aktivierung von COX-2 beruht, könnten die seit einigen Jahren zur Verfügung stehenden selektiven COX-2-Hemmer zukünftig eine Rolle in der Endometriosetherapie spielen. Der gastrointestinalen Verträglichkeit und der fehlenden thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung steht jedoch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse gegenüber. Klinische Studien müssen erst zeigen, ob ihr Einsatz in der Endometriosetherapie Vorteile gegenüber den herkömmlichen NSARs bietet (96).

Hormontherapie

Estrogen fördert nicht nur das Wachstum des eutopen Endometriums, sondern auch das der endometriotischen Läsionen. Aus diesem Grund basieren viele endokrinen Therapieformen auf der Unterdrückung der endogenen Estrogensynthese (59). Zur Anwendung kommen zum Beispiel Wirkstoffe, die durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Freisetzung von Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) unterbinden. GnRH ist normalerweise für die Freisetzung der Gonadotropine LH und FSH in der Hypophyse verantwortlich, welche wiederum die Estrogenproduktion in den Ovarien steuern.

Heute bedeutend in der Endometriosetherapie sind:

- Gestagene (Monotherapie);
- Estrogen-Gestagen-Kombinationen (Kontrazeptiva) im Langzyklus;
- GnRH-Analoga mit und ohne *Add-back*-Therapie.

In den letzten Jahren sind wieder vermehrt Gestagene in den Fokus der Endometriosetherapie gerückt. Gestagene haben dieselben protektiven Eigenschaften auf das Endometrium wie das physiologische Gelbkörperhormon Progesteron. Durch Herunterregulation von Estrogenrezeptoren hemmen sie die estrogenbedingte Proliferation des Endometriums. Diese Wirkung tritt sowohl in eutopem als auch in ektopem Endometrium auf. Seit 2010 für die Behandlung von Endometriose zugelassen ist bisher nur Dienogest (Visanne®). Dienogest verfügt über eine ausgeprägte anti-proliferative Wirkung sowie über anti-inflammatorische und anti-angiogene Effekte. Gleichzeitig reduziert es den Estrogeneinfluss auf das Endometrium (190). Zwei über 15 Monate angelegte klinische Studien konnten zeigen, dass Dienogest zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Symptomatik bei gleichbleibend gutem Sicherheits- und Verträglichkeitsprofil führte. Als häufige Nebenwirkung traten Zwischenblutungen auf, die mit Dauer der Einnahme jedoch zurückgingen (188). Dienogest gilt heute als Gestagen der Wahl und wird aufgrund der guten Verträglichkeit vorerst auch zur Langzeittherapie empfohlen (59, 191).

Kombinierte orale Kontrazeptiva, besser bekannt als „die Pille“, sind trotz des *Off-Label-Use* die am häufigsten eingesetzte hormonelle Therapieform bei Endometriose. Sie sind indiziert bei geringfügigen Befunden, Dysmenorrhö oder im Anschluss an GnRH-Analoga-Gabe und wirken durch die zentrale Unterdrückung der endogenen Estrogenproduktion (154). Am häufigsten kommt dabei die Kombination aus Ethinylestradiol und Dienogest (Valette®) im Langzyklus oder in kontinuierlicher Langzeiteinnahme zum Einsatz (75). Nach dem Absetzen kehren die Beschwerden jedoch meist schnell wieder. Von Vorteil ist hingegen, dass es während der Behandlung zu keinen Estrogenmangelsymptomen kommt, was eine Langzeittherapie ermöglicht (154). Als Nebenwirkung tritt ein deutlich erhöhtes Thromboserisiko auf. Daher müssen vor Therapiebeginn Kontraindikationen geklärt werden.

GnRH-Analoga werden vor allem bei ausgeprägter Endometriose eingesetzt. Sie sind in der Lage, den Organismus der Frau in einen postmenopausalen Zustand zu versetzen. Durch die kontinuierliche Gabe führen sie nach einem initialen Anstieg der FSH- und LH-Sekretion zu einer Herunterregulation der GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse. Dies führt wiederum zu einer Hemmung der GnRH-Ausschüttung im Hypothalamus und somit zu einer Unterdrückung der Estrogenproduktion. Als Nebenwirkung treten typische Symptome der Wechseljahre auf, wie Hitzewallungen, Depressionen, Libidoverlust und ein deutlich erhöhtes Osteoporoserisiko (153). Um diesen negativen Auswirkungen entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit einer sogenannten *Add-back*-Therapie (59). Dabei werden zusätzlich niedrigdosierte Estrogene in Kombination

mit Gestagenen verabreicht, wobei die Dosierung so gewählt werden muss, dass der eigentliche Therapieeffekt der GnRH-Analoga nicht gefährdet ist. Die *Add-back*-Therapie weist eine osteoprotektive Wirkung auf und ermöglicht in Einzelfällen eine Verlängerung der im Schnitt drei bis sechs Monate dauernden Behandlung mit GnRH-Analoga (59).

1.1.8 Ausgewählte Pathophysiologie

1.1.8.1 Immunologische und inflammatorische Aspekte

Die in Abschnitt 1.1.4 beschriebene retrograde Menstruation ist ein physiologischer Vorgang, der in den meisten Frauen zu beobachten ist (82, 133). Dabei gelangen vitale Endometriumszellen in den Bauchraum, die jedoch nur in bestimmten Frauen an das Peritoneum adhären und sich zu Endometrioseherden ausbilden. Es liegt nahe, dass neben genetischen, hormonellen und enzymatischen Faktoren, vor allem eine veränderte Immunantwort Grund dafür sein könnte (109, 127, 227). Mehrere Studien zeigten trotz erhöhter Konzentrationen, eine verminderte Aktivität oder Funktion von natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten (77, 91, 121). Bis heute ist unklar, ob Endometriose Ursache oder Folge der gestörten immunologischen Kompetenz ist.

Neben einer verminderten Zytotoxizität peritonealer Immunzellen ist eine lokale chronische Inflammation im Peritonealraum betroffener Frauen zu beobachten. Die durch aktivierte Leukozyten sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie die veränderte Expression bzw. Aktivität von Zelladhäsionsmolekülen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind vermutlich für die Adhäsion und nachfolgende Invasion in das betreffende Gewebe von entscheidender Bedeutung (127, 128, 231, 241). Neben Zytokinen wie Interleukin (IL)-1 und IL-6 wird vor allem dem Tumornekrosefaktor- α (TNF α) eine zentrale Rolle eingeräumt (20, 100, 108). Er wird in Frauen mit Endometriose von aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet und ist in Peritonealflüssigkeit und Serum sowie in Endometrium von Endometriosepatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen deutlich erhöht (108, 122). TNF α führt zu einer gesteigerten Prostaglandin- und Interleukinausschüttung, kann das B- und T-Zellsystem aktivieren und induziert die Vermehrung von Monozyten und Makrophagen (119). Gemeinsam mit weiteren Faktoren moduliert TNF α die Adhäsion von ektopen endometrialen Zellen an das Peritoneum sowie deren Proliferation und Invasion (239). Zusätzlich werden ihm pro-angiogene Eigenschaften zugesprochen und daher eine Beteiligung an allen Stufen der Implantation.

1.1.8.2 Bedeutung epithelialer Zell-Zell-Kontakte

Epitheliale Zellverbände sind dafür verantwortlich, Organe und Gewebe von der äußeren Umgebung abzutrennen. So auch das Mesothel, ein einschichtiges Plattenepithel, welches die Innenseite des Peritoneums auskleidet und als eine natürliche Barriere fungiert. Membrangebundene Zelladhäsionsmoleküle, wie die Cadherine, sind für die Integrität und den Zusammenhalt der Epithelzellen verantwortlich und stellen den Kontakt über sogenannte *Adherens Junctions* zu den benachbarten Zellen her. E-Cadherin, das bekannteste Mitglied dieser Gruppe, besitzt fünf extrazelluläre, eine transmembranäre und eine intrazelluläre Domäne, welche wiederum an p120-Catenin und β -Catenin bindet (siehe Abbildung 1.3). Diese intrazelluläre Domäne verfügt über eine stark phosphorylierte Region, welche für die Bindung an β -Catenin essentiell ist. α - und β -Catenin stellen gemeinsam die Verbindung von E-Cadherin mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts her. Daneben agiert β -Catenin im Wnt-Signalweg als Transkriptionsfaktor zahlreicher z. B. an der Differenzierung, Migration und Proliferation beteiligter Gene (42).

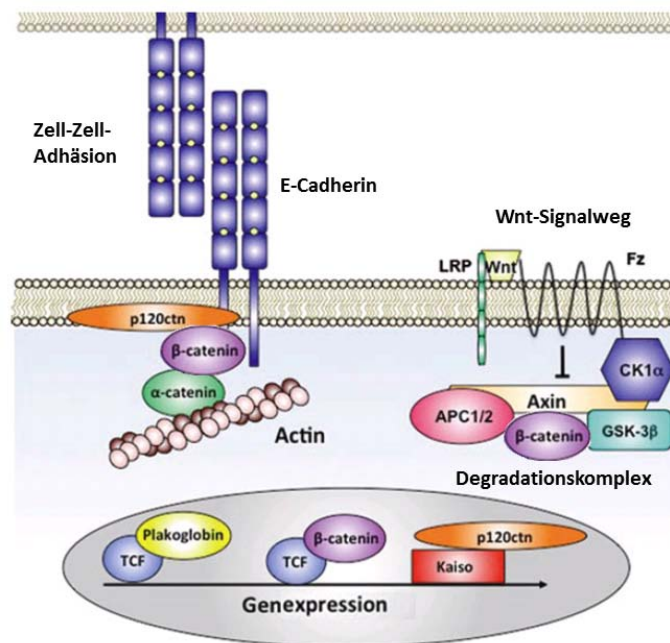


Abbildung 1.3: Zelladhäsionskomplex und Wnt-Signalweg (Abb. modifiziert nach (86)). β -Catenin vermittelt die Bindung des transmembranären E-Cadherins an das Aktinzytoskelett der Zelle. Freies β -Catenin wird durch den Degradationskomplex gebunden und abgebaut. Durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs wird dieser Abbau inhibiert. Freies β -Catenin kann daher in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktor agieren.

Veränderte Expressionsmuster oder Mutationen der am Zelladhäsionskomplex beteiligten Proteine stehen in Verbindung mit infiltrierendem Wachstum und Metastasierung einer Vielzahl von Tumoren (216). Eine verminderte E-Cadherin-Expression führt zu einer gesteigerten Invasivität und zu einer verringerten Differenzierung maligner Zellen (18, 69). Adenomatous polyposis coli (APC) ist Teil des Degradationskomplex, welcher überschüssiges β -Catenin dem Proteasom zum Abbau zuführt. Mutationen des APC-Gens sind daher oft Ursache für eine intrazelluläre Kumulation von β -Catenin mit unkontrollierter Aktivierung des Wnt-Signalweg (18).

Für ein invasives Wachstum bei der Endometriose ist nicht nur die Integrität des Mesothels entscheidend, sondern auch die der, durch retrograde Menstruation eingewanderten, endometrialen Fragmente. Auch in endometriotischen Läsionen wurde der Verlust von E-Cadherin mit einem einhergehenden invasiven Wachstumsverhalten beobachtet (72, 199). Im eutopen Endometrium findet sich der Cadherin-Catenin-Komplex in den luminalen und glandulären Epithelzellen (204). Die Expression ist in der sekretorischen Phase am stärksten, während durch Estradiol in-vitro eine Herunterregulation beobachtet wurde (70).

1.1.8.3 Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) spielen eine bedeutende Rolle bei der Invasion endometrialer Zellen in das Peritoneum. Sie sind in der Lage, extrazelluläre Matrix (bestehend aus Basalmembran und interzellulären Proteinen) abzubauen, Zell-Zell-Kontakte zu lösen und eine aktive Neubildung oder einen Umbau von Bindegewebe zu bewirken. Die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs) wirken als ihre physiologischen Gegenspieler und sind somit für deren Regulierung verantwortlich. Erst das Zusammenspiel beider Enzymgruppen bestimmt den eigentlichen Umfang des Gewebeumbaus (96). Die Expression und Aktivität der MMPs werden im wesentlichen durch Steroidhormone, verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert (161). Eine wichtige Rolle spielen sie vor allem beim Auf- und Abbau des Endometriums im Rahmen des Menstruationszyklus (siehe auch Abbildung 1.2) (96). In der proliferativen Phase bewirkt der ansteigende Estrogenspiegel die Erneuerung der Funktionalis. Dabei steigt die Expression von MMPs vor allem im Stroma an. Durch den mittelzyklischen Anstieg von Progesteron kommt es zu einer Hemmung der estrogenabhängigen MMP-Expression und zu einer sekretorischen Umwandlung des Endometriums. Durch den prämenstruellen Progesteronabfall kommt es erneut zu einer vermehrten Aktivierung und Expression von MMPs (47). MMPs unterstützen die menstruelle Gewebsablösung und -abstoßung durch Degradierung der extrazellulären Matrix (96).

Eine pathologisch veränderte Regulation der MMPs kann an der Entstehung von Tumoren und anderen Erkrankungen beitragen. Auch für die Endometriose wurden veränderte Level von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 sowie TIMP-1 und TIMP-2 beschrieben (161, 241). Dies ist vermutlich unter anderem auf die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ zurückzuführen, welches in der Lage ist, die MMPs heraufzuregulieren und somit zu deren erhöhter Aktivität beizutragen (196). Die Expression der MMPs korreliert direkt mit dem Aktivitätsgrad endometriotischer Läsionen (114). Auch für das eutope uterine Endometrium von Patientinnen mit Endometriose wurde eine veränderte Expression der MMPs gezeigt (40). Dies könnte ein möglicher Grund für die erhöhte Implantationsbereitschaft der abgelösten Endometriumszellen sein. Im ektopen Endometrium führt die Expression von MMPs zu einem enzymatischen Umbau extrazellulärer Matrix und somit zu einer erleichterten Invasion in das Peritoneum, was zudem die Versorgung durch neue Blutgefäße begünstigt (96, 161).

1.1.8.4 Bedeutung von Wachstumsfaktoren

Neben den Estrogenen spielen noch verschiedene weitere Wachstumsfaktoren eine Rolle in der Endometriose (160). In der Peritonealflüssigkeit erkrankter Frauen finden sich unter anderem erhöhte Konzentrationen von *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor* β (TGF β), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) (94, 160). Wachstumsfaktoren können zum einen die Proliferation endometriotischer Zellen stimulieren und sind zum anderen an der Differenzierung und Neoangiogenese sowie an der Produktion von Immunzellen beteiligt. Sezerniert werden sie neben mesothelialen oder endometriotischen Zellen vor allem von aktivierten Makrophagen (160). Für die Endometriose von Bedeutung ist insbesondere EGF. Durch seine Bindung an den EGF-Rezeptor ist es in der Lage, die Differenzierung und Proliferation endometrialer Zellen zu stimulieren (98). Diese Wirkung ist vermutlich die Folge einer indirekt vermittelten Aktivierung intrazellulärer Estrogenrezeptoren (21, 48). Analog dazu, ist die EGF-Rezeptorexpression in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus am stärksten (117).

1.1.9 Tiermodelle

Für die Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung und Entwicklung der Endometriose ist die Verwendung von Tiermodellen unabdingbar. Menstruierende Primaten, die selbst spontan Endometriose entwickeln, kommen der menschlichen Physiologie am nächsten. Spontan auftretende Endometriose wurde für elf nicht-humane Primatenspezies beschrieben, wobei die meisten Studien in Rhesusaffen und Pavianen erfolgten (201). Da auch in Primaten Endometriose nicht in allen weiblichen Tieren auftritt und sich meist über Jahre hinweg entwickelt, wurden alternative Methoden entwickelt, um das Auftreten von Endometriose zu induzieren (78). Bereits 1950 wurde in Rhesusaffen durch Reposition der Zervix der Menstruationsfluss in das Abdomen umgeleitet und nach 10 Monaten in 50 % der Tiere die Ausbildung von Läsionen beobachtet (210). Es folgten weitere Ansätze mit einer Steigerung der retrograden Menstruation durch Zervixverschluss sowie die Induktion durch intraperitoneale Inokulation oder autologe⁸ Transplantation von Endometrium in das Abdomen (53, 66, 235).

Die Kosten und der Aufwand von Primatenstudien sowie ethische Aspekte schränken deren Einsatz ein (78). Aus diesem Grund ist die Etablierung weiterer Modelle notwendig. Heutzutage kommen verschiedene Nagermodelle in Kaninchen, Hamster, Ratte oder Maus zur Anwendung (217). Dabei wird Endometrium autolog oder syngen⁹ in das Abdomen transplantiert oder inokuliert. Das Gewebe implantiert innerhalb weniger Tage und bildet Endometriose-ähnliche, estrogensensitive Läsionen aus, mit den typischen histologischen Merkmalen von humanem

⁸autolog: körpereigenes Gewebe

⁹syngen: Gewebe aus eines genidentischen Spenders

ektopen endometriotischem Gewebe (46, 201). Im heterologen *Xenograft*-Modell, unter Verwendung immundefizienter Tiere, kann auch humanes Endometrium implantiert und in-vivo untersucht werden (79, 156).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die experimentelle Induktion der Endometriose im Mausmodell mittels Transplantation von Uterusfragmenten aus Spendertieren an das Peritoneum genidentischer Empfänger nach dem Vorbild einer von Laschke et al. etablierten Methode (125). Als ein Nachteil muss die dabei erforderliche Laparotomie der Tiere erwähnt werden und die damit verbundene Verletzung durch die Operation und die Transplantation an sich (34, 55). Die anschließende Wundheilung führt zu einer inflammatorischen Veränderung des die Läsion umgebenden Milieus im Bauchraum und kann somit Einfluss auf deren Entwicklung nehmen. Typische Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 werden durch den Eingriff heraufreguliert und sind gleichzeitig auch bei der Entwicklung der Endometriose als wichtige pathogene und wachstumsfördernde Faktoren bekannt (54, 131). Nichtsdestotrotz wurden für transplantierte Läsionen gleiche Wachstums- und Entwicklungsstadien beobachtet wie bei inokulierten Implantaten (177). Ein entscheidender Vorteil bei der Transplantationsmethode ist die deutlich bessere Wiederfindungsrate der Läsionen am Tag der Sektion. Gleichzeitig schafft sie reproduzierbare Bedingungen für die einzelnen Läsionen und führt so zu aussagekräftigeren Resultaten, was eine kleinere Tierzahl bei den Versuchen erlaubt.

Bei Verwendung von humanem Endometrium zeigten Nisolle et al., dass die Anheftung der Transplantate an das Mesothel bereits innerhalb eines Tages nach Transplantation erfolgte (156). Becker et al. entwickelten ein Modell, in dem die Entwicklung transplantiierter Uterusfragmente nicht-invasiv beobachtet werden konnte (17). Das verpflanzte Uterusgewebe entstammte dabei transgenen Luziferase-exprimierenden Tieren und konnte in den nicht-lumineszenten Empfängern nach intravenöser Luziferin-Applikation durch eine Lumineszenzmessung dargestellt werden. In diesem Modell wurde gezeigt, dass unmittelbar nach erfolgter Transplantation keine Lumineszenz messbar war, jedoch nach drei bis vier Tagen ein Signal detektiert werden konnte. Das applizierte Luziferin kam in den Transplantaten zur Wirkung, nachdem erste Gefäße der Empfängermaus in die Läsionen vorgestoßen waren und diese mit Blut versorgten. Diese Daten zeigen, dass das transplantierte Gewebe bereits nach drei Tagen vom Organismus der Maus versorgt wird. Die gesamte Neovaskularisierung war nach etwa 7 bis 14 Tagen abgeschlossen (17, 131).

Auch wenn sich die im Nager experimentell erzeugte Endometriose von der in der Frau unterscheidet, sind diese Modelle für die Erforschung der Endometriose von großer Bedeutung. Sie bieten die Möglichkeit, pathophysiologische und immunologische Prozesse vor allem früher Stadien der Erkrankung zu studieren sowie neue Wirkstoffkandidaten in der Entwicklungsphase zu testen (78, 177).

1.2 Trefoil factor 3

1.2.1 Familie der Trefoilpeptide

Zur Familie der Trefoilpeptide (*Trefoil Factor Family*, TFF) gehören bislang die drei Vertreter TFF1, TFF2 und TFF3. Sie werden von Schleimhautepithelien verschiedener Gewebe sezerniert, insbesondere des Gastrointestinaltrakts, wo sie gemeinsam mit Muzinen für die Viskosität des Mukus und die Oberflächenintegrität der Mukosa verantwortlich sind (92, 214). Im gesunden Organismus werden TFF1 und TFF2 vorwiegend in den Epithelzellen des Magens exprimiert, TFF3 hingegen insbesondere in Becherzellen entlang des gesamten Dünn- und Dickdarms.

Als erstes Trefoilpeptid wurde TFF1 im Jahr 1982 bei der Suche nach estrogenregulierten Genen der Brustkrebszelllinie MCF-7 entdeckt und zunächst als *Human Breast Cancer Associated Peptide 2* (pS2) bezeichnet (139). Im selben Jahr fand man TFF2, damals bezeichnet als *Spasmolytic Polypeptide* (SP), bei der Gewinnung und Isolierung von Schweineinsulin im Pankreas (104). Als letztes Trefoilpeptid wurde TFF3 im Jahr 1991 unter dem Namen *Intestinal Trefoil Factor* (ITF) erstmals im Rattenkolon beschrieben und nur zwei Jahre später auch als ein Sekretionsprodukt der Darmmukosa im Menschen (166, 202).

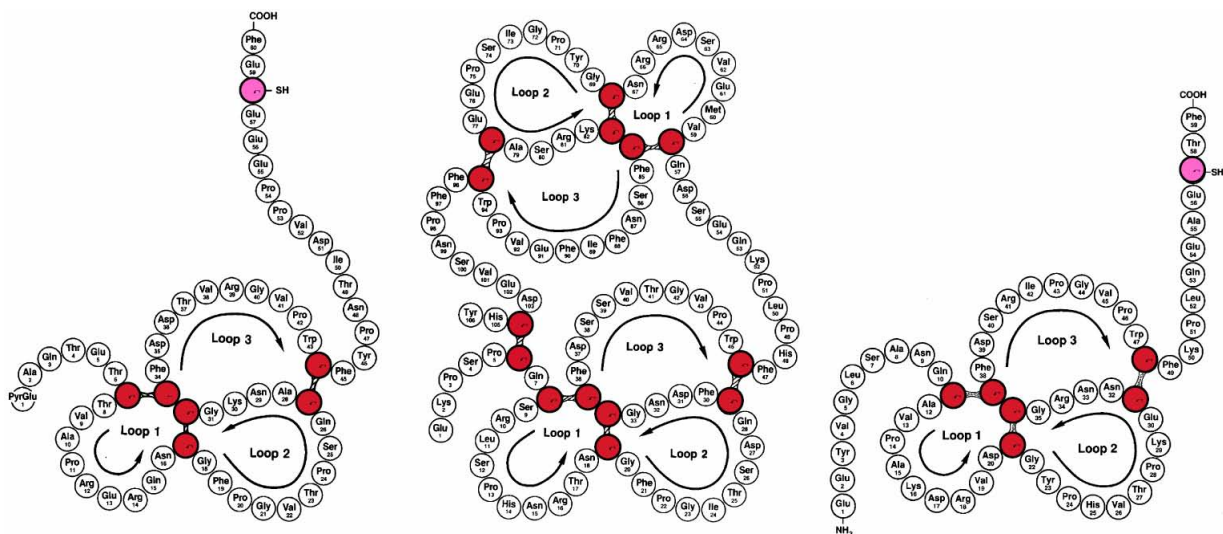


Abbildung 1.4: Struktur der humanen Trefoilpeptide TFF1, TFF2 und TFF3 (von links nach rechts). TFF1 und TFF3 besitzen jeweils eine Trefoil-Domäne, TFF2 besteht aus zweien. (Abb. modifiziert nach (192, 213)).

Die strukturelle Gemeinsamkeit der Trefoilpeptide basiert auf einer Sequenz von 42–43 Aminosäuren, der sogenannten Trefoil-Domäne (siehe Abbildung 1.4). Diese bildet die namensgebende kleeblattartige Tertiärstruktur durch Cysteinreste mit Ausbildung dreier intramolekularer Disulfidbrücken (215). TFF1 und TFF3 besitzen jeweils eine solche Trefoil-Domäne, TFF2 besteht aus zweien. Durch die kompakte Struktur der Trefoil-Domäne weisen die Peptide eine außerordentliche Resistenz gegenüber enzymatischem Abbau und saurer Hydrolyse auf und sind daher auch bei den extremen Bedingungen entlang des Gastrointestinaltrakts stabil (215).

Trefoilpeptide sind vor allem an Schutz- und Regenerationsprozessen der gastrointestinalen Mukosa beteiligt (209). Im Rahmen der Wundheilung werden sie innerhalb kürzester Zeit nach Schleimhautschädigungen in großen Mengen sezerniert. Außerdem zeigten In-vitro-Studien anti-apoptotische, immunmodulatorische, chemotaktische sowie pro-angiogene Eigenschaften für Trefoilpeptide (14, 41, 45, 175, 208). Bis heute konnte noch kein TFF-Rezeptor isoliert werden, daher sind die genauen Funktionen und Signalwege noch immer nicht genau verstanden.

Die Regulation der Trefoilpeptide erfolgt offenbar über verschiedenste chemische Stimuli, Transkriptionsfaktoren und epigenetische Faktoren, welche wiederum an unterschiedlichsten Prozessen von Embryogenese, Wundheilung bis hin zur Tumorgenese beteiligt sind. Genannt seien beispielsweise pro-inflammatorische Zytokine (TNF α , IL-1, IL-6), Estrogene, Wachstumsfaktoren (EGF) oder Hypoxie (14, 63).

1.2.2 Vorkommen und Funktion von TFF3

Das in dieser Arbeit untersuchte TFF3 besteht aus 59 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von etwa 6,6 kDa (215). Wie bereits erwähnt, wird es physiologisch vorwiegend in Becherzellen entlang des Dün- und Dickdarms exprimiert (166). Neben dem Gastrointestinaltrakt wird TFF3 noch von weiteren Epithelien verschiedenster Organe sezerniert, wie zum Beispiel des Respirationstrakts, der Brust, des Uterus, des Auges und der Speicheldrüsen (88, 124, 167, 229, 230). Im Gehirn und im Pankreas kommt es zudem auch in nicht-epithelialen Geweben vor.

Im Darm ist TFF3 verantwortlich für die Oberflächenintegrität der Mukosa und somit für den Schutz vor verschiedenen pathogenen Einflüssen. Im Rahmen der Wundheilung, auch Rekonstitution genannt, ist TFF3 in der Lage, die Migration von Epithelzellen in das geschädigte Areal zu bewirken (57, 111). Wie es dabei für die notwendige Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte kommt ist noch nicht sicher geklärt. TFF3 bewirkt vermutlich über eine Aktivierung des EGF-Rezeptors die Phosphorylierung von β -Catenin, was nachfolgend zur Destabilisierung des Zelladhäsionskomplex führt (60, 132). Dabei erfolgt die Aktivierung des EGF-Rezeptors jedoch ohne eine direkte Bindung von TFF3 (207). Zudem wurde in TFF3-transfizierten Zellen eine Herunterregulation von E-Cadherin beobachtet (144). Daneben konnte durch TFF3-Stimulation eine verminderte Apoptose und Anoikis¹⁰ in Darmzellen festgestellt werden, was für das Überleben der Zellen während der Migration Voraussetzung ist (38, 208). Eine verringerte Apoptose fördert allerdings auch die Entstehung und Metastasierung von Tumoren. Pathologisch erhöhte Expressionslevel von TFF3 wurden neben einer Reihe chronisch entzündlicher Erkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Magenulkus, Pankreatitis) auch in verschiedenen Tumoren (Ovar, Endometrium, Mamma, Kolon, Magen, Pankreas, Lunge) beschrieben. Durch seine ebenso pro-invasiven wie angiogenen Eigenschaften wird eine Beteiligung von TFF3 an der Tumorgenese und -progression vermutet (163).

¹⁰gr.: *heimatlos*; Sonderform der Apoptose: programmierter Zelltod nach Verlust des Zell-Matrix-Kontakts

1.3 Arbeitshypothese und Fragestellung

Obwohl die Endometriose zu den häufigsten gynäkologischen Erkrankungen gehört, sind Ursache und Pathophysiologie bis heute ungeklärt. Aus diesem Grund ist es von großer Wichtigkeit, mehr über ihre Entstehung und Entwicklung zu erfahren, um anschließend neue Therapieansätze durch Eingriff in spezifische Signalwege entwickeln zu können.

TFF3 ist ein typisches Sekretionsprodukt verschiedener Schleimhautepithelien, insbesondere des Gastrointestinaltrakts und der Endozervix. Es wirkt anti-apoptotisch, initiiert die Zellmigration und moduliert immunologische Prozesse. Neben seinen protektiven Aufgaben in der gastrointestinalen Mukosa ist es durch seine pro-invasiven und pro-angiogenen Eigenschaften vermutlich an der Entstehung und Entwicklung verschiedener Tumore, wie z. B. dem Endometriums- oder Mammakarzinom mit beteiligt (62). Die bisher beschriebenen Eigenschaften von TFF3 lassen einen Zusammenhang mit den pathologischen Prozessen bei der Entstehung und Entwicklung der Endometriose vermuten. Um dies zu untersuchen, wurden die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Studien durchgeführt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst die Expression und Regulation von TFF3 sowie dessen Eignung als systemischer Biomarker in der klinischen Endometriose untersucht. Dafür wurden eutope und ektope Endometriumsproben, Peritonealflüssigkeiten und Seren erkrankter Frauen analysiert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung lokaler Proteine in der Peritonealflüssigkeit und deren Betrachtung hinsichtlich potenzieller Korrelationen mit TFF3.

Analog erfolgte im zweiten Abschnitt die Untersuchung von TFF3 in einem syngenen Mausmodell für Endometriose. Dafür wurden die Expression und Regulation von TFF3 in murinen Peritoneallavagen und Seren sowie histologisch in eutopen und ektope Endometriumsproben der Tiere analysiert. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Beziehung von TFF3 zu systemischen Markern für Inflammation gelegt.

Im dritten Teil der Arbeit standen Studien zu TFF3 im endometrialen Zellkulturmodell bezüglich seiner funktionellen Wirkung und Regulation im Fokus. Dabei wurde zunächst in ECC-1-Zellen die Genregulation von TFF3 durch 17β -Estradiol und $TNF\alpha$ analysiert. Des Weiteren erfolgte nach Stimulation mit rekombinantem TFF3 die Untersuchung der Genexpression von Zelladhäsionsproteinen und Muzinen sowie der Einfluss auf die Zellviabilität, Apoptose und Proliferation.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit erstmalig Hinweise dafür, dass TFF3 nicht nur in endometriotischen Läsionen exprimiert wird, sondern auch Eigenschaften aufweist, mit denen es an der Entstehung der Endometriose beteiligt sein könnte. Daneben wurde für TFF3 eine zyklusabhängige Regulation im Serum von Frauen beobachtet, was möglicherweise auf eine physiologische Bedeutung von TFF3 im Rahmen des Menstruationszyklus hindeutet.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Alle Lösungen und Puffer wurden, falls nicht anders angegeben, mit Reinstwasser (Typ 1) aus einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore hergestellt. Der Reinheitsgrad entspricht dem von bidestilliertem Wasser. Die verwendeten Materialien für tierexperimentelle Arbeiten sowie für die Zellkultur waren entweder steril verpackte Einwegartikel oder wurden vor ihrer Benutzung in einem Autoklaven (121 °C, 30 min, 1 bar) dampfsterilisiert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien und Geräte sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

Produkt	Hersteller
Charcoal Stripped Serum (CCS)	Genetex
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
DMEM / Ham's F-12	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Einfriermedium	Gibco
FBS Superior	Biochrom
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	Braun
Nuclease-free Water	Life Technologies
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Gibco
TrypLE™ Express Enzyme, no phenol red	Gibco

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Proteine und Arzneimittel

Produkt	Hersteller
Antibody Diluent	Dako
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer
β-Mercaptoethanol	Sigma
17β-Estradiol	Sigma
DAB+, Liquid	Dako
Eosin	Dako
Ethanol absolut	Merck
Ethanol 96 %	Merck
Eukitt® Mounting medium	Kindler
Erdnussöl - Arachidis Oleum	BUFA
Formalinlösung 4 %, gepuffert	Merck
Goat Serum (Normal)	Dako
Hämatoxylin	Dako
Histoacryl® Tissue Adhesive	Braun
Insulin, rekombinantes humanes	Biochrom
Isopropanol	Merck
Ketavet (Ketamin)	Bayer
L-Glutamin	Gibco
Penicillin/Streptomycin Lösung	Gibco
Peroxidase Blocking Solution	Dako
RNase Zap	Sigma
Rompun (Xylazin)	Bayer
Target Retrieval Solution, pH 9	Dako
TFF3, rekombinantes humanes	ProSpec
TNFα, rekombinantes humanes	InvivoGen
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Gibco
Tween® 20	Sigma
Schwefelsäure	Merck
Xylol	Merck

2.1.3 Kits, Assays und Mastermixe

Produkt	Hersteller
ApoLive-Glo™ Multiplex	Promega
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics
CellTiter-Glo®	Pomoga
TaqMan® Fast Advanced Mastermix	Applied Biosystems
Milliplex xMAP Mouse Acute Phase Panel 1/2	Millipore
RNAscope® 2.0 High Definition Assay	Advanced Cell Diagnostics
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
RNase-Free-DNase Set	Qiagen
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
TFF3 ELISA, human	Biovendor
TFF3 ELISA, mouse	BlueGene

2.1.4 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
384-Well PCR Platten	Applied Biosystems
Countess® Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen
Dako Pen	Dako
Deckgläschen	Menzel
Histokassetten	Simport
Kanülen Sterican (verschiedene Größen)	Braun
Kryoröhrchen CryoTube	Greiner
Spritzen (verschiedene Größen)	Braun
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf
Polypropylen-Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Falcon
Reagiergefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf
Softasept N	Braun
S-Monovetten	Sarstedt
Superfrost Plus Gold Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Trockenfutter, pelletiertes	Altromin
Zellkulturplatten, 96-Well, Flachboden, klar	TPP
Zellkulturplatten, 96-Well, Flachboden, weiß	Perkin Elmer
Zellkulturflaschen und -platten	Corning

2.1.5 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR Sytem	Applied Biosystems
Autoklav Systec D-65	Systec
Biopsiestanze	Fine Science Tools
Brutschrank BDD6220	Heraeus
Countess® Automated Cell Counter	Invitrogen
Dampfgarer MultiGourmet FS10	Braun
Digitalkamera Power Shot A640	Canon
Einbettsystem Leica EG1150 H	Leica
epMotion 5075	Eppendorf
Gewebeinfiltrationsautomat Leica ASP200 S	Leica
MS-2010 1.2 Laminar Flow Cabinet	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop IM35	Zeiss
Mikrotiterplatten-Waschgerät Wellwash AC	Thermo Fisher Scientific
Analysenwaage ME	Sartorius
Mirax-Imaging System	Zeiss
NanoDrop ND-8000	Peqlab
Plattenschüttler	Thermo Fisher Scientific
Pipetten	Eppendorf
QiaCube	Qiagen
Rasierer Eco-S, elektrischer	Tondeo
Rotationsmikrotom HM355S	Leica
Tecan	Tecan
Tischzentrifuge	VWR
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	GFL
Water Purification System Milli-Q	Millipore
Zellkulturbank HERAsafe	Heraeus
Zentrifuge 5424R und 5804R Eppendorf	Eppendorf

2.1.6 Verwendete Software

Produkt	Hersteller
AxioVision	Zeiss
Graph Pad Prism V6.0	GraphPad Software Inc.
Magellan tm V6.5	Tecan Group
MS Office 2010	Microsoft
MikTex	OpenSource
Pannoramic Viewer V1.15.2	3D Histech
RQ Manager	Applied Biosystems
SDS V2.4	Applied Biosystems

2.2 Probenmaterial von Patientinnen mit Endometriose

2.2.1 Eutopes und ektopes Endometrium

Zur histologischen Untersuchung der TFF3-Expression in eutopem Endometrium des Uterus sowie in ektopen endometriotischen Läsionen wurden in 4%-iger Formalinlösung fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben verwendet. Diese stammten aus einer früheren Kollaboration der Bayer Pharma AG mit dem Universitätsklinikum der Humboldt Universität Berlin (Charité). Das Gewebe war prämenopausalen Frauen entnommen worden, die sich einer Laparoskopie aufgrund eines Endometrioseverdachts oder im Rahmen einer Hysterektomie unterzogen hatten.

2.2.2 Peritonealflüssigkeit

2.2.2.1 Probengewinnung und Patientenkollektiv

Zur Untersuchung von TFF3 in Peritonealflüssigkeiten wurden Proben von 50 Patientinnen mit und ohne Endometriose auf verschiedene Proteinkonzentrationen hin analysiert. Die Peritonealflüssigkeiten waren zuvor während Laparoskopien gewonnen und die diagnostizierte Endometriose durch erfahrene Operateure nach dem rAFS-System verschiedenen Schweregraden zugeordnet worden (von rAFS I = leicht bis rAFS IV = schwer). Als Kontrollen dienten Frauen ohne Endometriose ($n = 16$), die sich der Laparoskopie aufgrund einer Sterilisation oder zur Entfernung von Leiomyomen, Dermoid- oder Gelbkörperzysten unterzogen hatten. Die Aspiration der Peritonealflüssigkeit erfolgte unter sterilen Bedingungen unmittelbar nach Eintritt in das Abdomen. Anschließend waren zelluläre Bestandteile bei 400 g für 10 min abzentrifugiert und die Überstände bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren worden. Die Probengewinnung für wissenschaftliche Zwecke erfolgte unter der Verantwortung von Prof. Dr. Daniela Hornung und wurde zuvor von der Ethikkommission des Universitätskrankenhauses Lübeck genehmigt. Alle Frauen wurden über den genauen Ablauf aufgeklärt und gaben anschließend ihr schriftliches Einverständnis.

Tabelle 2.3: Patientendaten mit rAFS-Stadium (rAFS I = leicht bis rAFS IV = schwer). Insgesamt wurden Peritonealflüssigkeiten von 50 Frauen mit und ohne Endometriose untersucht.

	Kontrollen	rAFS I	rez. rAFS I	rAFS III	rAFS IV
Anzahl der Frauen	$n = 16$	$n = 12$	$n = 12$	$n = 5$	$n = 5$
Alter (Jahre)	$35,1 \pm 9,9$	$31,0 \pm 7,1$	$38,0 \pm 10,7$	$30,2 \pm 4,0$	$32,4 \pm 5,1$
BMI (kg/m^2)	$22,9 \pm 3,6$	$22,0 \pm 3,2$	$24,2 \pm 3,4$	$22,4 \pm 2,6$	$22,5 \pm 3,0$

rAFS: revised American Fertility Society, rez.: rezidivierende Endometriose, BMI: Body Mass Index

2.2.2.2 Multiplexanalyse von Proteinen in Peritonealflüssigkeiten

Die Multiplexanalyse der gesammelten Peritonealflüssigkeiten erfolgte durch die Firma Myriad RBM, Inc (Austin, USA) mit der Luminex[®] xMAP[®] (MAP) Technologie. Als Multiplexverfahren erlaubt die xMAP[®]-Technologie während einer Messung bis zu hundert Parameter in einem sehr kleinen und verdünnten Probenvolumen zu bestimmen.

Das Prinzip basiert auf mikroskopisch kleinen Polystyrolpartikeln, sogenannten Mikrosphären oder Beads, die als Festphase für Antikörper-Antigen-Reaktionen agieren (siehe Abbildung 2.1). Jeder Bead-Typ ist eindeutig durch einen bestimmten Fluoreszenzfarbstoff definiert und bindet durch an der Oberfläche konjugierte spezifische Antikörper ein bestimmtes Antigen. Nach Zugabe eines biotinylierten Zweitantikörpers und eines Fluoreszenz-Reportermoleküls können die gebundenen Antigene in einem Luminex-Reader quantifiziert und die detektierten Beads klassifiziert werden. Das System basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie unter Verwendung zweier unterschiedlicher Laser.

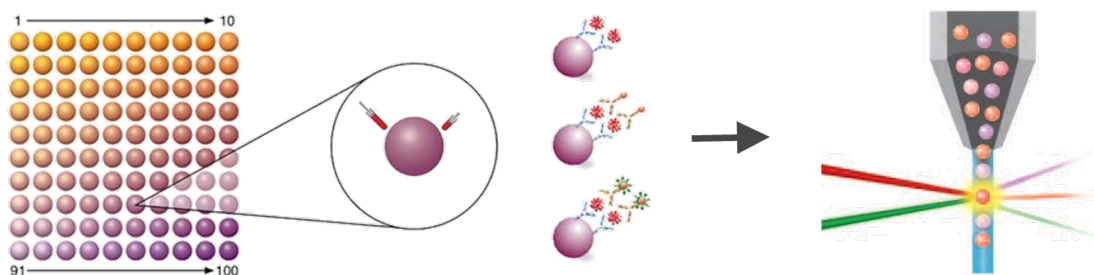


Abbildung 2.1: Prinzip der Luminex[®] xMAP[®] Technologie (Abb. modifiziert nach (23)). Farbcodierte Mikrosphären binden mit an der Oberfläche gekoppelten Antikörpern spezifisch bestimmte Antigene in der Probe. Die gebundenen Antigene werden mit fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpern gekoppelt und anschließend die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe in einem Luminex-Analysesystem qualitativ und quantitativ ausgewertet.

Mit dem Kit Human DiscoveryMAP[®] v. 1.0 wurden die Konzentrationen von insgesamt 189 Proteinen in den Peritonealflüssigkeitsproben bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die statistische Auswertung aller detektierbaren Proteine. Eingegangen werden soll aber nur auf solche mit Bedeutung für die vorliegende Arbeit. Diese waren: TFF3, Cancer-Antigen 125 (CA 125), Cancer-Antigen 19-9 (CA 19-9), IL-8, Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Matrix-Metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10 und *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1* (TIMP-1).

2.2.3 Serum

2.2.3.1 Probengewinnung und Patientenkollektiv

Zur Untersuchung systemischer TFF3-Spiegel wurde die Konzentration im Serum von 118 Frauen mit und ohne Endometriose bestimmt. Die Gewinnung des Serums erfolgte im Rahmen einer umfangreichen prospektiven Endometriose-Biomarker Studie der Bayer Pharma AG Berlin unter der Verantwortung von Dr. Kathrin Machens. Die Durchführung erfolgte deutschlandweit in 13 verschiedenen Studienzentren und wurde von den Ethikkommissionen der Ärztekammer Berlin sowie der teilnehmenden Bundesländer genehmigt. Jede Frau wurde ausführlich über das Ziel der Studie sowie die dadurch notwendigen Interventionen aufgeklärt und gab anschließend ihr schriftliches Einverständnis.



Abbildung 2.2: Studiendesign. Die Observation der Frauen erfolgte über drei Menstruationszyklen hinweg. Im ersten sowie im dritten Zyklus wurden an den Zyklustagen 1 und 9 sowie an den Tagen 3 und 11 nach dem LH-Peak (LH) Blutabnahmen durchgeführt. Im zweiten Zyklus erfolgte während der proliferativen Phase die Laparoskopie einschließlich Biopsie zur histologischen Sicherung einer Endometriose bei auffälligem Befund.

Wie in Abbildung 2.2 ersichtlich, wurden die Patientinnen über drei vollständige Menstruationszyklen hinweg beobachtet. Diese waren definiert als Zyklus mit LH-Peak und somit erfolgter Ovulation. Die Frauen kontrollierten selbstständig jeden Tag mithilfe des ClearPlan® Fertilitätsmonitors die Konzentrationen von Luteinisierendem Hormon (LH) und Estrogen im Urin. Während des ersten und dritten Zyklus erfolgten jeweils vier Blutabnahmen an den Zyklustagen 1 und 9 sowie an den Tagen 3 und 11 nach dem LH-Peak. Im zweiten Zyklus wurde zwischen Tag 4 und Tag 11 (proliferative Phase) die Laparoskopie einschließlich Biopsie durchgeführt. Die Biopsie diente dabei der histologischen Sicherung einer Endometriose bei auffälligem Befund.

In die Studie wurden anfangs 164 Frauen eingeschlossen, bei denen eine laparoskopische Untersuchung zur Abklärung einer möglichen Endometriose oder Infertilität bevorstand. Zusätzlich eingeschlossen waren Frauen, bei denen eine Sterilisation mit Durchtrennung der Eileiter geplant war.

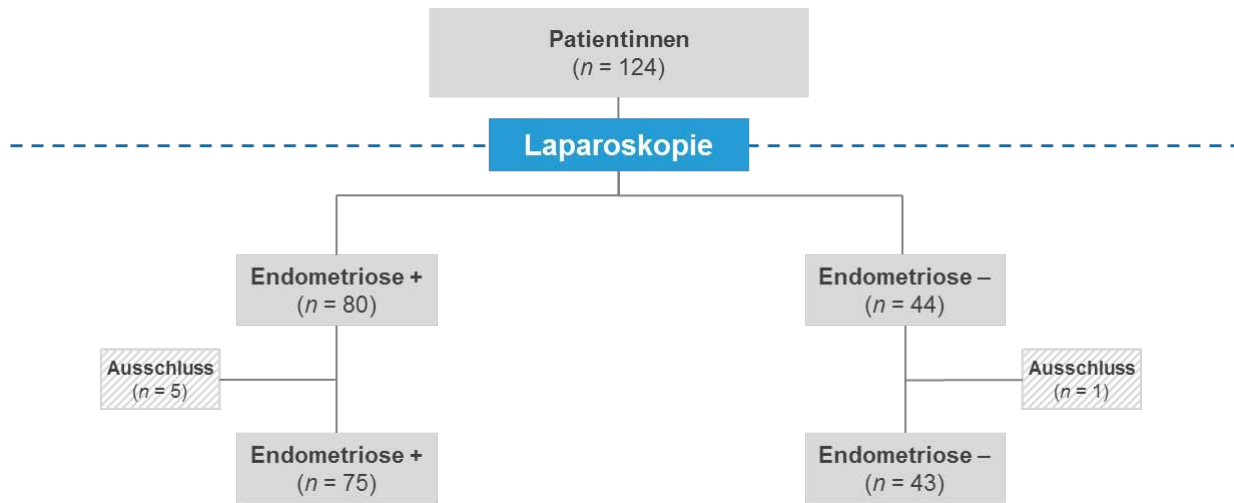


Abbildung 2.3: Studienteilnehmerinnen. Im Rahmen der Studie unterzogen sich 124 Frauen einer Laparoskopie. Sechs Frauen wurden aufgrund einer Protokollabweichung nachträglich ausgeschlossen. Somit ergab sich eine finale Anzahl von 118 Studienteilnehmerinnen. In 75 dieser Frauen wurde Endometriose diagnostiziert. In 43 Frauen konnten keine endometriotischen Läsionen gefunden werden.

Aufgrund einer ausbleibenden Ovulation im ersten Zyklus mussten 40 der 164 Frauen vorzeitig ausgeschlossen werden. Von den 124 Patientinnen, die sich im Rahmen der Studie der Laparoskopie unterzogen, wurden weitere 6 Frauen nachträglich aufgrund von Abweichungen des Studienprotokolls ausgeschlossen (begleitende chronisch entzündliche Erkrankungen, Einnahme von Phytoestrogenen bzw. von hochdosierten Antidepressiva). In den 118 verbliebenen Frauen wurde bei 75 eine Endometriose diagnostiziert, 43 der Frauen blieben ohne erkennbare Läsionen (siehe Abbildung 2.3).

Tabelle 2.4: Patientendaten der in die Studie eingeschlossenen Frauen mit und ohne Endometriose. Insgesamt wurde TFF3 im Serum von 118 Frauen bestimmt.

	Endometriose +	Endometriose –
Anzahl der Frauen	n = 75	n = 43
Alter (Jahre)	32,1 ± 4,8	31,0 ± 6,4
BMI (kg/m ²)	22,8 ± 3,6	23,9 ± 5,0

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von TFF3 in Seren

Die Konzentrationsbestimmung von TFF3 in den Seren erfolgte mit einem ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) der Firma BioVendor (RD191160200R). Das Prinzip und die Durchführung werden im Abschnitt 2.5.2.1 auf Seite 39 erläutert.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

Sämtliche Tierversuche erfolgten gemäß den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin (LaGeSo) genehmigt. Die Endometrioseinduktion erfolgte in der vorliegenden Arbeit in einem Mausmodell durch Transplantation von Uterusfragmenten einer Spendermaus in die Bauchhöhle genetisch identischer Empfängermäuse (syngenes Transplantationsmodell) nach einer von Laschke et al. beschriebenen Methode (125).

2.3.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit 8 bis 12 Wochen alten weiblichen C57BL/6-Mäusen der Firma Charles River mit einem Körpergewicht von 19 bis 23 g durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte in den Räumen der Bayer Pharma AG Berlin in Makrolonkäfigen unter kontrollierten Außenbedingungen und regulierten Tag- und Nachtzyklen. Entkeimtes Trinkwasser sowie pelletiertes Trockenfutter stand den Mäusen nach Belieben zur Verfügung.

2.3.2 Syngenes Transplantationsmodell

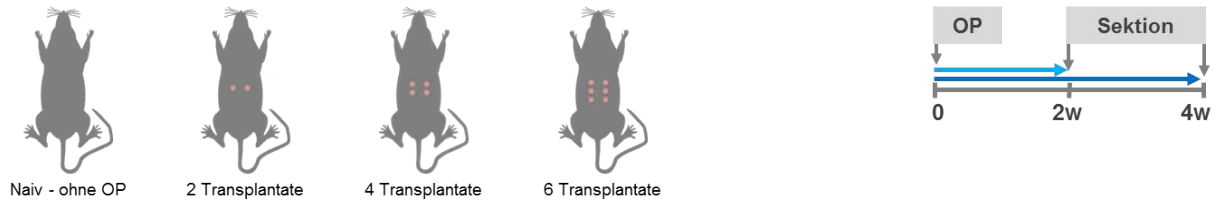
2.3.2.1 Experimentelles Design

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unabhängige Experimente unterschiedlicher Dauer durchgeführt. In allen Versuchen wurde den Mäusen eine unterschiedliche Anzahl an Uterusfragmenten transplantiert, um den Einfluss des Volumens von endometriotischem Gewebe auf die Entwicklung der Endometriose zu untersuchen. Als Kontrollgruppen dienten zum einen naive Tiere, die keinem operativen Eingriff unterzogen wurden, und zum anderen Tiere, denen statt der Uterustransplantate nur Suturen, also Fäden, gesetzt wurden. Das Setzen der Suturen kam einer Scheinoperation gleich, bei der die Verletzung des Peritoneums durch den operativen Eingriff simuliert werden sollte, ohne einer Transplantation von uterinem Gewebe.

Die Sektion erfolgte nach einer Versuchsdauer von 2, 4, 8 bzw. 14 Wochen. Dabei wurden Peritoneallavagen gesammelt, um die lokale Konzentration von TFF3 in der Bauchhöhle zu ermitteln. Die Größe und das Gewicht der implantierten endometriotischen Läsionen wurde dokumentiert und das Gewicht von Uteri und Milzen bestimmt. Läsionen und Uteri wurden anschließend für histologische Untersuchungen in 4 %-iger Formalinlösung fixiert.

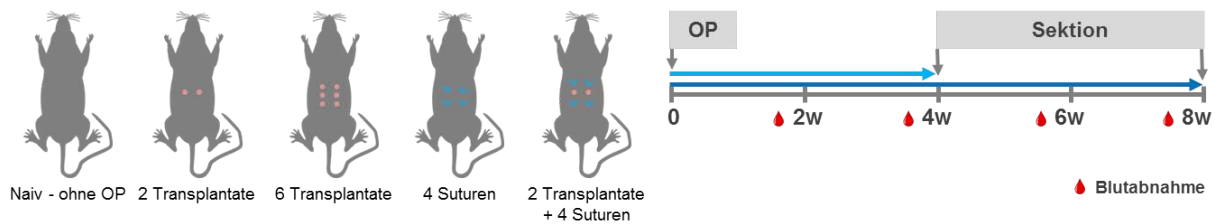
Zu Beginn eines jeden Experiments erfolgte die Auswahl der Spender- und Empfängertiere nach dem Zufallsprinzip. Die Empfängertiere wurden daraufhin nochmals randomisiert in verschiedene Versuchs- und Kontrollgruppen unterteilt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe variierte je nach Versuchsansatz.

Experiment A: 2 und 4 Wochen



Experiment A setzte sich aus einer naiven Kontrollgruppe ohne operativen Eingriff sowie aus je einer Versuchsgruppe mit 2, 4 bzw. 6 Uterustransplantaten zusammen. Jede der Gruppen bestand anfangs aus 14 Tieren. Die Sektion erfolgte für jeweils 7 Tiere einer Gruppe entweder nach 2 oder erst nach 4 Wochen.

Experiment B: 4 und 8 Wochen



Experiment B bestand aus einer naiven Kontrollgruppe sowie aus je einer Versuchsgruppe mit 2 bzw. 6 Uterustransplantaten. Zusätzlich wurden Tieren einer Gruppe neben 2 Transplantaten noch 4 Suturen (Fäden) gesetzt und in einer weiteren Gruppe wurden 4 Suturen ohne die Transplantation von Uterusgewebe gesetzt. Jede der Gruppen bestand anfangs aus 14 Tieren. Die Sektion erfolgte für jeweils 7 Tiere einer Gruppe einmal nach 4 und einmal nach 8 Wochen. Zusätzlich wurde den Tieren nach 2, 4, 6 und 8 Wochen Blut abgenommen.

Experiment C: 12 Wochen



Experiment C setzte sich aus zwei Versuchsgruppen mit je 2 bzw. 6 Uterustransplantaten zusammen. Jede Gruppe bestand aus 12 Tieren. Die Sektion aller Tiere erfolgte nach 14 Wochen.

2.3.2.2 Narkose

Vor chirurgischen Eingriffen wurden die Mäuse mit 20 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazin und mit 100 mg/kg KG Ketamin durch intraperitoneale Applikation narkotisiert. Dafür wurden für eine bessere Dosiergenauigkeit jeweils ein Teil der Lösungen mit steriler Kochsalzlösung auf insgesamt zehn Teile verdünnt. Von dieser Mischung wurden jedem Tier 10 mL/kg KG bzw. 0,1 mL/10 g KG appliziert.

Ansatz Narkose

- 1 Teil Rompun 2 % (Xylazin)
- 1 Teil Ketavet 100 mg/mL (Ketamin)
- 8 Teile Isotone Kochsalzlösung 0,9 %

2.3.2.3 Gewinnung von Uterusfragmenten

Um ein gleichmäßig stark ausgebildetes Endometrium aller Spendermäuse zu gewährleisten, wurden die Tiere 3 Tage vor Versuchsbeginn täglich mit 3 µg 17β-Estradiol pro kg KG behandelt (gelöst in Arachisöl). Am Operationstag wurden die Spender wie beschrieben narkotisiert. Nach Desinfektion der Bauchhaut erfolgte eine Laparotomie mit Entfernung des Uterus. Dieser wurde zunächst mit wenigen Tropfen 37 °C warmen *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) befeuchtet und anschließend beide Uterushörner mit einer Gefäßschere der Länge nach aufgeschnitten und ausgebreitet. Mit einer kreisförmigen Biopsiestanze (Fine Science Tools) konnten nun 3,14 mm² große Uterusfragmente herausgestanzt und in eine mit vorgewärmten DMEM gefüllte Petrischale überführt werden. Die Spendertiere wurden unmittelbar nach der Uterusentnahme mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.3.2.4 Transplantation von Uterusfragmenten

Zur Transplantation der im vorherigen Abschnitt gewonnenen Uterusfragmente wurden die Empfängertiere narkotisiert. Mit einem elektrischen Rasierer wurde das Fell am Bauch entfernt und die Augen mit Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe (Bayer) bedeckt. Die Tiere wurden in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert und die Bauchregion großzügig desinfiziert. Etwa 8 mm oberhalb der Harnröhrenöffnung folgte ein gerader medianer Hautschnitt. Nach vorsichtigem Ablösen der Haut vom Peritoneum wurde dieses durch Anheben mit einer Pinzette an der *Linea alba* mit einem etwa 1 cm langen Schnitt geöffnet. Je nach Versuchsgruppe erfolgte nun auf die Innenseite des Peritoneums die Transplantation von 2, 4 bzw. 6 Uterustransplantaten. Diese wurden links und rechts etwa 1 cm lateral vom Einschnitt, mit einem Doppelknoten (6-0 Prolene Faden, Ethicon) fixiert. Die endometriale Innenseite der Uterusfragmente wurde dabei im direkten Kontakt zum Peritoneum ausgerichtet. Bei Tieren aus bestimmten Kontrollgruppen wurden Suturen (Fäden) ohne die Transplantation von Gewebe gesetzt. Vor dem Verschließen der Tiere wurde ein Tropfen isotoner Kochsalzlösung in den Bauchraum gegeben, um den

Flüssigkeitsverlust durch die geöffnete Bauchhöhle auszugleichen. Anschließend wurde das Peritoneum mit einem fortlaufenden 5-0 Prolene Faden zugenäht und die äußere Hautschicht der Bauchdecke mit Histoacryl® Gewebekleber (Braun) verschlossen. Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen auf einer mit Zellstoff ausgelegten Wärmeplatte bei 37 °C gehalten. Die Operationswunde wurde innerhalb der ersten Tage nach dem Eingriff regelmäßig auf ordnungsgemäße Heilung kontrolliert und wenn notwendig, neu geklebt. Insgesamt erholten sich die Tiere zügig von dem Eingriff.

2.3.2.5 Sektion und Probengewinnung

Je nach Experiment erfolgte die Sektion entweder 2, 4, 8 bzw. 14 Wochen nach Endometrioseinduktion. Die einzelnen Tiere wurden zunächst gewogen und anschließend narkotisiert.

Peritoneallavagen

Nach großzügiger Desinfektion der Bauchregion wurde die obere Bauchdecke vorsichtig geöffnet, wobei eine Verletzung des Peritoneums unbedingt vermieden werden musste. Drei Milliliter eisgekühltes *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) (+0,5 % FCS) wurden mittels Kanüle intraperitoneal appliziert. Um die gesamte Benetzung der Bauchhöhle durch das PBS zu gewährleisten, wurden daraufhin die Bauchdecke massiert und die Maus vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde die Flüssigkeit möglichst vollständig mit einer Spritze aufgezogen, in ein 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

Blutgewinnung

In Experiment B wurde zusätzlich an vier Zeitpunkten Blut der Tiere entnommen. Im Rahmen der Sektion (4 und 8 Wochen) wurde Blut aus der Vena cava gewonnen. Dafür erfolgten nach großzügiger Öffnung des Peritoneums die Freilegung der Vene und dann deren Punktion. Das Blut wurde anschließend mit Hilfe einer S-Monovette (Sarstedt) entnommen.

In der Zeit zwischen den Sektionen (2 und 6 Wochen nach Transplantation) erfolgte die Blutabnahme mittels retrobulbärer Punktion. Dafür wurden die Tiere kurzzeitig mit Isofluran narkotisiert und durch einen Nackengriff die Halsvenen gestaut. Gleichzeitig konnte nun eine sterile Pasteurpipette unter leicht drehender Bewegung in den inneren Augenwinkel eingeführt werden. Durch Kapillarkräfte wurde Blut aus dem retrobulbären Venenplexus angesaugt und anschließend in ein Eppendorfgefäß entleert.

Fotografische Vermessung der Läsionen

Zur fotografischen Größenvermessung der Läsionen wurde das Peritoneum kranial¹ der Transplantate eröffnet und kaudal² aufgeklappt. Alle transplantierten Läsionen und Suturen konnten somit auf einen Blick betrachtet und fotografiert werden (Power Shot A640, Canon). Mittels der AxioVision Software (Zeiss) wurde die Fläche der fotografierten Läsionen in Quadratmillimetern (mm²) ermittelt.

¹zum Kopf hin

²zum Schwanz hin

Organentnahme

Die einzelnen Läsionen, Uteri und Milzen wurden aus den Tieren heraus präpariert und gewogen. Läsionen und Uteri wurden anschließend für die spätere Paraffineinbettung für 24 h in 4 %-iger Formalinlösung fixiert. Die narkotisierten Mäuse wurden im Anschluss an die Organentnahme mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.3.2.6 Aufarbeitung von Peritoneallavagen und Blutproben

Peritoneallavagen

Die bei der Sektion gewonnenen und auf Eis gelagerten Peritoneallavagen wurden im Anschluss bei 4 °C für 10 min mit 300 g zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Zwei Milliliter des Überstandes wurden in einer Zentrifuge mittels Ultrafiltration (Vivaspin 6, Viva-products) auf ein Volumen von 300 µL konzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C eingefroren.

Blutproben

Nach Entnahme aus dem Tier wurden die Blutproben zunächst für mindestens 30 min bei Raumtemperatur (RT) ruhen gelassen, um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 2000 g für 10 min. Das zellfreie Serum wurde als Überstand abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

2.4 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an *Laminar-Air-Flow*-Bänken. Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert bzw. steril verpackt vom Hersteller geliefert. Die Arbeitsfläche der Werkbank sowie alle darunter verwendeten Gegenstände wurden vor der Benutzung mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert.

2.4.1 Verwendete Zellen und Zellkulturmedien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimente wurde die gut differenzierte, endometriale ECC-1-Zelllinie verwendet. Die epithelialen Zellen entstammen dem humanen Adenokarzinom EnCa-101, welches in Nacktmäusen kultiviert und anschließend für die In-vitro-Zellkultur etabliert wurde (185). Im 3D-Modell mit Matrigel sind die Zellen in der Lage, glanduläre Strukturen auszubilden und Muzine zu sekretieren (186). ECC-1-Zellen reagieren äußerst sensitiv auf Estrogenstimulation. Wie normale endometriale Epithelzellen exprimieren sie beide Estrogenrezeptoren, ER α und ER β , sowie Progesteron- und Androgenrezeptoren zusammen mit verschiedenen Koaktivatoren. Zusätzlich weisen sie charakteristische Marker des luminalen Epithels auf (151). Ein entscheidender Faktor für die Auswahl der ECC-1-Zelllinie für diese Arbeit war insbesondere deren sehr gute Expression von TFF3, welche in anderen häufig eingesetzten endometrialen Zellkulturmodellen (Ishikawa, EM42) gar nicht oder nur sehr gering ist. Die verwendeten ECC-1-Zellen wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA) bezogen.

Folgende Medien kamen für die Kultivierung der ECC-1-Zellen zum Einsatz und sind im nachfolgenden Text durch kursive Schreibweise hervor gehoben:

Kulturmedium:

DMEM ohne Phenolrot
10 % FCS
1 % L-Glutamin
1 % Penicillin/Streptomycin
0,01 % Insulin

1 % CCS Hungermedium:

DMEM ohne Phenolrot
1 % CCS
1 % L-Glutamin
1 % Penicillin/Streptomycin
0,01 % Insulin

Serumfreies Medium:

DMEM ohne Phenolrot
1 % L-Glutamin
1 % Penicillin/Streptomycin
0,01 % Insulin

2.4.2 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte in *Kulturmedium* im Brutschrank bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂. Alle drei bis vier Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80–90 % wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte zur Ablösung eine etwa dreiminütige Inkubation bei 37 °C unter Verwendung der TrypLE™ Express-Lösung (Gibco). Das darin enthaltene rekombinante trypsinähnliche Enzym wirkt spezifischer und schonender als herkömmliches Trypsin. Die dadurch abgelösten Zellen wurden nach Zugabe von frischem Medium und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurden 10 µL der Zellsuspension entnommen und mit 10 µL Trypanblau-Lösung vermischt. Anschließend wurden 10 µL der gefärbten Zellen auf eine Countess® Zählkammer gegeben und die Anzahl der vitalen Zellen pro Milliliter mittels des automatischen Zellzählgeräts Countess® (Invitrogen) bestimmt. Die Zellen wurden daraufhin in Kulturflaschen mit einer Dichte von 1–2 x 10⁴ Zellen/cm² neu ausgesät.

Zum Einfrieren der Zellen wurde die erhaltene Zellsuspension, nach Ablösung der Zellen, für 5 min bei 300 g zentrifugiert und anschließend in 4 °C kaltem Einfriermedium (Gibco) resuspendiert. Aliquots von 1–2 x 10⁶ Zellen in 1 mL Kryo-Vials wurden nach kurzer Kühlung auf Eis direkt bei –80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung der Kryokulturen erfolgte bei –196 °C in flüssigem Stickstoff.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension in eine mit 10 mL *Kulturmedium* vorgelegten 75 cm²-Kulturflasche gegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte innerhalb der ersten 24 h.

2.4.3 TFF3-Stimulation in ECC-1-Zellen

Am Vorabend der jeweiligen Experimente wurden die Zellen in den erforderlichen Well-Platten in *Kulturmedium* ausplattiert. Dies entsprach bei 96-Well-Platten 1 x 10⁴ Zellen/Well und bei 24-Well-Platten 4 x 10⁴ Zellen/Well. Am Versuchstag wurde das Medium der über Nacht adhärenierten Zellen abgesaugt und durch frisches *Kulturmedium* ersetzt. Das neuen Medium enthielt unterschiedliche Konzentrationen von TFF3. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kamen folgende TFF3-Lösungen zum Einsatz: 30, 100, 1.000 und 10.000 ng/mL. Bei Kostimulation mit TNFα wurde dieses in einer Konzentration von 10 ng/mL eingesetzt.

2.4.4 Herstellung von estrogenfreiem Serum

Das in der Zellkultur eingesetzte fetale Kälberserum (FCS) welches meist ein essenzieller Zusatz verwendeter Zellkulturmedien ist, enthält neben verschiedenen Wachstumsfaktoren auch Estrogene. Um in 17β -Estradiol (E2)-stimulierten Zellen die erwünschten Effekte beobachten zu können, ist vor Versuchsbeginn der Einsatz von sogenanntem Hungermedium notwendig, welches estrogenbefreites Serum enthält. Die in FCS enthaltenen Steroidhormone können durch Inkubation mit Aktivkohle an diese gebunden und aus dem Serum entfernt werden. Nach Sterilfiltration kann das *Charcoal Stripped Serum* (CCS) für die Herstellung von Hungermedien verwendet werden. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen E2-Versuche wurde ein kommerziell hergestelltes CCS der Firma Genetex verwendet.

2.4.5 17β -Estradiol-Stimulation in ECC-1-Zellen

Für die Untersuchungen von E2-bedingten Effekten wurden die Zellen für zwei Tage in 1 % CCS *Hungermedium* kultiviert, um einen Estrogen-Entzug in den Zellen zu bewirken und somit die E2-Sensitivität der Zellen zu erhöhen. Am Vorabend des jeweiligen Experiments wurden die Zellen in den erforderlichen Well-Platten in 1 % CCS *Hungermedium* ausplattiert. Dies entsprach bei 96-Well-Platten 1×10^4 Zellen/Well und bei 24-Well-Platten 4×10^4 Zellen/Well. Am Versuchstag wurde das alte Medium abgesaugt und die über Nacht adhärenierten Zellen mit *serumfreien Medium* bedeckt. Nach 4 h erfolgte die Zugabe von E2 mit einer Endkonzentration von 10 nM. Die zeitversetzte Stimulation nach Mediumwechsel war notwendig, um mögliche Stressreaktionen der Zellen durch den kompletten Entzug des Serums in den Messungen auszuschließen. Bei Kostimulation mit $\text{TNF}\alpha$ wurden die Zellen analog vorbereitet. Da die verwendete E2-Stammlösung Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel enthielt, welches zytotoxische Eigenschaften aufweist, wurden die Kontrollzellen mit 0,0001 % DMSO versetzten *Serumfreien Medium* inkubiert. Dies entsprach der gleichen Konzentration an DMSO dem die E2-behandelten Zellen ausgesetzt waren.

2.4.6 Zellviabilitäts-Assays

2.4.6.1 CellTiter-Glo® Viabilitäts-Assay

Zur Messung der Zellviabilität wurde der CellTiter-Glo®-Assay der Firma Promega verwendet. Sein Prinzip basiert auf der Messung von Adenosintriphosphat (ATP) in einer ATP-abhängigen Luziferasereaktion, wobei der ATP-Gehalt als Maß für die metabolische Aktivität der Zellen gilt (169). Bei der durch Luziferase katalysierten Reaktion wird das aus den Zellen vorhandene ATP mit Luziferin umgesetzt und es entstehen Oxyluziferin und Licht (siehe Abbildung 2.4). Das Lichtsignal kann im Luminometer gemessen werden und ist proportional zur Anzahl lebender Zellen.

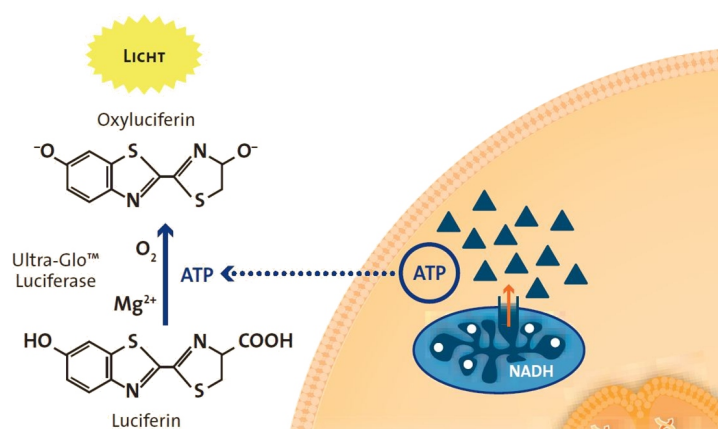


Abbildung 2.4: Prinzip des CellTiter-Glo® Assays (169).

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen in weißen 96-Well-Platten ausplattiert und wie beschrieben mit den jeweiligen Stimulanzen TFF3 und TNF α behandelt. Je nach Versuch wurden die zu messenden Platten nach einer Inkubationszeit zwischen 1 h und 48 h aus dem Brutschrank genommen und aufgrund der temperatursensitiven Reaktion für etwa 30 min auf RT gebracht. Anschließend wurden in jedes Well 100 μ L CellTiter-Glo® Reagenz pipettiert und für 2 min auf einem Plattenschüttler geschüttelt, um eine gleichmäßige Zellyse zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 10 min bei RT wurde das Lumineszenzsignal gemessen. Mit Medium gefüllte Kontrollwells ohne Zellen dienten der Bestimmung des Hintergrundsignals, welches für die finale Auswertung von den erhaltenen Messwerten subtrahiert wurde.

2.4.6.2 ApoLive-Glo™ Multiplex Viabilitäts- und Apoptose-Assay

Der ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay der Firma Promega ermöglicht die Bestimmung von Viabilität und Apoptose in Zellen desselben Versuchsansatzes. Dabei wird im ersten Schritt die Zellviabilität über die Aktivität der sogenannten Live-Cell-Protease bestimmt, welche nur in lebenden Zellen aktiv ist. Die Aktivitätsmessung erfolgt über das pro-fluorogene, zellpermeable

Peptidsubstrat Gly-Phe-Aminofluorocoumarin (GF-AFC), das intrazellulär zu dem fluoreszierenden Produkt Aminofluorocoumarin (AFC) umgesetzt wird. Im zweiten Schritt wird die Apoptose der Zellen bestimmt. Dies basiert auf der Aktivitätsmessung der Caspasen-3 und -7 durch Spaltung eines pro-lumineszenten Substrates (DEVD-Aminoluziferin). Das dabei entstehende Aminoluziferin dient als Substrat für die UltraGlo™-Luziferase, welche eine Luziferasereaktion unter der Entstehung eines Lichtsignals katalysiert.

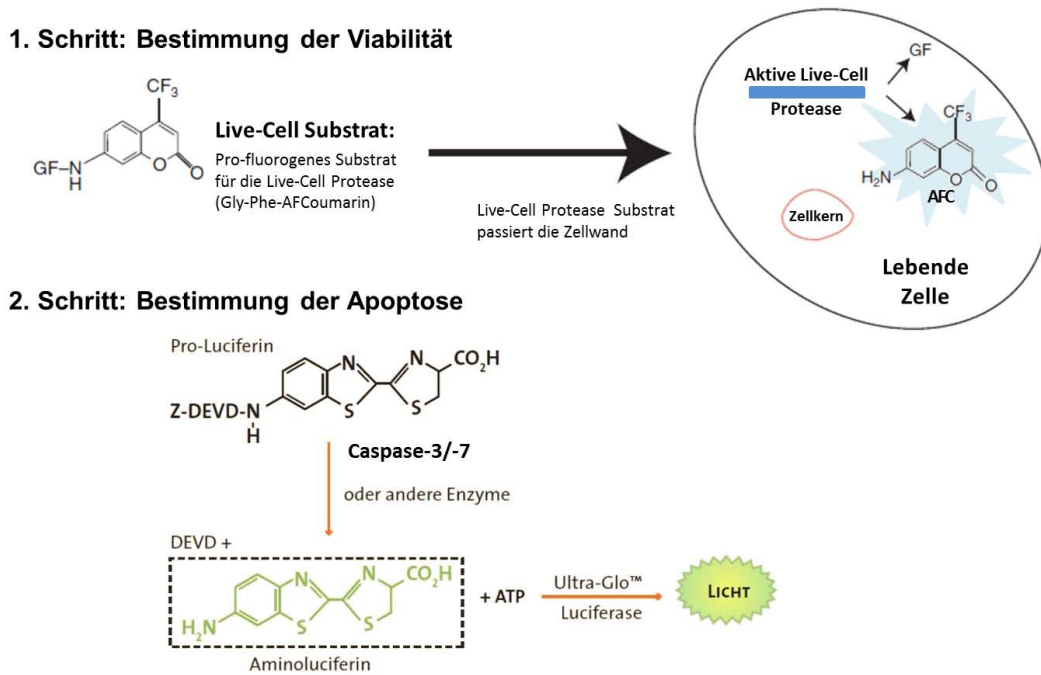


Abbildung 2.5: Prinzip des ApoLive-Glo™ Multiplex Assays (Abb. modifiziert nach (169, 170)).

Zur Bestimmung der Zellviabilität und Apoptose wurden die Zellen in weißen 96-Well-Platten ausplattiert und wie beschrieben mit den jeweiligen Stimulanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit zwischen 1 h und 48 h wurden 20 µL des im Kit enthaltenen Viability-Reagenz in jedes Well pipettiert. Nach kurzem Schütteln wurden die Platten für weitere 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend fluorometrisch vermessen ($\lambda_{Ex} = 400$ nm, $\lambda_{Em} = 505$ nm). Im nächsten Schritt wurden in jedes Well 100 µL des Caspase-Glo® 3/7 Reagenz hinzugefügt, kurz geschüttelt und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Caspase-Aktivität im Luminometer bestimmt. Mit Medium gefüllte Kontrollwells ohne Zellen dienten der Bestimmung des Hintergrundsignals, welches für die finale Auswertung von den erhaltenen Messwerten subtrahiert wurde.

2.4.6.3 BrdU Cell Proliferation ELISA

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde der BrdU Cell Proliferation ELISA (colorimetric) von Roche eingesetzt. Dabei wird Bromdesoxyuridin (BrdU) als chemisches Thymidinanalogon zur Markierung von proliferierenden Zellen verwendet. BrdU wird von der Zelle aufgenommen und anstelle des Thymidins während der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Mit Hilfe eines markierten Antikörpers gegen BrdU kann die erfolgte DNA-Synthese und damit die Proliferation der Zellen gemessen werden.

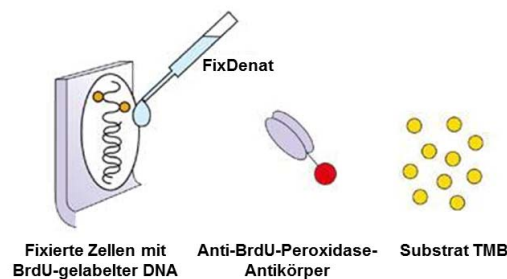


Abbildung 2.6: Prinzip des BrdU Cell Proliferation ELISA (Abb. modifiziert nach (174)).

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden die ECC-1-Zellen in klaren 96-Well-Platten ausplattiert und wie beschrieben mit den jeweiligen Stimulanzien behandelt. Vier Stunden vor Ablauf der eigentlichen Inkubationszeit wurden die Platten aus dem Brutschrank genommen, in jedes Well 10 μL BrdU-Labeling-Lösung hinzupipettiert und für die noch verbliebenen 4 h weiter im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der gesamten Inkubationsdauer wurde das Medium abgesaugt und die Platten für 1 h bei 60 $^{\circ}\text{C}$ im Ofen getrocknet und anschließend bis zur Weiterverarbeitung maximal 7 Tage bei 2 $^{\circ}\text{C}$ bis 8 $^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt. Sobald für alle Zeitpunkte eines Experiments genannte Prozedur durchlaufen war, wurden die Platten gemeinsam auf RT gebracht. Das inkorporierte BrdU in den getrockneten Zellen wurde durch Zugabe von 200 μL FixDenat-Lösung/Well für 2 h fixiert. Nach Entfernung der FixDenat-Lösung wurden 100 μL frisch hergestellte Anti-BrdU-POD-Lösung in jedes Well pipettiert und für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Wells dreimal mit 300 μL Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt wurden 100 μL Substratlösung (TMB) pro Well pipettiert und für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 25 μL Stopplösung (1 M H_2SO_4) wurden die Platten für 1 min geschüttelt und die Absorption umgehend bei 450 nm und der Referenzwellenlänge von 690 nm photometrisch vermessen. Als Negativkontrolle wurden mit BrdU inkubierte Leerwertwells ohne Zellen vermessen.

2.5 Immunologische und molekularbiologische Methoden

2.5.1 Histologische Untersuchungen zur TFF3-Expression in humanen und murinen Endometriumsproben

Zum Nachweis von TFF3 auf Protein- und mRNA-Ebene in humanem und murinem Endometrium wurden histologische Färbungen in Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt. Die in dieser Arbeit bei den Sektionen gewonnenen murinen Proben wurden nach Fixierung in 4 %-iger Formalinlösung in einem Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica) entwässert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet. Die humanen Gewebeproben lagen bereits in Paraffin eingebettet vor und konnten direkt verwendet werden. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) wurden von jedem Block 4 µm dicke Serienschnitte angefertigt und im angewärmten Wasserbad auf Objektträger (Superfrost Plus Gold, Thermo Scientific) aufgezogen. Zur Entfernung von Restwasser und zur optimalen Anhaftung an die Objektträger wurden die Schnitte über Nacht bei 40 °C getrocknet.

2.5.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für eine erste morphologische Analyse wurde standardmäßig eine Übersichtsfärbung der Schnittpräparate mit Hämatoxylin und Eosin angefertigt. Hämatoxylin ist in der Lage, im Alkalischen basophile anionische Strukturen wie DNA im Zellkern blau zu färben, während Eosin als saurer Farbstoff kationische Verbindungen wie basische Zytoplasmaproteine sowie Kollagenstrukturen rot färbt. Die Färbung erfolgte nach einem Standardprotokoll per Hand durch Eintauchen der Objektträger in mit Alkohol bzw. Färbelösung gefüllten Glasküvetten.

Die gefärbten Schnitte wurden am Mirax-Imaging-System (Zeiss) eingescannt und mit Hilfe der Software Panoramic Viewer untersucht und ausgewertet. Für TFF3-spezifische Färbungen wurden entsprechend nur Schnitte berücksichtigt, die endometriale Stroma- und Epithelzellen aufwiesen.

2.5.1.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Analyse diente dem Nachweis und der Lokalisation von TFF3 auf Proteinebene in humanen und murinen endometrialen Gewebeproben. Dafür kam die sogenannte LSAB-Methode (*Labelled Streptavidin Biotin*) zur Anwendung, welche sich die Affinität von Streptavidin zu Biotin zu nutze macht. Das Prinzip basiert auf der spezifischen Bindung des Erstantikörpers an ein bestimmtes Epitop des gesuchten Proteins. Der im Nachhinein aufgetragene biotinylierte Zweitantikörper, auch Brückenantikörper genannt, reagiert mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, welches dann durch das chromogene Substrat Diaminobenzidin (DAB) farblich markiert werden kann.

Für die Färbung verwendet wurden, wenn nicht anders angegeben, Reagenzien der Firma Dako sowie die in der Tabelle 2.5 aufgeführten Antikörper. Als Waschpuffer diente mit Tween® 20 versetztes PBS (0,01 %). Zu Beginn erfolgte die Rehydrierung der Paraffinschnitte mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe. Anschließend wurde eine Antigendemaskierung für 30 min bei 98 °C in einem Dampfgerät unter Verwendung der Target-Retrieval-Lösung (pH 9) durchgeführt. Nach 30-minütiger Abkühlung in der selben Lösung wurde das Gewebe für 10 min mit Peroxidase-Blocking-Lösung behandelt und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für weitere 10 min mit 5 %-igem Ziegen Serum inkubiert. Anschließend erfolgten nacheinander für je 30 min zunächst die Inkubation mit dem Erst- und dann mit dem biotinylierten Zweitantikörper. Danach wurde für 15 min ein mit dem Enzym *Horseradish Peroxidase* (HRP) gekoppelter Streptavidinkomplex auf das Gewebe gegeben, welcher an das Biotin des Zweitantikörpers binden konnte. Zur Visualisierung des entstandenen Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexes mittels des HRP-Enzyms wurden die Schnitte mit dem Substrat DAB für 10 min inkubiert. Abschließend erfolgte mittels Hämatoxylin eine Gegenfärbung der Kerne im Gewebe. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt® (Kindler) eingedeckt.

Analog wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen statt des Erstantikörpers eine Inkubation mit Waschpuffer erfolgte. Als Positivkontrollen für die TFF3-Färbung diente humanes bzw. murines Kolongewebe. Die gefärbten Schnitte wurden am Mirax-Imaging-System eingescannt und mit Hilfe der Software Panoramic Viewer untersucht und ausgewertet.

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.

Zielprotein	Herkunft	Verdünnung	Katalog-Nr.	Hersteller
TFF3 (human)	Kaninchen (polyklonal)	1:200	ab101099	abcam
TFF3 (murin)	Kaninchen (polyklonal)	1:400	bs-0535R	BIOSS
Kaninchen IgG	Ziege (polyklonal)	1:500	E0432	Dako

2.5.1.3 In-situ-Hybridisierung

Zum Nachweis von TFF3-mRNA in Schnittpräparaten von humanem Endometrium wurde eine In-situ-Hybridisierung durchgeführt durch welche Nukleinsäuren, also DNA und RNA, in Geweben oder einzelnen Zellen nachgewiesen werden können. Der hierfür verwendete RNAscope® 2.0 High Definition Assay (Advanced Cell Diagnostics) bietet die Möglichkeit mit komplementären Sonden einzelne RNA-Moleküle durch eine besondere Methode der Signalverstärkung sichtbar zu machen. Zusätzlich werden durch den Einsatz zweier unabhängiger Sonden, die nur als Paar von den Verstärkermolekülen erkannt werden, unspezifische Bindungen auf ein Minimum reduziert und dadurch Hintergrundrauschen vermieden (226).

Die Durchführung der In-situ-Hybridisierung erfolgte durch das Labor von Dr. Oliver von Ahsen der Bayer Pharma AG. Zur Erfassung humaner TFF3-mRNA wurde ein eigens herge-

stelltes Sondenpaar der Firma Advanced Cell Diagnostics verwendet (Hs-TFF3, UniGeneID Hs.82961 Exon 2–3 boundary). Vor Anwendung des RNAscope®-Assays erfolgte die Rehydrierung der Paraffinschnitte mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe. Anschließend wurde eine Antigendemaskierung für 30 min bei 98 °C in einem Dampfgarer unter Verwendung der Target-Retrieval-Lösung (pH 9) durchgeführt und die Objektträger 30 min bis zur Abkühlung in der Lösung belassen. Nachfolgende Schritte entsprachen dem Protokoll des Herstellers (2). Zum Abschluss erfolgte mittels Hämatoxylin eine Gegenfärbung der Kerne im Gewebe. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt® eingedeckt. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte am Mirax-Imaging-System eingescannt und mit Hilfe der Software Panoramic Viewer untersucht und ausgewertet.

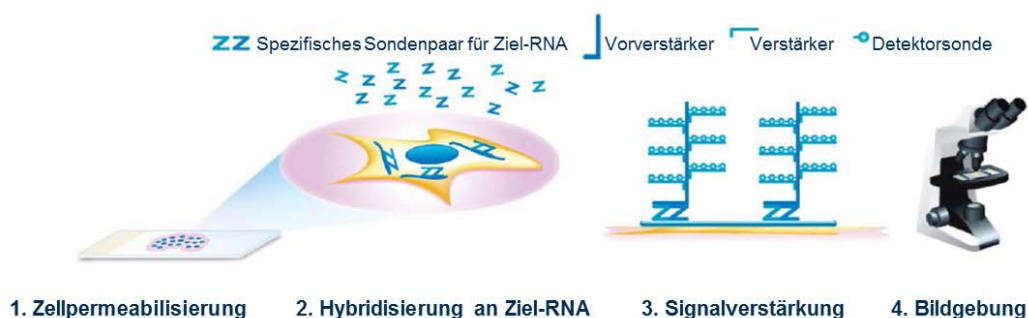


Abbildung 2.7: Prinzip der In-situ-Hybridisierung mittels RNAscope® 2.0 (Abb. modifiziert nach (2)). Im ersten Schritt erfolgt durch einen Proteaseverdau die Zellpermeabilisierung (1) wodurch der Eintritt des spezifischen Sondenpaares in die Zelle und deren nachfolgende Hybridisierung an die Ziel-RNA ermöglicht wird (2). Im nächsten Schritt werden multiple Verstärkermoleküle an die gemeinsam vorliegenden Sondenpaare gebunden (3), welche durch HRP-gekoppelte Detektorsonden und das Substrat DAB sichtbar gemacht und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden können (4).

2.5.2 TFF3-Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten mittels ELISA

Zur Konzentrationsbestimmung von TFF3 in Seren sowie in Peritoneallavagen der Mäuse kamen zwei verschiedene *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur Anwendung. Das Prinzip eines ELISAs basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion und einer anschließenden enzymgekoppelten Farbreaktion zu deren Visualisierung, welche mittels Standardkurve eine quantitative Analyse des nachzuweisenden Proteins erlaubt.

2.5.2.1 TFF3-Bestimmung in humanen Seren

Zur TFF3-Bestimmung der in Abschnitt 2.2.3 auf Seite 24 beschriebenen humanen Serumproben kam ein TFF3-Sandwich-ELISA der Firma BioVendor (RD191160200R) zur Anwendung (Prinzip siehe Abbildung 2.8 A). Die Proben waren 1:5 mit dem im Kit enthaltenen Dilution-Buffer verdünnt worden und zur Einfachbestimmung in die mit dem Erstantikörper beschichteten 96-Well-Platten pipettiert. Die TFF3-Standardreihe (0,075–2,4 ng/mL) wurde nach dem beigefügten Protokoll hergestellt und jeweils in Duplikaten eingesetzt. Nachfolgende Inkubationszeiten

beider Antikörper und dem Substrat mit der Probe erfolgten nach dem Herstellerprotokoll (24). Die finale Farbentwicklung wurde nach 10 min mittels der enthaltenen Stop-Lösung beendet und die Platten umgehend bei der Wellenlänge 450 nm und der Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch vermessen. Anhand der gemessenen TFF3-Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt und darauf basierend die Konzentrationen in den einzelnen Proben ermittelt. Das minimale Detektionslimit des ELISAs lag laut Hersteller bei 0,009 ng/mL TFF3.

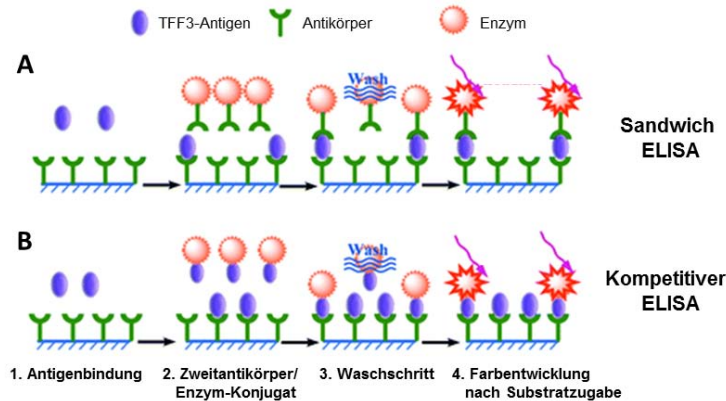


Abbildung 2.8: Prinzip von Sandwich- und Kompetitiven ELISA (Abb. modifiziert nach (134)).

2.5.2.2 TFF3-Bestimmung in murinen Peritoneallavagen und Seren

Für die Bestimmung von murinem TFF3 in Peritoneallavagen und Seren kam ein kompetitiver TFF3-ELISA der Firma BlueGene (E03T0134) zur Anwendung (Prinzip siehe Abbildung 2.8 B). Die in Abschnitt 2.3.2.6 auf Seite 30 gesammelten Peritoneallavagen wurden unverdünnt eingesetzt, die Serumproben 1:2 mit PBS verdünnt. Die vom Hersteller bereits fertig angesetzte Standardreihe wurde in je zwei Wells und die zu bestimmenden Proben in je ein Well der mit TFF3-Antikörper beschichteten Platte pipettiert (50 µL). Direkt im Anschluss wurden jeweils 100 µL TFF3-Enzym-Konjugat dazu gegeben und gemeinsam mit den Proben inkubiert. Das enthaltene TFF3 konkurrierte nun mit den ebenfalls hinzugefügten TFF3-Konjugaten um die Bindungsstellen des Festphasen-Antikörpers. Nach einem Waschschrift und anschließender Zugabe eines farbgebenden Substrats, entwickelten die gebundenen TFF3-Enzym-Konjugate einen blauen Farbkomplex. Nach Stoppen der Reaktion durch die enthaltene Stopp-Lösung wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Die erhaltene Farbintensität war dabei umgekehrt proportional zur TFF3-Konzentration in den Proben. Anhand der TFF3-Standardreihe wurde die Standardkurve erstellt und darauf basierend die genauen Konzentrationen in den Proben ermittelt. Die Sensitivität des ELISAs lag laut Hersteller bei 1 pg/mL TFF3 (25).

2.5.3 Bestimmung Akuter-Phase-Proteine in murinen Seren

Die Bestimmung Akuter-Phase-Proteine in murinem Serum erfolgte mittels Luminex Multiplex-Analyse mit den beiden *Mouse Acute Phase Magnetic Bead Panels* 1 und 2 der Firma Millipore (MAP1MAG-76K, MAP2MAG-76K). Dabei kommt das selbe Prinzip der Luminex® xMAP® Technologie zur Anwendung, welches bereits im Abschnitt 2.2.2.2 auf Seite 23 beschrieben wurde. Die Durchführung der Messung erfolgte durch die toxikologische Abteilung der Bayer Pharma AG.

Die Herstellung der Reagenzien (Bead-Gemisch, Kontrollen, Standards) und die Durchführung des Assays erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers (147, 148). Lediglich die verwendeten Verdünnungen der Serumproben wurden nach Erfahrungswert festgelegt und sind in Tabelle 2.6 dargestellt. In einer ersten Messung wurden für die Zeitpunkte 2 und 4 Wochen folgende neun Akute-Phase-Proteine vermessen: Serum Amyloid A3 (SAA-3), Haptoglobin, Serum Amyloid P (SAP), Pentraxin, Lipocalin, Adipsin, Saures Glykoprotein, α 2-Makroglobulin und C-reaktives Protein (CRP). Die Konzentrationen von SAA-3, Haptoglobin und SAP wurden in einer darauffolgenden zweiten Messung auch für die Zeitpunkte 6 und 8 Wochen bestimmt.

Tabelle 2.6: Eingesetzte Verdünnungen für die Messung der Akute-Phase-Proteine.

Akute-Phase-Protein	1. Messung 2 und 4 Wochen	2. Messung 6 und 8 Wochen	MDC* (ng/mL)
Serum Amyloid A3 (SAA-3)	1:25	1:10	0,899
Pentraxin	1:25	–	0,007
Lipocalin	1:25	–	0,013
Haptoglobin	1:5.000	1:2.000	0,621
Serum Amyloid P (SAP)	1:5.000	1:2.000	6,944
Adipsin	1:5.000	–	0,004
Saures Glykoprotein	1:5.000	–	0,001
α 2-Makroglobulin	1:5.000	–	7,495
C-reaktives Protein (CRP)	1:5.000	–	0,009

*Minimal Detectable Concentration: Minimales Detektionslimit (laut Hersteller)

2.5.4 Genexpressionsanalyse aus Zelllysaten mittels RT-PCR

2.5.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zelllysaten

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zelllysaten der durchgeführten Zellkulturexperimente wurde das RNeasy® Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezifische Aufreinigung der RNA über hydrophile Siliziumgel-Säulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten, der im Abschnitt 2.4 beschriebenen Stimulationsversuche, wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit PBS direkt in den Zellkulturplatten in RLT Lyse Puffer (Qiagen) lysiert. Bei Versuchen in 24-Well-Platten erfolgte die Zelllyse in je 350 µL RLT Puffer pro Replikat und Well. Um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu gewährleisten, erfolgte bei Versuchen in 96-Well-Platten eine Zusammenführung von vier Einzelwells mit je 88 µL RLT Puffer. Die eigentliche RNA-Isolierung erfolgte im QIAcube™ unter Verwendung des RNeasy® Mini Kits gemäß dem Protokoll *Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology*. Der QIAcube™ erlaubte dabei die vollautomatische Aufarbeitung der Spinsäulen mithilfe der integrierten Zentrifuge. Zur Entfernung genomischer DNA erfolgte mittels des RNase-Free-DNase Sets (Qiagen) zudem ein DNase-Verdau. Die isolierte RNA wurde am Ende in 30 µL RNasefreiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

2.5.4.2 Quantitative Analyse isolierter RNA

Die quantitative Analyse und Reinheitsbestimmung der zuvor isolierten Gesamt-RNA erfolgte mit einem NanoDrop® ND-8000 Spektralphotometer durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm. Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde jeweils 1,5 µL Probenvolumen eingesetzt. Ausgegeben wurde die RNA-Konzentration in ng pro µL. Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280 nm gilt als Maß für die Reinheit der extrahierten RNA. Ein Wert von 2,0 für RNA gilt als optimal. Für nachfolgende molekularbiologische Analyseverfahren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Proben mit entsprechenden Absorptionsquotienten zwischen 1,8 und 2,2 verwendet.

2.5.4.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Durch Umschreiben der isolierten RNA in *complementary DNA* (cDNA) wird diese für eine quantitative Bestimmung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zugänglich gemacht. Bei der Synthese von cDNA wurde die in der isolierten Gesamt-RNA enthaltene mRNA mittels des SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) umgeschrieben. Die Probenvorbereitung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in einem Ansatz von 20 µL durchgeführt, wobei jeweils 350 ng Gesamt-RNA eingesetzt wurden.

Das Reaktionsvolumen für die Reverse Transkription setzte sich wie folgt zusammen:

4 μ L	5 \times VILO [®] Reaction Mix
2 μ L	10 \times SuperScript [®] Enzyme Mix
x μ L	RNA (350 ng)
ad 20 μ L	Nukleasefreies Wasser

Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte im ThermoCycler GeneAmp[®] PCR System 2700 nach folgendem Temperaturprofil: 10 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C und 5 min bei 5 °C. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei –20 °C gelagert.

2.5.4.4 Real-Time TaqMan[®] Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Real-Time TaqMan[®] PCR, ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich eine quantitative Bestimmung der gewonnenen cDNA ermöglicht. Mithilfe der Quantifizierung lässt sich eine Aussage über die ursprüngliche mRNA-Menge jedes Zielgens und dessen Expression machen.

Die Quantifizierung erfolgt unter Zuhilfenahme der sogenannten TaqMan[®] Sonden, die innerhalb der jeweils verwendeten Primer-Paare an die RNA binden. Die Sonden enthalten einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (hier: Carboxyfluorescein (FAM)) und einen Quencher⁴, welcher aufgrund der räumlichen Nähe die Fluoreszenz zunächst durch einen Energietransfer unterdrückt. Im Verlauf der PCR baut die Taq-Polymerase die Sonde ab. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und eine proportional zum PCR-Produkt ansteigende Fluoreszenz kann gemessen werden, welche in Echtzeit erfasst wird.

Für die relative Quantifizierung wird ein sogenanntes *Housekeeping Gen* als endogene Kontrolle herangezogen. Dieses ist ungeachtet aller Versuchsbedingungen im untersuchten Gewebe gleichbleibend exprimiert. Die Normierung auf ein solches Referenzgen hat den Vorteil, dass unterschiedliche Ansätze miteinander verglichen werden können.

Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte innerhalb 40 Zyklen unter Verwendung einer 384-Well-Platte an einem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Für jedes Zielgen wurde ein speziell entworfener TaqMan[®] Gene Expression Assay mit genspezifischem Primer- und Sonden-Set (Assay-on-Demand[™], Applied Biosystem) bezogen (siehe Tabelle 2.7). HPRT1 fungierte als Housekeeping Gen. Die Bestimmung aller cDNA-Proben erfolgte mindestens in Triplikaten.

⁴Löschsubstanz

Das Reaktionsvolumen von 10 µL für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,5 µL cDNA
- 0,5 µL Assay-on-Demand™ (Applied Biosystems)
- 5,0 µL TaqMan® Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems)
- 4,0 µL Nuklease-freies Wasser

Die PCR verlief nach folgendem Temperaturprofil:

	PCR Vorlauf		PCR (40 Zyklen)	
	UNG* -Aktivierung	Polymerase-Aktivierung	Denaturierung	Annealing/Extension
Temp.	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit	2 min	20 s	1 s	20 s

*Uracil-N glycosylase

Der eingesetzte TaqMan® Fast Advanced Master Mix bestand aus folgenden Komponenten:

- AmpliTaq® Fast DNA Polymerase
- Uracil-N glycosylase (UNG)
- dNTPs mit dUTP
- ROX Farbstoff (passive Referenz)
- optimierte Puffer Komponenten

2.5.4.5 Berechnung der relativen Expression von Zielgenen

Zur Auswertung wurden die von der Software SDS ausgegebenen C_T -Werte herangezogen. Der Schwellenwert-Zyklus C_T gibt die Zyklenzahl an, in dem das spezifische Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht. Je niedriger der C_T -Wert, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens in der Probe.

Die Berechnung der relativen Expression der gemessenen Zielgene erfolgte mittels der sogenannten *Vergleichenden C_T -Methode*. Dafür wurde zunächst die Differenz aus dem C_T -Wert des Zielgens X und dem C_T -Wert des *Housekeeping Gens* (HPRT1) gebildet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,X} - \Delta C_{T,HPRT1}$$

Die relative Expression des Zielgens X ergab sich anschließend nach folgender Formel:

$$rel. Expr. (X) = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Tabelle 2.7: Verwendete Assays-on-Demand™.

Genbezeichnung	Kodierendes Protein	Assay-on-Demand™
<i>HPRT1</i>	<i>Housekeeping Gen</i>	<i>Hs99999909_m1</i>
APC	Adenomatous polyposis coli	Hs01568269_m1
CDH1	E-Cadherin	Hs01023894_m1
CTNNA1	α-Catenin	Hs00944794_m1
CTNNB1	β-Catenin	Hs00355049_m1
CTNND1	γ-Catenin	Hs00609738_g1
ESR1	Estrogenrezeptor α	Hs00174860_m
FOS	c-Fos	Hs99999140_m1
MUC1	Mucin 1	Hs00159357_m1
MUC5B	Mucin 5B	Hs00861595_m1
MYC	c-Myc	Hs00153408_m1
PGR	Progesteronrezeptor A/B	Hs01556702_m1
TFF1	Trefoil factor 1	Hs00907239_m1
TFF2	Trefoil factor 2	Hs00193719_m1
TFF3	Trefoil factor 3	Hs00902278_m1

2.6 Statistische Analyse

Aufbereitung und Normalisierung erhaltener Messdaten erfolgte mittels Excel 2010 (Microsoft). Die anschließende grafische Darstellung sowie die Durchführung statistischer Analysen wurde unter Verwendung der Software GraphPad Prism 6.0 durchgeführt.

Zu Beginn der statistischen Auswertung wurden Human- und In-vivo-Daten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Dabei ergaben sich normalverteilte Werte für die In-vivo-Daten des Mausmodells. Die Humandaten aus Peritonealflüssigkeit und Serum zeigten keine Normalverteilung und wurden daraufhin mit nicht-parametrischen Testverfahren analysiert. Bei den Zellkulturexperimenten wurde von einer Normalverteilung ausgegangen und ausschließlich der Mittelwert mit Standardabweichung (SD) aller Replikate dargestellt. Statistische Test-Ergebnisse mit einem p-Wert von $p < 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet (* $p < 0,05$: signifikant; ** $p < 0,01$: sehr signifikant; *** $p < 0,001$: hochsignifikant).

Humandaten

Unterschiede der Proteinkonzentration in Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit und ohne Endometriose wurden paarweise mittels des Mann-Whitney-Test, einem Rangsummen-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Korrelation verschiedener Proteine mit TFF3 wurde mittels des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten dargestellt. Bei der TFF3-Analyse im Serum wurden Unterschiede von aufeinanderfolgenden Zeitpunkte während des Menstruationszyklus mit dem Wilcoxon-Test, einem Test für nicht-parametrische, gepaarte Werte geprüft (Day 1 – Day 9; Day 9 – LH+3; LH+3 – LH+11).

In-vivo-Daten (Mausmodell)

Zur Betrachtung einer Behandlungsgruppe an verschiedenen Zeitpunkten wurde ein zweiseitiger t-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt (Läsionswachstum einer Gruppe über die Zeit). Beim Vergleich verschiedener Versuchsgruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgte eine Varianzanalyse mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) (Einfluss unterschiedlicher Anzahl an Läsionen). Zur Untersuchung der Abhängigkeit zwischen dem Milzgewicht und der TFF3-Konzentration in Peritoneallavagen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient r bestimmt, der das Ausmaß eines linearen Zusammenhang normalverteilter Daten ausdrückt.

In-vitro-Daten (Zellkulturmodell)

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten wurden mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt. In Versuchen, in denen neben verschiedenen Behandlungsgruppen auch unterschiedlich lange Inkubationsdauern als zweiter Faktor berücksichtigt werden musste, kam die *Two-Way-ANOVA* zur Anwendung. Da ANOVA nur eine allgemeine Aussage zur Variation von Mittelwerten gibt, wurde im Anschluss stets ein paarweiser Vergleich einzelner Gruppen mit der Kontrolle mittels des Post-hoc-Test nach Dunnett durchgeführt, zur Darstellung signifikanter Unterschiede der Behandlungsgruppen. Bei nur zwei zu vergleichenden Gruppen (Kontrolle und E2-Stimulation) kam ein ungepaarter t-Test, mit Berücksichtigung einer multiplen Bestimmung nach der Holm-Sidak-Methode, zur Anwendung.

Kapitel 3

Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde TFF3 in Hinblick auf seine Expression und Regulation in Endometriose untersucht. Dafür erfolgten zu Beginn Untersuchungen in Endometriumsproben, Peritonealflüssigkeit und Serum erkrankter Frauen. Im zweiten Teil wurden Studien zur TFF3-Expression in einem Mausmodell für Endometriose durchgeführt. Dabei wurde die TFF3-Konzentration in Peritoneallavagen und Serum sowie die Expression in murinem Endometrium untersucht. Im dritten Teil dieser Arbeit erfolgten Studien in einem endometrialen Zellkulturmodell. Dabei wurde zunächst die Regulation von TFF3 durch 17β -Estradiol (E2) und $TNF\alpha$ in ECC-1-Zellen analysiert und anschließend der Effekt von rekombinantem TFF3 auf die Genexpression verschiedener Gene sowie auf Zellviabilität, Apoptose und Proliferation.

3.1 TFF3-Studien in klinischer Endometriose

3.1.1 TFF3-Expression in eutopem und ektopem Endometrium

Neben widersprüchlichen Literaturdaten zur TFF3-Expression in eutopem Endometrium von Frauen gibt es bis dato noch keine Veröffentlichung zur TFF3-Expression in Endometrioseherden. Aus diesem Grund wurde zu Beginn dieser Arbeit eutopes proliferatives Endometrium ($n = 2$) sowie ektopes Endometrium peritonealer Läsionen ($n = 3$) auf das Vorhandensein von TFF3 mittels In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie analysiert. Durch In-situ-Hybridisierung konnte TFF3 auf mRNA-Ebene und durch Immunhistochemie auf Proteinebene dargestellt werden.

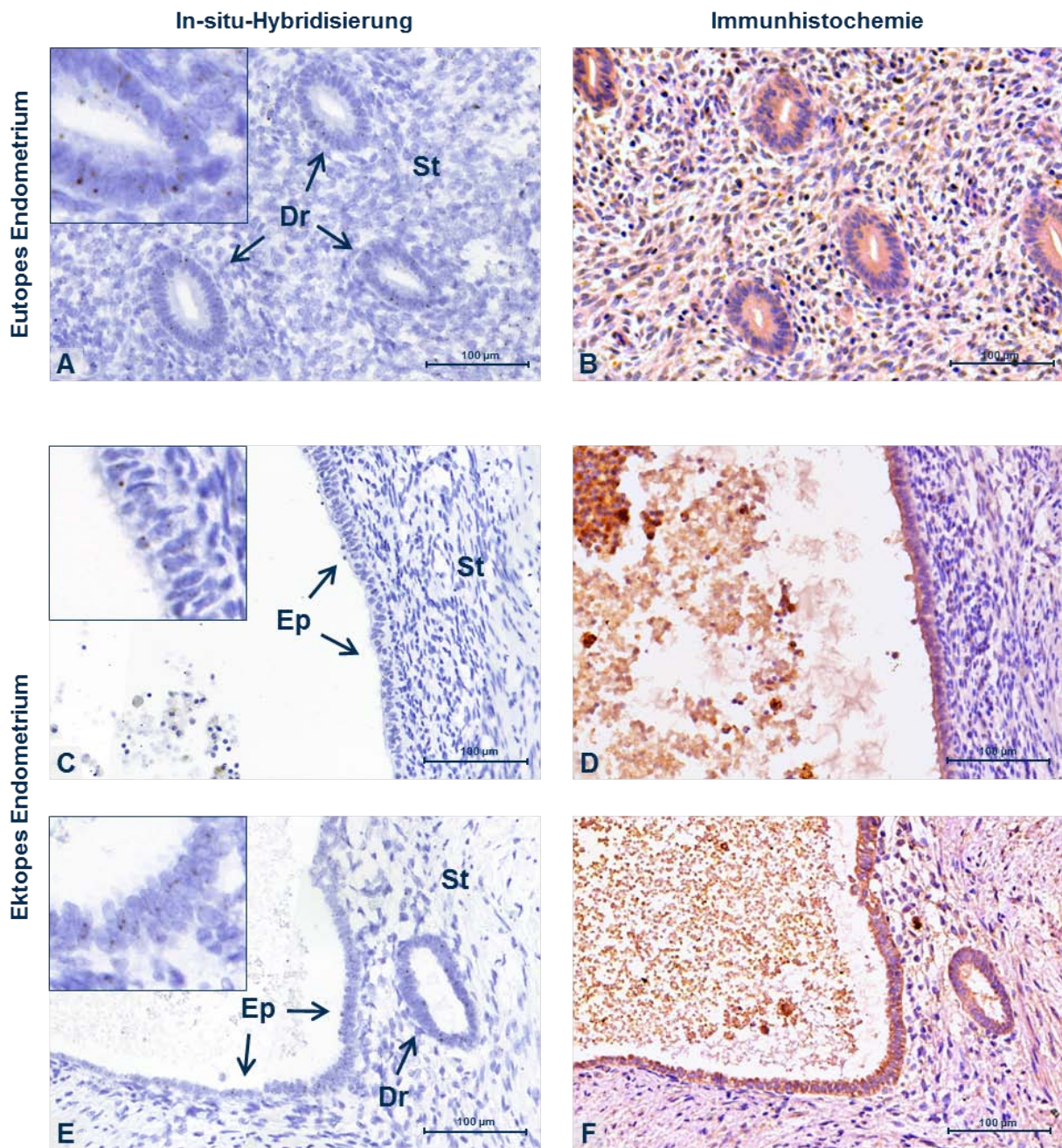


Abbildung 3.1: TFF3-Expression im eutopen proliferativen Endometrium des Uterus (A+B) und im ekto- pen Endometrium peritonealer Endometrioseherde (C-F). Durch In-situ-Hybridisierung (*links*) wurde TFF3 auf mRNA-Ebene und durch Immunhistochemie (*rechts*) auf Proteinebene angezeigt. TFF3 ist primär lokalisiert in den glandulären Epithelzellen der Drüsen des eutopen und ekto- pen Endometriums. TFF3-mRNA wird in Form kleiner dunkelbrauner Punkte angezeigt (*links*), TFF3-Protein durch zytosolische Braunfärbung der Zellen (*rechts*). Im Lumen der ekto- pen Drüsen sind Ansammlungen von Lymphozyten und roten Blutkörperchen zu sehen, die bei der Immunhistochemie zu einer unspezifischen Braunfärbung führen. *Dr*: Drüsen, *Ep*: Epithelzellen, *St*: Stromazellen. Die Färbung erfolgte auf Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten humanen Schnittpräparaten (4 µm). Als farbgebendes Substrat kam DAB zum Einsatz.

Auf der linken Seite in der Abbildung 3.1 A und B ist die Expression von TFF3 in humanem eutopen Endometrium des Uterus dargestellt. Durch In-situ-Hybridisierung angefärbte TFF3-mRNA fand sich vorzugsweise im Drüsenepithel (A). Die immunhistochemische Färbung zeigte ein ähnliches Bild mit der TFF3-Expression in den glandulären Epithelzellen und vereinzelt auch in Stromazellen (B). Im ektopen Endometrium peritonealer Endometrioseherden war TFF3 auf mRNA- (C, E) und Proteinebene (D, F) ausschließlich im Epithel lokalisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TFF3 im Drüsenepithel des eutopen und ektopen Endometriums sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Erstmals wurde gezeigt, dass TFF3 auch in endometriotischen Läsionen exprimiert ist.

3.1.2 Proteinanalyse in Peritonealflüssigkeiten

Für Endometriose werden verschiedene Faktoren in der Peritonealflüssigkeit als herauf- oder herunterreguliert beschrieben. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Peritonealflüssigkeiten von 50 Frauen mit und ohne Endometriose mittels Multiplexanalyse auf die Konzentration von TFF3 und potenziell relevanten Proteine untersucht.

3.1.2.1 TFF3-Konzentrationen in Peritonealflüssigkeiten

Abbildung 3.2 zeigt die TFF3-Konzentration in Peritonealflüssigkeiten der Kontrollfrauen im Vergleich zu Frauen mit Endometriose verschiedener Schweregrade (rAFS-Score).

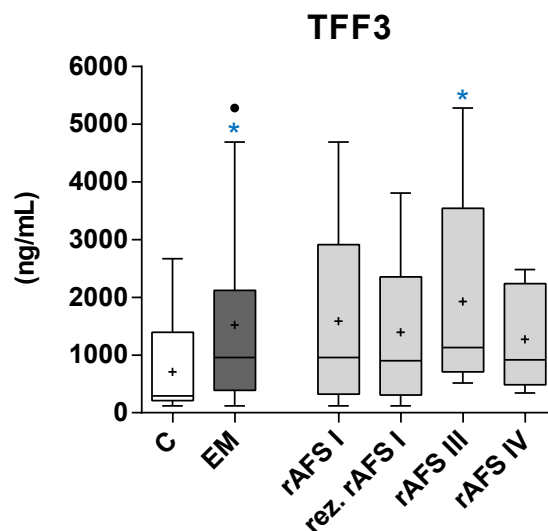


Abbildung 3.2: TFF3-Konzentrationen in Peritonealflüssigkeiten. TFF3-Konzentrationen von Frauen mit Endometriose waren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Endometriose ($p=0,0219$). C: Kontrollpopulation ohne Endometriose, EM: Frauen mit Endometriose aller Stadien, rAFS: revised American Fertility Society Score, rez.: rezidivierende Endometriose.

Anzahl der Frauen: C: $n=16$; EM: $n=34$; rAFS I: $n=12$; rez. rAFS I: $n=12$; rAFS III: $n=5$; rAFS IV: $n=5$.

Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Statistik: zweiseitiger Mann-Whitney-Test, * $p<0,05$.

Die Gesamtheit aller erkrankten Frauen (EM, $n = 34$) wies signifikant erhöhte TFF3-Level ($p=0,0219$) mit einem Medianwert von 956,5 ng/mL auf. Im Gegensatz dazu ergab sich für Frauen ohne Endometriose ein Median von 294,0 ng/mL ($n = 16$). Bei Betrachtung aller einzelnen rAFS-Klassen im Vergleich zur Kontrolle waren deutlich erhöhte Werte zu erkennen, die bei Frauen im Stadium rAFS III ($n = 5$) signifikant waren ($p=0,0476$). Eine Korrelation des TFF3-Anstiegs mit dem Erkrankungsstadium war nicht zu erkennen.

3.1.2.2 Regulierte Proteine in Peritonealflüssigkeiten

Abbildung 3.3 auf der rechten Seite zeigt die Proteine, die neben TFF3 im Rahmen dieser Arbeit genauer analysiert wurden. Das in der Literatur sicher am häufigsten beschriebene CA 125 wurde durch seine Heraufregulation in Endometriose zeitweise auch als diagnostischer Biomarker gehandelt. In den hier untersuchten Peritonealflüssigkeiten war CA 125 in der Gesamtpopulation aller Frauen mit Endometriose sowie in den Subgruppen rez. rAFS I und rAFS IV signifikant erhöht. CA 19-9 wies keinen signifikanten Unterschied zwischen allen erkrankten Frauen und der Kontrollgruppe auf, was aber auf die große Streuung einzelner Frauen zurückzuführen sein könnte. Nur Frauen mit ausgeprägter Endometriose (rAFS IV) wiesen signifikant erhöhte CA 19-9-Konzentrationen auf. IL-8 war in den Subgruppen rAFS I und IV signifikant erhöht, möglicherweise ergab sich aufgrund eines Ausreißers keine statistische Signifikanz für die Gesamtheit aller Endometriosepatientinnen. MCP-1 wies in den gemessenen Proben keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf. G-CSF war in der Gesamtheit aller erkrankten Frauen sowie in der Subgruppe rez. rAFS I signifikant heraufreguliert. Lösliches VCAM-1 war in Frauen mit Endometriose signifikant erniedrigt. Auch in der Subgruppe rAFS I war eine signifikante Erniedrigung zu verzeichnen, die bei fortgeschrittenen Stadien leicht rückläufig war.

MMP-1, MMP-7 und MMP-10 sowie der MMP-Gegenspieler TIMP-1 waren in den Peritonealflüssigkeiten aller erkrankten Frauen und/oder in einzelnen Stadien signifikant erhöht. Auch MMP-9 zeigte einen erhöhten Trend, welcher aber aufgrund einzelner Ausreißer nicht statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle war. MMP-3 war als einzige Metalloproteinase signifikant erniedrigt. Sie war sowohl in der Gesamtheit aller erkrankten Frauen als auch in der Subgruppe rAFS III signifikant herunter reguliert im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.2.3 Zusammenhang von TFF3-Spiegeln mit denen regulierter Proteinen

Um einen potenziellen Zusammenhang der erhöhten TFF3-Spiegel in Peritonealflüssigkeiten erkrankter Frauen mit ebenfalls regulierten Proteinen zu untersuchen, wurde paarweise der Rangkorrelationskoeffizient r nach Spearman bestimmt. Dieser gibt Auskunft über die Korrelation zweier ordinalskaliert Variablen, während er gleichzeitig Ausreißern gegenüber robust ist. Einbezogen wurden dabei die Werte aller Frauen mit Endometriose ohne die Kontrollgruppe

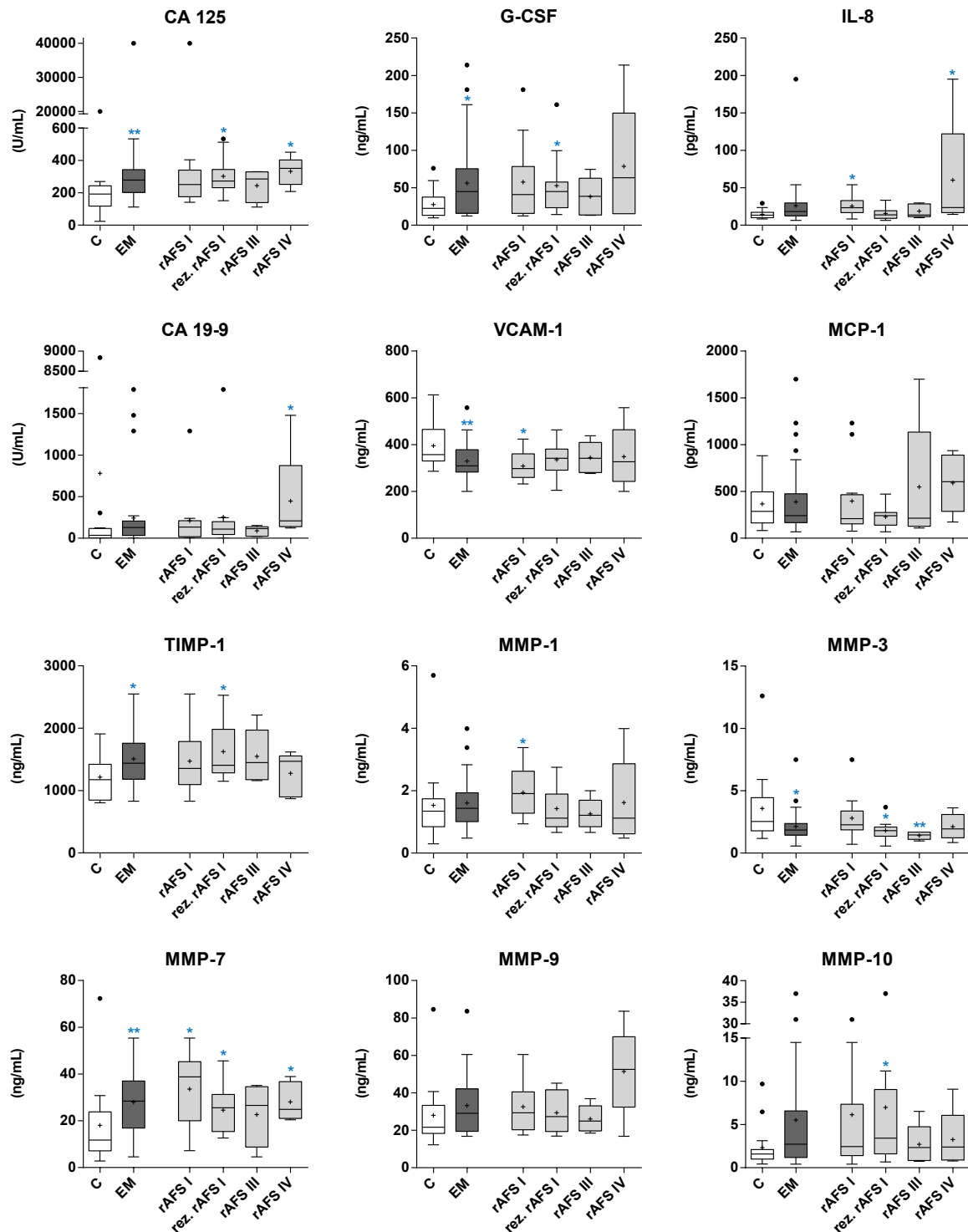


Abbildung 3.3: Konzentrationen ausgewählter Proteine in Peritonealflüssigkeit. Proteinkonzentrationen von Frauen mit Endometriose im Vergleich zur Kontrolle ohne Endometriose. C: Kontrollpopulation ohne Endometriose, EM: Frauen mit Endometriose aller Stadien, rAFS: revised American Fertility Society Score; rez.: rezidivierende Endometriose.

Anzahl der Frauen: C: $n = 16$; EM: $n = 34$; rAFS 1: $n = 12$; rez. rAFS I: $n = 12$; rAFS III: $n = 5$; rAFS IV: $n = 5$. Darstellung: Tukey Box Plots mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Statistik: zweiseitiger Mann-Whitney-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

($n = 34$). In Tabelle 3.1 sind die positiven Korrelationen von TFF3 mit CA 125, IL-8, MCP-1, MMP-7 und G-CSF dargestellt. Trotz vereinzelter physiologischer Ausreißer zeigte die Gesamtheit aller Werte eines jeden Proteins demnach eine ähnliche Regulation wie TFF3 in der Peritonealflüssigkeit erkrankter Frauen. Ein besonderes Augenmerk ist auf die hochsignifikante Korrelation zwischen TFF3 und G-CSF zu legen. G-CSF wurde im Zusammenhang mit Endometriose bisher noch nicht beschrieben. Wie in Abbildung 3.3 auf der vorherigen Seite dargestellt, zeigten unsere Daten neben der positiven Korrelation mit TFF3 auch eine signifikante Heraufregulation von G-CSF in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose.

Tabelle 3.1: Korrelation von TFF3 mit Proteinen in Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose. Konzentrationen der Proteine sind dargestellt als Median (mit Minimal- und Maximalwert).

	Kontrollen ($n = 16$)	EM ($n = 34$)	Spearman's r	p -Wert
TFF3 (ng/mL)	294,0 (119,0 - 2.670)	956,5 (119,0 - 5.280)	–	–
CA 125 (U/mL)	193,0 (23,7 - 20.000)	279,0 (112,0 - 40.000)	0,4227	0,0064 (**)
IL-8 (pg/mL)	13,5 (8,3 - 29,3)	17,4 (4,4 - 195,0)	0,5433	0,0004 (***)
MCP-1 (pg/mL)	286,5 (82,7 - 882,0)	242,0 (67,9 - 1.700)	0,5806	0,0002 (***)
MMP-7 (ng/mL)	11,8 (2,8 - 72,3)	28,5 (4,6 - 55,4)	0,5777	0,0002 (***)
G-CSF (ng/mL)	27,5 (9,9 - 76,1)	56,2 (12,3 - 214,0)	0,6159	0,0001 (***)

EM: Frauen mit Endometriose aller Krankheitsstadien; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In Abbildung 3.4 sind exemplarisch die Messwerte von TFF3 paarweise gegen G-CSF, MCP-1 und MMP-7 aufgetragen. Eine lineare Regression der Werte unterstreicht den Zusammenhang von TFF3 mit jedem der Faktoren grafisch.

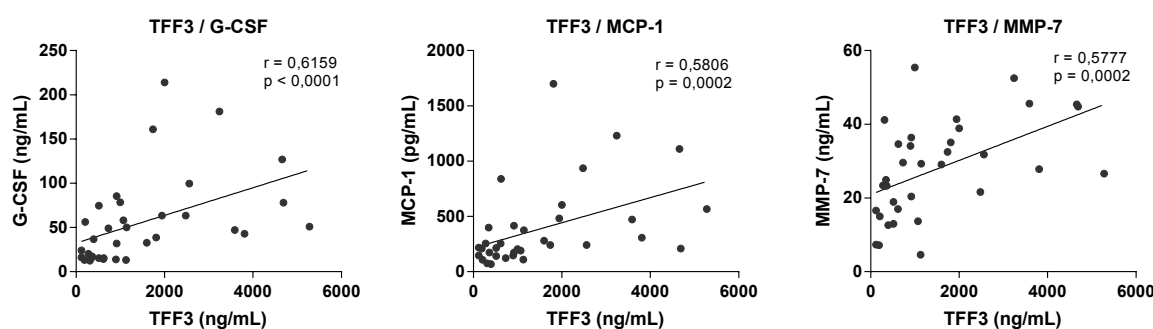


Abbildung 3.4: Positive Korrelationen von TFF3 mit G-CSF, MCP-1 und MMP-7 in Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose.

Aufgetragen sind $n = 34$ Frauen mit Endometriose verschiedener Stadien. Die lineare Regression (Gerade) stellt den Zusammenhang beider Faktoren grafisch miteinander dar. Spearman's r und p -Wert beschreiben den Grad der Korrelation zwischen TFF3 und dem jeweiligen Protein.

3.1.3 TFF3-Spiegel in Seren

Um die Eignung von TFF3 als potenziellen systemischen Biomarker in der Endometriose zu überprüfen, wurde dessen Konzentration mittels ELISA im Serum von 118 Frauen mit und ohne Endometriose bestimmt. Dafür erfolgten pro Frau vier Blutabnahmen vor und vier Blutabnahmen nach Durchführung einer Laparoskopie mit der Entfernung möglicherweise vorhandener endometriotischer Läsionen. Die vier Blutabnahmen erfolgten jeweils innerhalb eines Menstruationszyklus am ersten und neunten Tag sowie am dritten und elften Tag nach der Ovulation (definiert durch den LH-Peak). Die Laparoskopie selbst erfolgte im zweiten Zyklus während der proliferativen Phase.

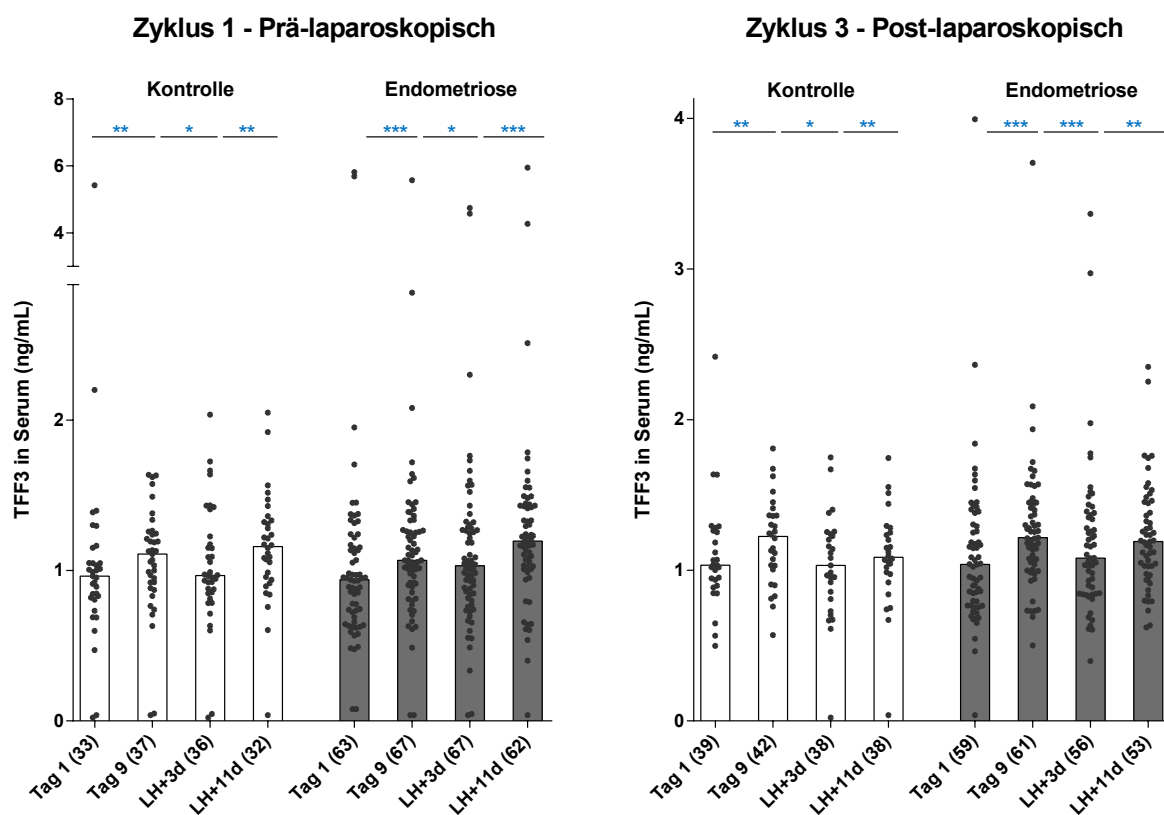


Abbildung 3.5: TFF3-Konzentrationen vor und nach Laparoskopie (Zyklus 1 bzw. 3) im Serum von Frauen mit und ohne Endometriose. Dargestellt sind jeweils die Werte an vier verschiedenen Zeitpunkten des jeweiligen Menstruationszyklus: Tag 1, Tag 9, LH+3d, LH+11d. Die Zahl in Klammern steht für die Anzahl der Blutproben pro Zeitpunkt. LH: LH-Peak (Ovulation).

Darstellung: Median als Balkendiagramm mit den Einzelwerten als Punkte. Statistik: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abbildung 3.5 zeigt die TFF3-Spiegel in Frauen ohne und mit Endometriose und zu den vier Zeitpunkten der Blutabnahmen während eines Menstruationszyklus vor und nach Laparoskopie. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die TFF3-Konzentrationen in Frauen mit und ohne Endometriose nicht unterschieden. Ebenso wenig gab es einen Unterschied zwischen den

TFF3-Spiegeln vor und nach Laparoskopie. Auffällig ist aber die Variation der Mediane zwischen den aufeinanderfolgenden, untersuchten Zyklustagen in allen Frauen sowohl vor als auch nach Laparoskopie. Zur statistischen Analyse dieses Phänomens wurde ein paarweiser Vergleich aufeinanderfolgender Zeitpunkte mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests durchgeführt. Wie durch die Sternchen in Abbildung 3.5 dargestellt, wiesen alle Frauen, ob mit oder ohne Endometriose, zwischen den einzelnen Zeitpunkten signifikante Unterschiede der TFF3-Level im Serum auf. Dies wies, unabhängig vom Krankheitsstatus, auf eine zyklusabhängige Regulation der TFF3-Spiegel im Serum der Frauen hin. Die höchsten Werte wurden dabei zum einen in der proliferativen (Tag 9) und zum anderen in der späten sekretorischen Phase des Menstruationszyklus (LH+11d) gemessen, während niedrigere TFF3-Konzentrationen am ersten Tag der Menstruation (Tag 1) und wenige Tage nach Ovulation (LH+3d) zu messen waren.

Abbildung 3.6 zeigt zwei Frauen mit Endometriose (A und B), die im Zyklus 1 vor der Laparoskopie sehr stark erhöhte TFF3-Spiegel im Serum aufwiesen. Nach Entfernung der endometriotischen Läsionen fielen diese im Zyklus 3 deutlich ab, was durch die nun fehlenden Endometrioseherde als TFF3-Quelle bedingt sein könnte.

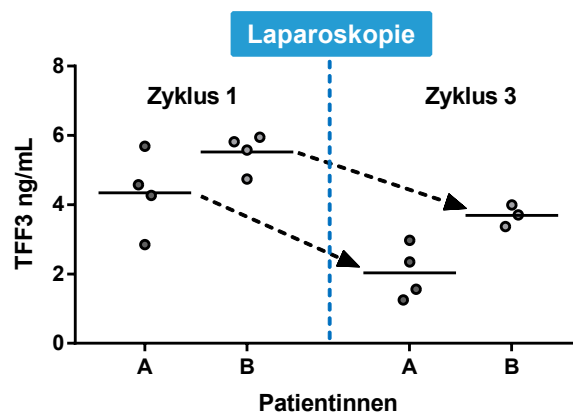


Abbildung 3.6: Abfall stark erhöhter TFF3-Spiegel im Serum nach Laparoskopie mit Entfernung endometriotischer Läsionen. Aufgetragen sind die jeweiligen Einzelwerte zweier Patientinnen mit Endometriose (A und B), welche im Zyklus 1 vor der Laparoskopie ungewöhnlich hohe TFF3-Werte aufwiesen. (Von Patientin B standen post-laparoskopisch im Zyklus 3 nur drei Blutproben zur Verfügung.)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TFF3 im Serum erkrankter Frauen nicht heraufreguliert war und daher keine Eignung als systemischer Biomarker für die Endometriose aufweist. Sowohl Frauen mit als auch ohne Endometriose wiesen insgesamt vergleichbare Serumspiegel an den untersuchten Zyklustagen auf. Dennoch zeigten zwei Frauen mit prä-laparoskopisch sehr hohen TFF3-Spiegeln einen deutlichen Abfall nach Laparoskopie. Zudem zeigte TFF3 eine zyklusabhängige Regulation im Serum während des Menstruationszyklus der untersuchten Frauen.

3.2 TFF3-Studien im Mausmodell für Endometriose

Wie im ersten Teil der Ergebnisse gezeigt werden konnte, war TFF3 in humanen endometriösen Läsionen exprimiert und in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose signifikant erhöht. Untersuchungen zu TFF3 im experimentellen Mausmodell für Endometriose werden im vorliegenden Abschnitt beschrieben.

3.2.1 Syngenes Transplantationsmodell

Die Endometrioseinduktion in Mäusen erfolgte mittels der Transplantation von Uterusfragmenten aus syngenen Spendermäusen an das Peritoneum. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente mit unterschiedlicher Dauer durchgeführt: **A**: 2 und 4 Wochen, **B**: 4 und 8 Wochen, **C**: 14 Wochen. In jedem Versuch wurde den Mäusen eine unterschiedliche Anzahl an Uterusfragmenten transplantiert, was der Simulation verschiedener Endometriose-Schweregrade diente. Als Kontrollgruppen kamen zum einen naive Tiere (C) zum Einsatz, die keinem operativen Eingriff unterzogen wurden, und zum anderen scheinoperierte Tiere (4S), denen statt Uterustransplantaten vier Suturen, also Fäden, gesetzt wurden.

3.2.1.1 Hormonstatus der Tiere anhand des Uterusgewichts

Endogenes Estrogen ist in der Lage über Aktivierung der Estrogenrezeptoren (vornehmlich $ER\alpha$), proliferative Effekte im Uterus auszulösen und somit Einfluss auf dessen Größe zu nehmen (56, 232). Da für die vorliegenden Versuche bewusst intakte und keine ovariectomierten Mäuse zum Einsatz kamen, wurde das Uterusgewicht im Nachhinein als eine Art Indikator für den Hormonstatus der Tiere herangezogen.

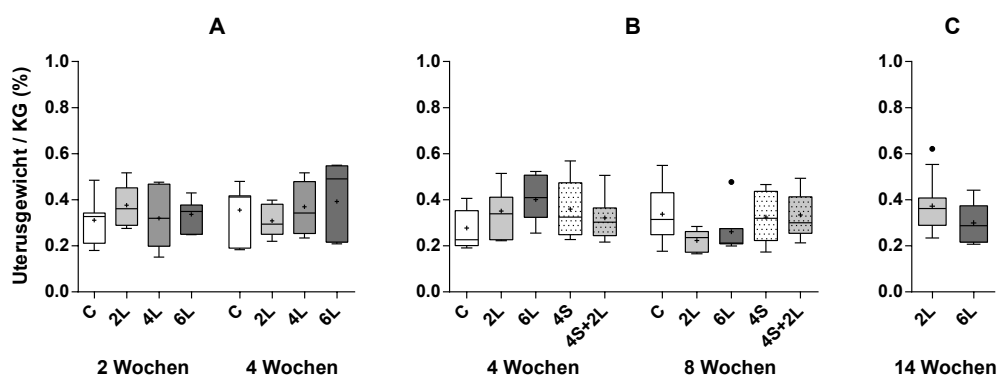


Abbildung 3.7: Uterusgewicht der Tiere zum Zeitpunkt der Sektion (Experiment A, B und C). Die mittleren Uterusgewichte lagen in einem physiologischen Bereich zwischen 0,2 und 0,4 % des Körpergewichts. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. *KG*: Körpergewicht; *C*: naive Kontrollgruppe; *L*: Läsionen; *S*: Suturen (Fäden)
Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Anzahl Tiere/Gruppe: Experiment A+B: $n = 7$; Experiment C: $n = 12$. Statistik: One Way ANOVA.

Die relativen Uterusgewichte der Versuchstiere sind in Abbildung 3.7 im Verhältnis zum Körpergewicht dargestellt. Sie lagen im Mittel in einem physiologischen Bereich zwischen 0,2 und 0,4 % des Körpergewichts, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellbar waren. Ein möglicher Einfluss auf die Entwicklung der Läsionen aufgrund eines unterschiedlichen endogenen Hormonstatus zwischen den Versuchsgruppen konnte somit vernachlässigt werden.

3.2.1.2 Wachstum und Entwicklung der Läsionen über die Zeit

Um die Entwicklung der aus den transplantierten Uterusfragmenten entstandenen Läsionen an den verschiedenen Zeitpunkten der Sektionen beurteilen zu können, wurden Größe, Gewicht und Erscheinungsbild aller Läsionen in den Tieren dokumentiert. Abbildung 3.8 zeigt die Läsionsgrößen und -gewichte mit anhaltender Versuchsdauer in den jeweiligen Versuchen A, B und C. Aufgetragen wurde der Mittelwert aller Läsionen eines Tieres. Fehlende Läsionen, aufgrund nicht angewachsener Transplantate, wurden mit Null berechnet.

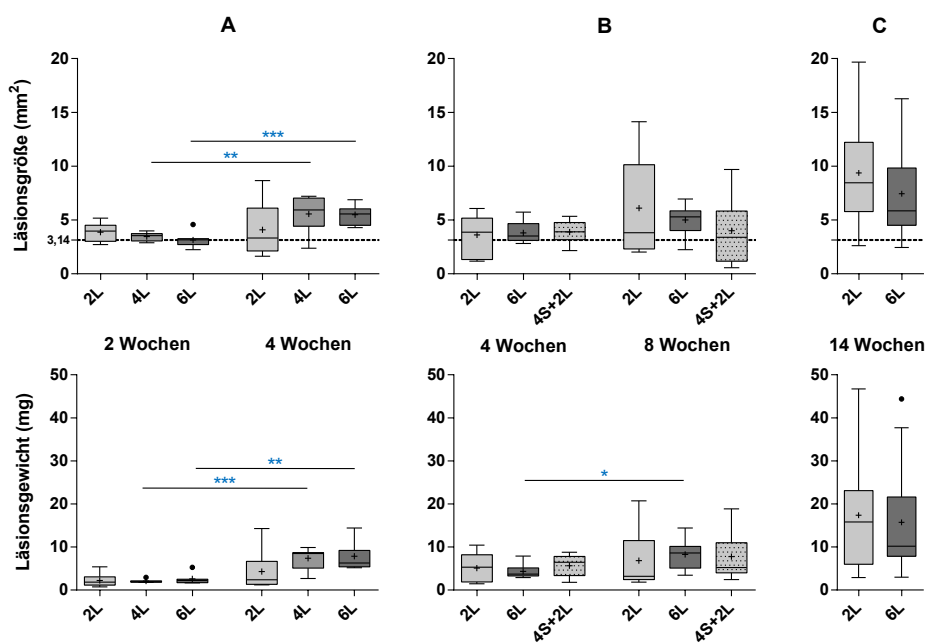


Abbildung 3.8: Läsionsgröße (oben) und Läsionsgewicht (unten) zu den Zeitpunkten der Sektion (Experiment A, B und C). Sowohl Größe als auch Gewicht der Läsionen nahmen mit der Versuchsdauer zu. Die gepunktete Linie (obere Grafik) symbolisiert die Ursprungsgröße transplantierte Uterusfragmente (3,14 mm²) am Tag der Transplantation. KG: Körpergewicht; C: naive Kontrollgruppe; L: Läsionen; S: Suturen (Fäden). Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Anzahl Tiere/Gruppe: Experiment A+B: n = 7; Experiment C: n = 12. Statistik: zweiseitiger t-Test, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

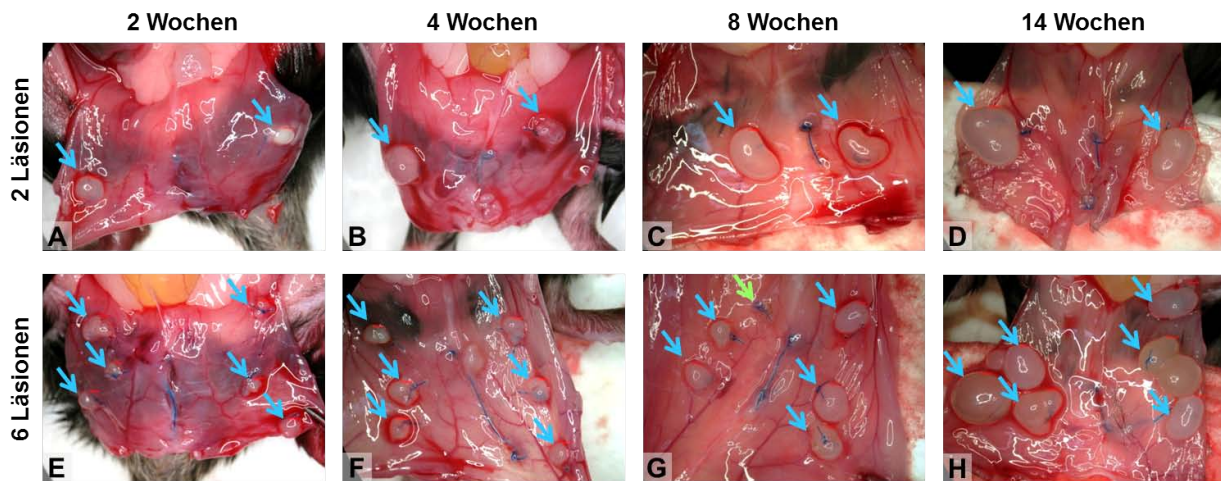


Abbildung 3.9: Aufnahmen endometriotischer Läsionen an den jeweiligen Sektionszeitpunkten. Gezeigt sind exemplarisch die Läsionen von Tieren mit 2 bzw. 6 Läsionen (2L bzw. 6L) nach 2, 4, 8 und 14 Wochen. **Blaue Pfeile** zeigen ausgebildete Läsionen oder gesetzte Suturen. Medial ist die Naht der ursprünglichen Operationswunde zu sehen (blauer Faden). **A:** 2L Tier 2 Wochen nach Endometrioseinduktion. Links ben sich bereits eine flüssigkeitsgefüllte Zyste entwickelt und sichtbar neue Gefäße ausgebildet. Die rechte Läsion hat diese Wandlung, erkennbar durch die weiße Färbung, noch nicht durchgemacht. **B:** Unterschiedlich stark ausgebildete Läsionen nach 4 Wochen. **C:** Deutlich an Volumen zugenommene Läsionen nach 8 Wochen. **D:** Große sekretgefüllte Läsionen nach 14 Wochen. **E:** Läsionen in 6L Tier 2 Wochen nach Transplantation. Alle Transplantate weisen bereits zystenartige Veränderungen auf. **F:** Tier nach 4 Wochen mit gleichmäßig an Größe zugenommenen Läsionen. **G:** Unterschiedlich stark entwickelte Läsionen nach 8 Wochen. **Grüner Pfeil** weist auf eine fehlende, nicht angewachsene Läsion hin; nur der Faden ist zu erkennen. **H:** Sehr große flüssigkeitsgefüllte Läsionen nach 14 Wochen. Vermutlich führte bei der mittleren Läsion auf der rechten Seite der gesetzte Knoten zur Ausbildung einer Art Doppelzyste.

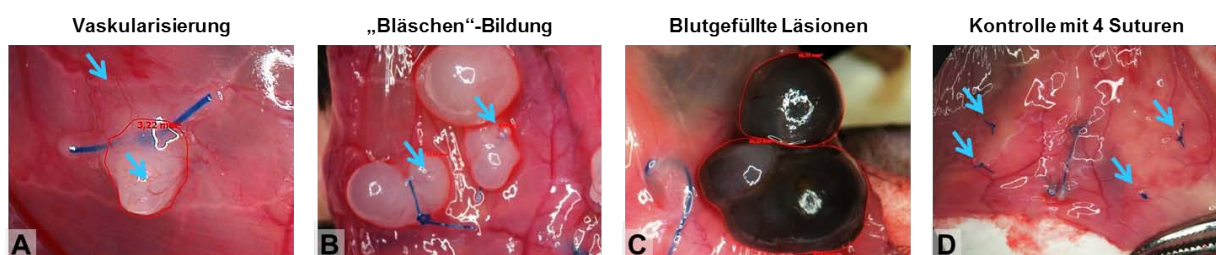


Abbildung 3.10: Morphologische Besonderheiten. **A:** Endometriotische Läsion nach 2 Wochen. Deutlich erkennbar sind die neu ausgebildeten Gefäße in der Läsion sowie im sie umgebenden Peritoneum. **B:** Nach 14 Wochen war auf einigen der Läsionen in Form von „Bläschen“-Bildung die Entwicklung weiterer Drüsen zu erkennen, die . **C:** Ein Tier wies nach 14 Wochen 2 blutgefüllte Läsionen auf, ähnlich den „Schokoladenzysten“ in der Frau. **D:** Exemplarisch ein scheinoperiertes Tier (4S) am Tag der Sektion. Zu sehen sind anstatt der Läsionen die in Form von Knoten am Peritoneum befestigten Suturen.

Zwei Wochen nach Transplantation der Uterusfragmente waren die Läsionen bereits gut angewachsen und eine Vielzahl neuer Gefäßen auf der Läsion sowie auf dem umgebenden Peritoneum zu erkennen (siehe Abbildung 3.10 A). Die meisten Läsionen hatten sich bereits in sekretgefüllte Zysten umgewandelt, was eine typische Beobachtung in Nagermodellen ist (46, 68, 156). Histologisch waren sie durch eine dilatierte Endometriumsdrüse mit umgebenden Stromazellen charakterisiert. Im Zeitraum bis zu 14 Wochen nahmen die Zysten stets weiter an Volumen zu. Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch Fotos der Läsionen jeweils eines Tieres der Gruppen 2L bzw. 6L an den einzelnen Sektionszeitpunkten. Nach 14 Wochen hatten sich an einigen Läsionen neben ihrer eigentlich ellipsoiden Form Ausstülpungen in Form kleiner Bläschen ausgebildet (siehe Abbildung 3.10 B). Dies war auf weitere sich dilatierende Drüsen in der Läsion zurückzuführen, die ebenfalls begannen sich mit Sekret zu füllen und daher morphologisch von der Hauptzyste unterschieden werden konnten. In einem Tier waren zwei der Läsionen mit Blut gefüllt, was zu einer tiefschwarzen Färbung führte und an die sogenannten „Schokoladenzysten“ in der Frau erinnerte. Schokoladenzysten bilden sich normalerweise durch die zyklusabhängige Veränderung des Endometriums mit einhergehender Menstruationsblutung aus. Da die Maus jedoch keinen klassischen Menstruationszyklus aufweist, ist davon auszugehen, dass während der Transplantation ein Gefäß getroffen wurde, was möglicherweise zu der Einblutung in die Zysten führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Uterustransplantate gut am Peritoneum der Tiere anwachsen und bereits nach 2 Wochen durch Ausbildung neuer Blutgefäße vollständig vom Organismus der Maus versorgt wurden. Die zystenartigen Läsionen nahmen über den gesamten Zeitraum signifikant an Größe und Gewicht zu. Nach 14 Wochen hatte sich das durchschnittliche Volumen der Läsionen in den Tieren im Vergleich zum Zeitpunkt nach 2 Wochen in etwa vervierfacht. Insgesamt kann von einer geeigneten Simulation früher pathologischer Vorgänge bei der Endometriose ausgegangen werden, die demnach eine Untersuchung von TFF3 bei der Entstehung endometriotischer Läsionen am Peritoneum erlaubt.

3.2.2 Milzgewicht als Indikator für systemische Inflammation

Die Milz ist ein lymphatisches Organ und erfüllt wichtige Aufgaben im Immunsystem. Ihre Vergrößerung kann als Marker für das Vorhandensein einer Inflammation im Organismus herangezogen werden (195). Das in Abbildung 3.11 aufgetragene relative Milzgewicht aus den durchgeführten Experimenten konnte somit Hinweise auf das systemische Entzündungsgeschehen in den einzelnen Versuchsgruppen liefern.

Tiere mit transplantierten Uterusfragmenten wiesen im Vergleich zu den Kontrollen ein deutlich größeres Milzgewicht auf, welches nach 4 Wochen in Tieren mit 6 Läsionen (6L) statistisch signifikant erhöht war. Deutlich wurde dies vor allem in Experiment B: Tiere die einer Scheinoperation mit dem Setzen von Suturen unterzogen wurden (4S), ohne Transplantation von

Uterusfragmenten, hatten ein vergleichbar niedriges Milzgewicht wie die naive Kontrollgruppe (C), welche keinem operativen Eingriff unterzogen wurde. In allen weiteren Versuchsgruppen, in denen uterines Gewebe transplantiert wurde, schien das erhöhte Milzgewicht eine systemische Inflammation anzuzeigen. Dieser Effekt war nur zu frühen Zeitpunkten, 2 und 4 Wochen nach Transplantation, zu beobachten. In dieser Zeit war die Aktivität der Läsionen durch Anwachsen an das Peritoneum und Ausbildung neuer Blutgefäße am größten. Nach 8 und 14 Wochen hatten die Milzen aller Versuchsgruppen wieder das Gewicht der Kontrollgruppe angenommen, demnach war kein erhöhter systemischer Inflammationsstatus mehr in den Tieren erkennbar.

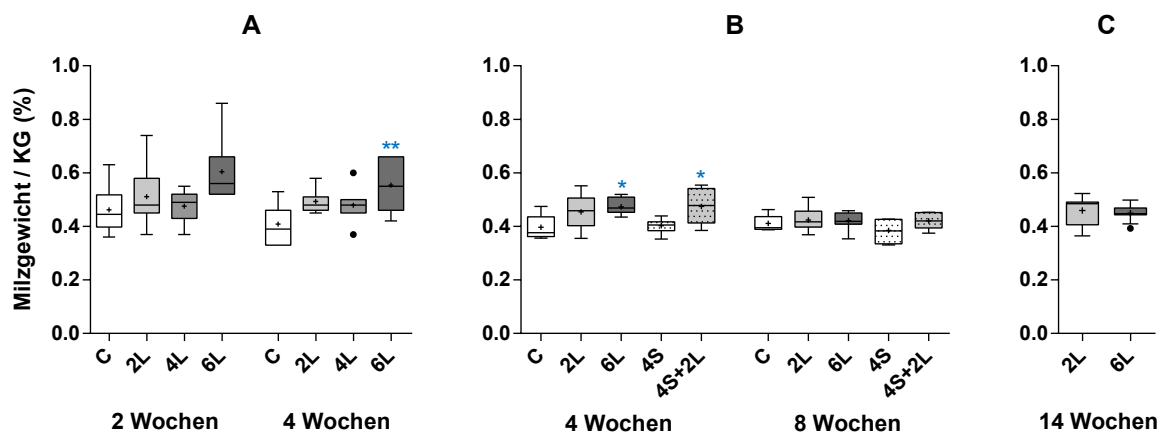


Abbildung 3.11: Milzgewicht an den Zeitpunkten der Sektion (Experiment A, B und C). Das Milzgewicht in Tieren mit Läsionen war nach 2 und 4 Wochen erhöht im Vergleich zur naiven und zur scheinoperierten Kontrolle. Tiere mit 6 Läsionen wiesen signifikant erhöhte Werte nach 4 Wochen auf. Nach 8 und nach 14 Wochen normalisierte sich das Milzgewicht in allen betroffenen Gruppen zurück auf das Kontrollniveau. KG: Körpergewicht; C: naive Kontrollgruppe; L: Läsionen; S: Suturen (Fäden). Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Anzahl Tiere/Gruppe: Experiment A+B: $n = 7$; Experiment C: $n = 12$. Statistik: One Way-ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tiere mit induzierter Endometriose nach 4 Wochen ein erhöhtes Milzgewicht aufwiesen, was gleichbedeutend mit einer verstärkten systemischen Inflammation in den Tieren war.

3.2.3 Akute-Phase-Proteine in Seren

Die durch das erhöhte Milzgewicht ange deutete systemische Inflammation in den Tieren, sollte durch die Analyse systemischer Akute-Phase-Proteine weiter untersucht werden. Dafür wurden in Experiment B Blutproben 2, 4, 6 und 8 Wochen nach Transplantation der Uterusfragmente gesammelt und die Konzentration Akuter-Phase-Proteine im Serum bestimmt.

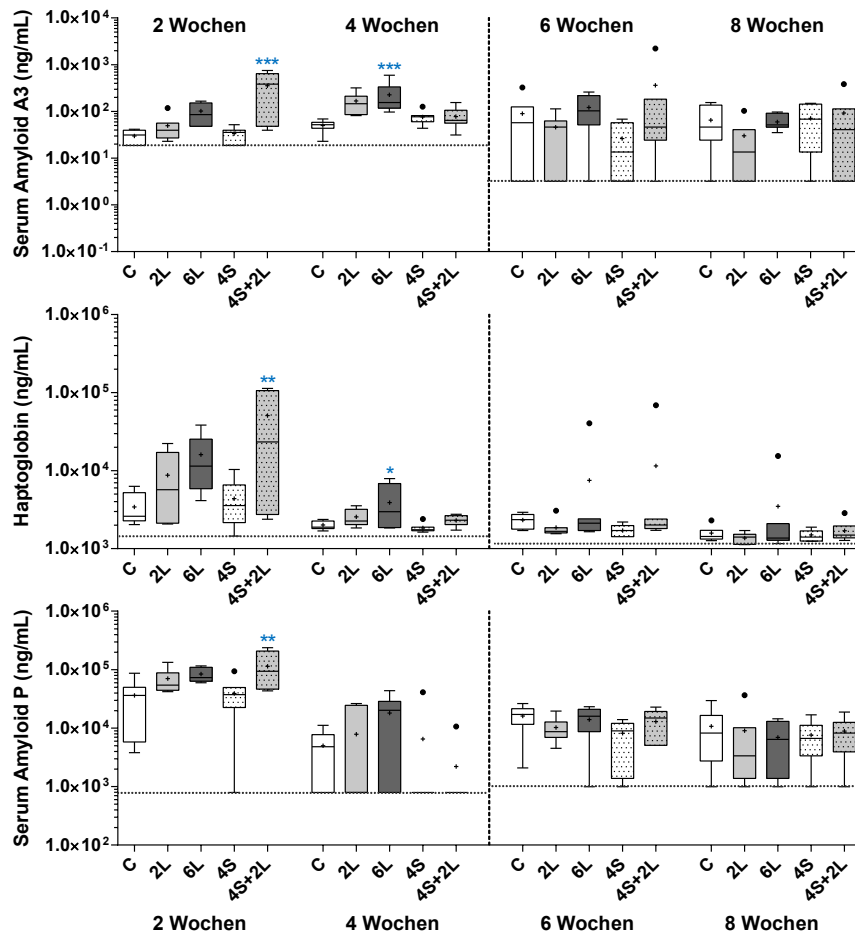


Abbildung 3.12: Akute-Phase-Proteine SAA-3, Haptoglobin und SAP im Serum. Nach 2 und 4 Wochen wiesen Tiere mit transplantierten Uterusfragmenten zum Teil signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. C: naive Kontrollgruppe; L: Läsionen; S: Suturen (Fäden). Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Anzahl Tiere/Gruppe: $n = 7$. Statistik: One Way-ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Für die Zeitpunkte 2 und 4 Wochen wurden Serum Amyloid A3 (SAA-3), Haptoglobin, Serum Amyloid P (SAP), C-reaktives Protein (CRP), $\alpha 2$ -Makroglobulin, Adipsin, Lipocalin, Saures Glykoprotein und Pentraxin mittels Luminex® Multiplexanalyse vermessen (Abbildungen 3.12 und 3.13). Die drei Proteine SAA-3, Haptoglobin und SAP fielen durch signifikante Hochregulation nach 2 und 4 Wochen in Tieren mit endometriotischen Läsionen auf (6L, 4S+2L) und wurden daher zusätzlich für die Zeitpunkte 6 und 8 Wochen bestimmt (Abbildung 3.12). Zu

diesen späteren Zeitpunkten nach Endometrioseinduktion konnte keine Erhöhung der Proteine mehr beobachtet werden. Insgesamt wurden die höchsten Level nach 2 Wochen in der Gruppe 4S+2L gemessen. Nach 4 Wochen zeigten sich dann nur noch die SAA-3- und Haptoglobin-Level der Gruppe 6L signifikant erhöht.

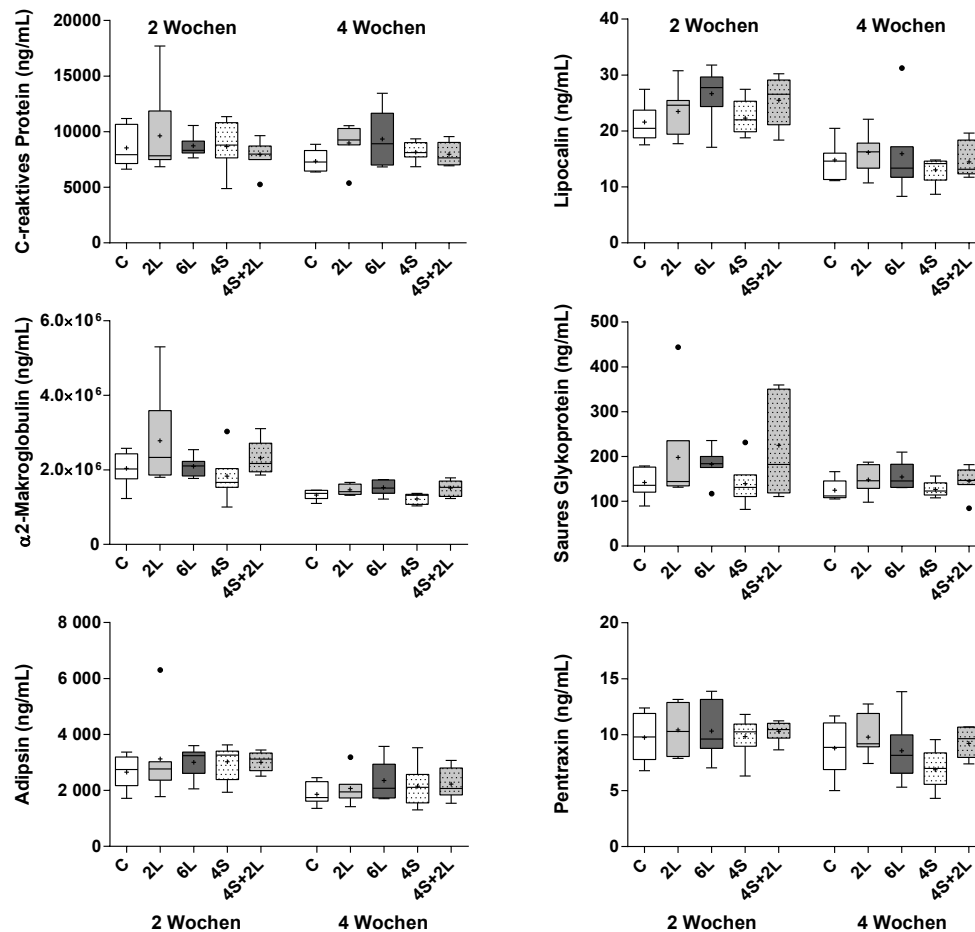


Abbildung 3.13: Nicht signifikant erhöhte Akute-Phase-Proteine im Serum. Experimentelle Endometriose führte zu keiner signifikanten Veränderungen der Konzentrationen von CRP, α2-Makroglobulin, Adipsin, Lipocalin, Saures Glykoprotein und Pentraxin. C: naive Kontrollgruppe; L: Läsionen; S: Suturen (Fäden). Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Anzahl Tiere/Gruppe: $n = 7$. Statistik: One Way ANOVA.

Ähnlich wie das vergrößerte Milzgewicht bereits vermuten ließ, wiesen erhöhte Konzentrationen von SAA-3, Haptoglobin und SAP nach 2 und 4 Wochen auf eine systemische Inflammation in Tieren der Gruppe 6L und 4S+2L hin. Tiere mit 2L erreichten keine statistische Signifikanz, wiesen aber dennoch ebenso erhöhte Werte im Vergleich zur naiven (C) sowie zur scheinoperierten Kontrollgruppe (4S) auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion von Endometriose durch Transplantation von uterinem Gewebe in das Abdomen der Mäuse zu einer signifikanten Erhöhung der Akute-Phase-Proteine SAA-3, Haptoglobin und SAP nach 2 und 4 Wochen führte.

3.2.4 TFF3-Konzentrationen in Peritoneallavagen

Nachdem bereits eine signifikante Erhöhung von TFF3 in Peritonealfüssigkeiten von Frauen mit Endometriose gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.1.2.1 auf Seite 49), war die Bestimmung der TFF3-Konzentration in den Peritoneallavagen im Mausmodell von besonderem Interesse.

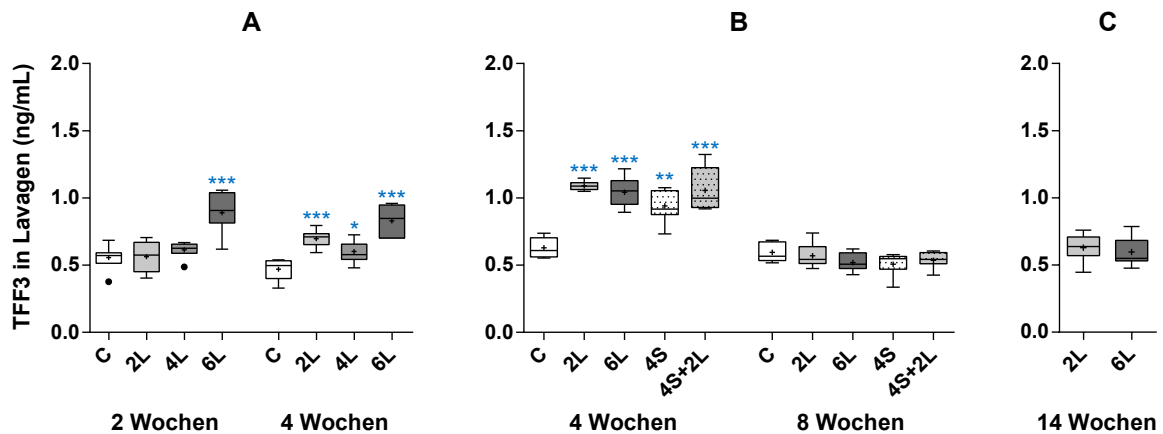


Abbildung 3.14: TFF3-Konzentrationen in Peritoneallavagen zum Zeitpunkt der Sektion (Experiment A, B und C). TFF3 war nach 4 Wochen in allen Tieren mit Läsionen signifikant erhöht im Vergleich zur naiven und zur scheinoperierten Kontrolle. Tiere mit 6 Läsionen hatten bereits nach 2 Wochen signifikant erhöhte TFF3-Werte. C: naive Kontrollgruppe; L: Läsionen; S: Suturen (Fäden). Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Anzahl Tiere/Gruppe: Experiment A+B: $n = 7$; Experiment C: $n = 12$. Statistik: One Way ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die TFF3-Messung in den während der Sektion gewonnenen und anschließend aufkonzentrierten Peritoneallavagen erfolgte mittels ELISA. Die Induktion von Endometriose führte in den betreffenden Tieren nach 4 Wochen zu maximalen Werten von 1,323 ng/mL TFF3 (Abbildung 3.14). Bereits nach 2 Wochen stiegen die lokalen TFF3-Level in der Gruppe mit der maximalen Anzahl an 6 Läsionen hochsignifikant an (6L), während Tiere mit 2 oder 4 Läsionen nur eine sehr geringe Veränderung nach oben zeigten (2L, 4L). Nach 4 Wochen wiesen dann alle Gruppen in Experiment A und B, in denen Endometriose induziert wurde, signifikant erhöhte TFF3-Werte (2L, 4L, 6L, 4S+2L) auf. Die naive Kontrollgruppe (C), die keinem operativen Eingriff unterzogen wurde, hatte zu allen Zeitpunkten eine gleichbleibend niedrige TFF3-Konzentration ($n = 28$: 0,566 ng/mL \pm 0,094 ng/mL). Hingegen zeigte die scheinoperierte Kontrollgruppe aus Experiment B, welcher 4 Suturen gesetzt aber kein uterines Gewebe transplantiert wurde, nach 4 Wochen ebenso signifikant erhöhte TFF3-Spiegel in den Lavagen ($n = 7$: 0,941 ng/mL \pm 0,126 ng/mL). Nach 8 und nach 14 Wochen fielen die erhöhten TFF3 Level in allen Tieren auf das Ausgangsniveau der naiven Kontrollgruppe zurück.

Die erhöhten TFF3-Spiegel in den Experimenten A und B korrelierten hochsignifikant mit dem jeweiligen Milzgewicht der Tiere (siehe Abbildung 3.15). Gemeinsam mit den erhöhten Serum-Spiegeln von Akute-Phase-Proteinen zu frühen Zeitpunkten lassen diese Ergebnisse eine Beteiligung an frühen inflammatorischen und immunologischen Prozessen vermuten, die das Anwachsen, die Neoangiogenese und somit die Invasion der Transplantate in das Peritoneum vorantreiben.

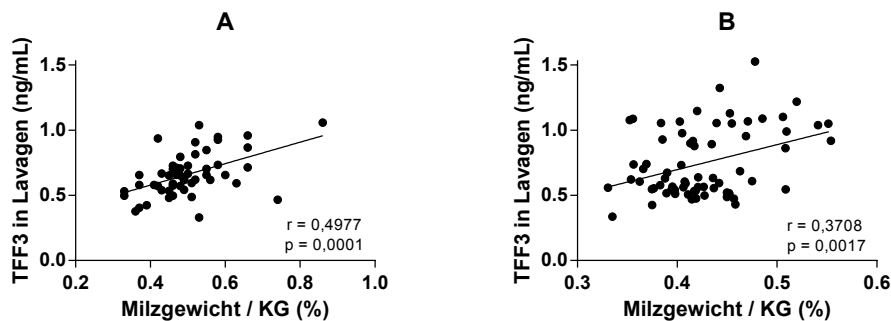


Abbildung 3.15: Korrelation von TFF3 in Peritoneallavagen mit den Milzgewichten der Tiere. Dargestellt sind die Versuche A und B. Aufgetragen sind jeweils alle Gruppen zu beiden Zeitpunkten (A: $n = 56$; B: $n = 70$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TFF3 in Peritoneallavagen von Tieren mit induzierter Endometriose zu frühen Zeitpunkten (nach 2 und 4 Wochen) signifikant erhöht war. Da auch scheinoperierte Mäuse erhöhte Konzentrationen aufwiesen, wurde TFF3 offenbar auch durch die eigentliche Verletzung des Peritoneums vermehrt sezerniert, was vermutlich auf seine Beteiligung an der Wundheilung zurückzuführen ist. Dieser Effekt wurde aber durch das Vorhandensein endometriotischer Läsionen noch verstärkt, und führte somit zu den höchsten TFF3-Werten in Tieren mit induzierter Endometriose. Die erhöhten TFF3-Level korrelierten zudem mit dem ebenso erhöhten Milzgewicht der Tiere.

3.2.5 TFF3-Konzentrationen in Seren

Da TFF3 in Peritonealfüssigkeiten erkrankter Frauen sowie in Mäusen mit induzierter Endometriose signifikant erhöht war, sollten auch im Mausmodell die TFF3-Spiegel im Serum überprüft werden. Dafür wurde mittels ELISA die TFF3-Konzentration im Serum ausgewählter Gruppen von Experiment B bestimmt.

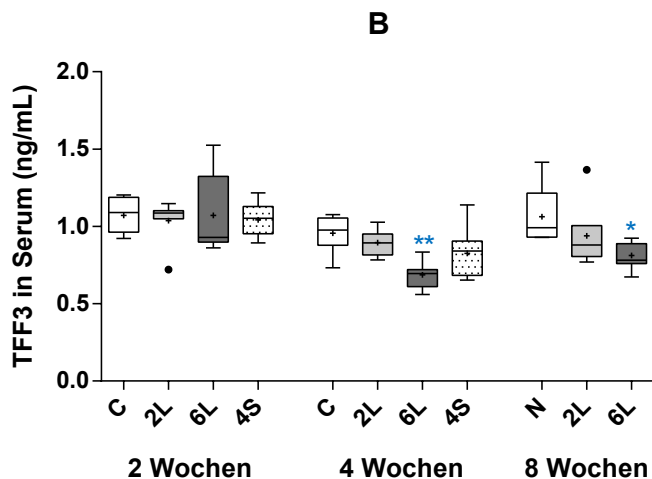


Abbildung 3.16: TFF3-Konzentrationen in Seren ausgewählter Gruppen aus Experiment B. Tiere mit 6 Läsionen wiesen nach 4 und 8 Wochen signifikant erniedrigte TFF3-Spiegel im Serum auf. C: naive Kontrollgruppe, L: Läsionen, S: Suturen (Fäden). Darstellung: Tukey Box Plot mit Median (Querstrich) und Mittelwert (+). Anzahl Tiere/Gruppe: $n = 7$. Statistik: One Way ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

In Abbildung 3.16 ist zu sehen, dass die experimentelle Endometriose keine Erhöhung der TFF3-Konzentration im Serum nach sich zog. Dies deckte sich mit den im Abschnitt 3.1.3 auf Seite 53 dargestellten Serumwerten von Frauen mit Endometriose. Auch in Patientinnen konnten keine systemisch erhöhten TFF3-Spiegel durch Endometriose beobachtet werden.

Die Daten im Mausmodell zeigten, dass die Induktion von Endometriose in Tieren mit 6 Läsionen zu einer signifikanten Erniedrigung von TFF3-Leveln im Serum nach 4 und 8 Wochen führte. Dieser Trend war, wenn auch nicht immer signifikant, in allen Tieren mit Läsionen zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass experimentelle Endometriose zu einer Erniedrigung der TFF3-Serumspiegel führte. Dieser Effekt nahm mit der Menge an transplantierten Uterusfragmenten zu.

3.2.6 TFF3-Expression in Läsionen und Uteri

Nachdem TFF3 durch Endometrioseinduktion in Peritoneallavagen betreffender Mäuse signifikant erhöht war, sollte im nächsten Schritt die Expression von TFF3 mittels immunhistochemischer Färbung in endometrialem Gewebe der Tiere überprüft werden.

Abbildung 3.17 zeigt die TFF3-Expression exemplarisch in einer endometriotischen Läsion und einem Uterus einer Maus 14 Wochen nach Transplantation der Uterusfragmente. Lokalisiert war TFF3 wie bereits in humanen Endometrioseherden in glandulären und luminalen Epithelzellen. Auch im Stroma des eutopen und ektopen Endometriums zeigten sich vereinzelte Zellen positiv gefärbt. TFF3 war in den Läsionen unabhängig vom Zeitpunkt der Sektion exprimiert. Auch zu späten Zeitpunkten, an denen die TFF3-Spiegel in Peritoneallavagen bereits zurückgegangen waren, wurde TFF3 in den Läsionen exprimiert. Dies könnte auf eine gewisse „Verkapselung“ der Läsionen hindeuten. TFF3 war jedoch nicht in allen Läsionen gleich stark vorhanden. Auch hier war keine Abhängigkeit zum Zeitpunkt nach Transplantation ersichtlich.

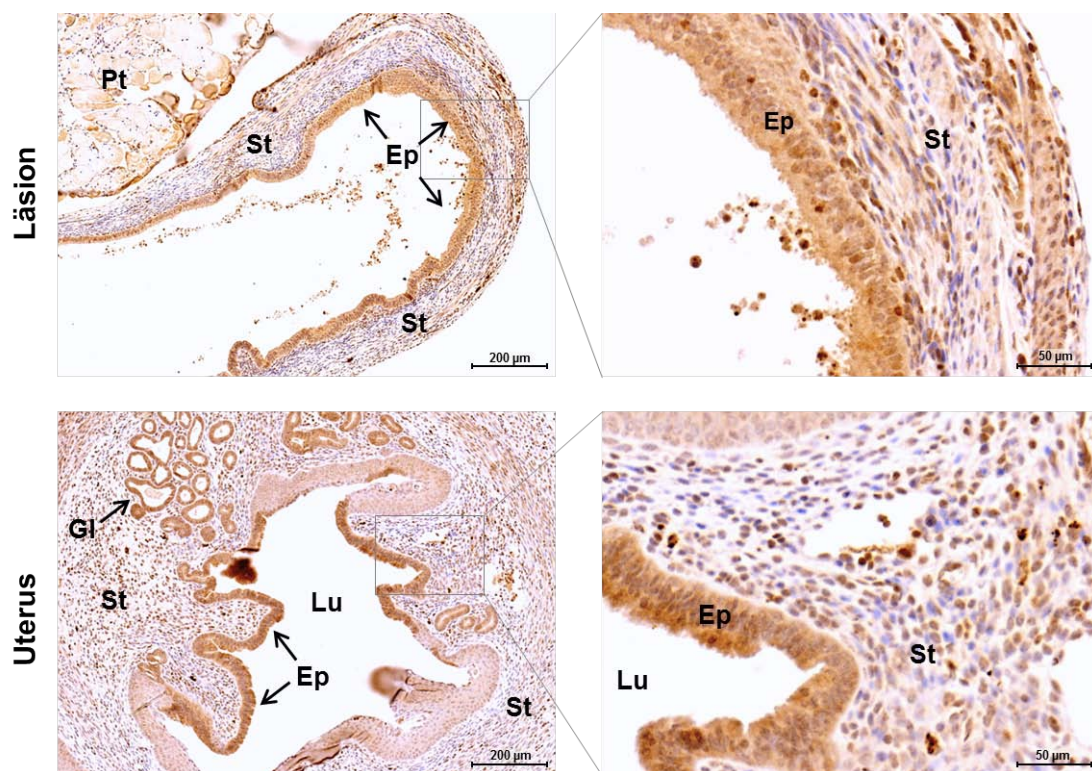


Abbildung 3.17: Immunhistochemische Lokalisation von TFF3 in murinen Läsionen und Uteri. Dargestellt ist die TFF3-Expression exemplarisch in einer Läsion sowie im Uterus (14 Wochen nach Transplantation). TFF3 konnte sowohl im glandulären als auch im luminalen Epithel von Läsionen und Uteri dargestellt werden. Im Lumen der ektopten Drüsen sind Ansammlungen von Lymphozyten und roten Blutkörperchen zu sehen, die bei der Immunhistochemie zu einer unspezifischen Braunfärbung führen. *Pt*: Peritoneum; *St*: Stromazellen; *Ep*: Epithelzellen; *Gl*: glanduläres Epithel; *Lu*: Lumen.

Die Färbung erfolgte auf Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten humanen Schnittpräparaten (4 µm). Als farbgebendes Substrat kam DAB zum Einsatz.

3.3 TFF3-Studien im endometrialen Zellkulturmodell

3.3.1 TFF3-Regulation durch Stimulation mit 17β -Estradiol und $TNF\alpha$

In nur zwei Publikation wurde bisher die Regulation von TFF3 durch 17β -Estradiol (E2) in einem Zellkulturmodell untersucht und beschrieben (11, 141). Im Zusammenhang mit Endometriose wäre ein solcher E2-Effekt auf die TFF3-Expression von Bedeutung. Wie bereits erläutert, handelt es sich um eine estrogenabhängige Erkrankung, in der die Aktivität der Endometrioseherde durch lokale Estrogenlevel gesteuert wird.

Nach $TNF\alpha$ -Stimulation wurde in verschiedenen Darmkrebszelllinien eine Herunterregulation von TFF3 beschrieben. $TNF\alpha$ ist bei Endometriose stark heraufreguliert, somit ist auch sein möglicher Effekt auf die TFF3-Expression von Bedeutung.

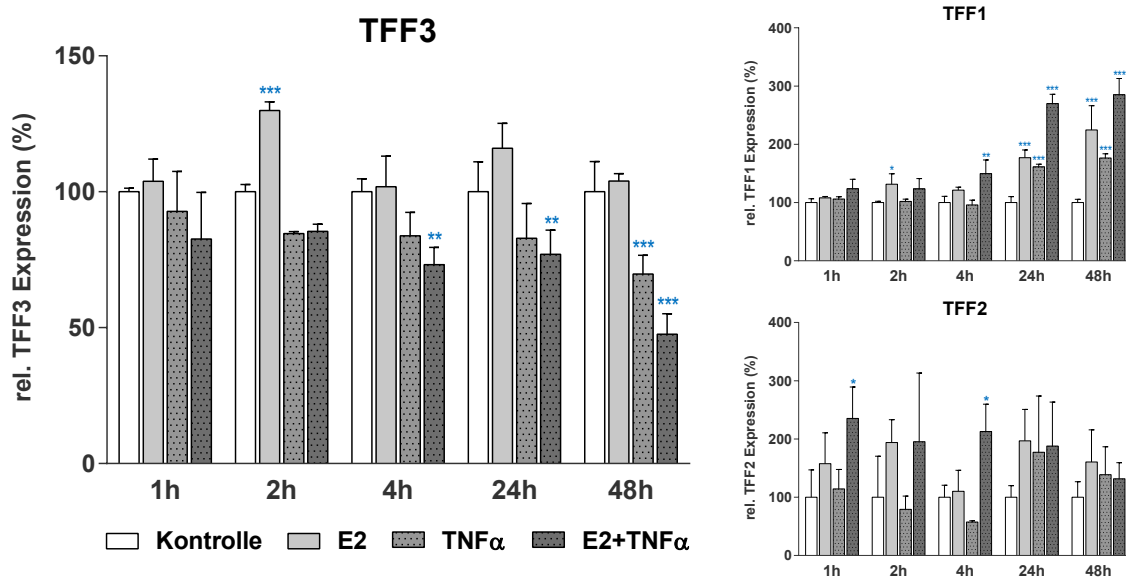


Abbildung 3.18: Relative Genexpression der Trefoilpeptide nach Stimulation mit 17β -Estradiol (E2) (10 nM), $TNF\alpha$ (10 ng/mL) in ECC-1-Zellen. Die Stimulation erfolgte in serumfreiem Medium, nachdem die Zellen zuvor für 48 h in Hungermedium (1 % CCS) inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Expression des jeweiligen Gens normiert auf HPRT1 als endogenem Referenzgen ($\cong 100\%$). Replikate: $n = 3$. Statistik: Two Way ANOVA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ECC-1-Zellen mit 10 nM E2, mit 10 ng/mL $TNF\alpha$ und mit einer Kombination beider Stimulanzen behandelt. Um die Zellen für E2 zu sensibilisieren, wurden sie zwei Tage vor Versuchsbeginn in Hungermedium (1 % *Charcoal Stripped Serum*) kultiviert. Die Stimulation erfolgte in serumfreiem Medium mit unterschiedlichen Inkubationsdauern: 1 h, 2 h, 4 h, 24 h und 48 h.

Abbildung 3.18 zeigt die Expression der Trefoilpeptide in den stimulierten Zellen. Nach bereits 2-stündiger Inkubation mit E2 wurde TFF3 signifikant heraufreguliert. Nach 4 h erreichte die

Expression wieder annähernd Kontrollniveau, um nach 24 h erneut leicht, aber nicht signifikant anzusteigen. Nach 48 h war die Expression zurück auf Kontrollniveau. Die TNF α -Stimulation führte ab 1 h zu einer kontinuierlichen Herunterregulation der TFF3-Expression und erreichte nach 48 h einen hoch signifikanten Tiefpunkt. Bei der TFF3-Expression nach gemeinsamer Stimulation von E2 und TNF α fiel auf, dass der eigentlich heraufregulierende E2-Effekt gänzlich unterdrückt wurde und nur der herunterregulierende TNF α -Effekt signifikant, bereits nach 4 h zum Tragen kam. Nach 48 h war die TFF3-Expression durch die Kostimulation sogar stärker erniedrigt als bei alleiniger TNF α -Behandlung.

TFF1 wurde sowohl durch E2 als auch durch TNF α ab 24 h Inkubation signifikant heraufreguliert. Die kombinierte Gabe von E2 und TNF α führte zu einem additiven Effekt beider Stimulanzen. Die TFF2-Expression war in ECC-1-Zellen insgesamt nur sehr niedrig ausgeprägt. Aus diesem Grund kam es zu einer breiten Streuung der erhaltenen Werte an der Nachweisgrenze. Die gemeinsame Inkubation mit E2 und TNF α führte zu einer statistisch signifikanten, aber fraglichen, Heraufregulation von TFF2 nach 1 h und nach 4 h.

Zur Sicherung der gewonnenen Daten bezüglich der TFF3-Regulation durch E2, wurde ein Wiederholungsversuch mit alleiniger E2-Stimulation durchgeführt. Statt der üblichen Triplikate wurden diesmal neun Replikate bestimmt, um die Aussagekraft des Experiments zu erhöhen. Da E2-regulierte Gene dafür bekannt sind, innerhalb sehr kurzer Zeit auf E2-Stimulation zu reagieren, entfiel für das zweite Experiment die Inkubationsdauer von 48 h, dafür erfolgte ein zusätzlicher Zeitpunkt nach 40 min.

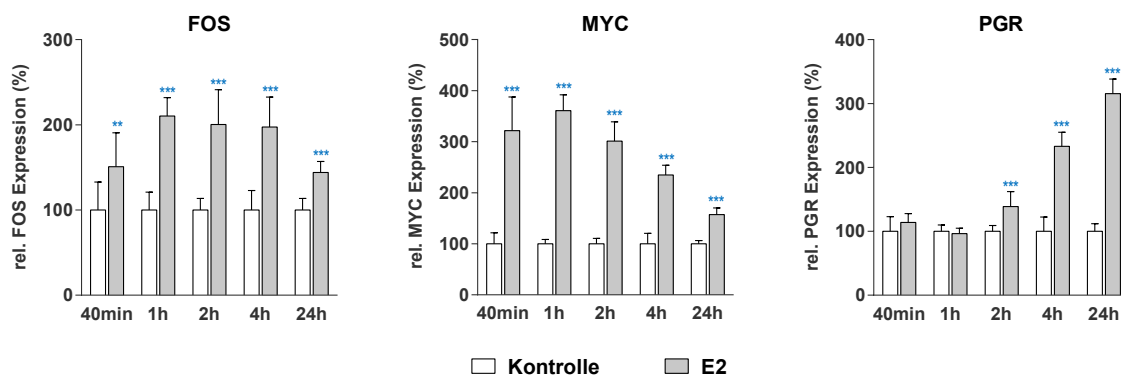


Abbildung 3.19: Expression estrogenresponsiver Gene durch E2-Stimulation (10 nM) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Stimulation erfolgte in serumfreiem Medium, nachdem die ECC-1-Zellen zuvor für 48 h in Hungermedium (1 % CCS) inkubiert wurden.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Expression des jeweiligen Gens normiert auf HPRT1 als endogenem Referenzgen (\cong 100 %). Replikate: $n = 9$. Statistik: multipler t-Test mit Berücksichtigung mehrerer Zeitpunkte nach der Holm-Sidak-Methode; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Um die Sensitivität der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ECC-1-Zellen sicherzustellen, wurde zunächst die Expression sogenannter estrogenresponsiver Gene bestimmt. FOS und MYC sind Gene, die mit einer *early response* (frühen Antwort) in Form von Überexpression auf

E2-Stimulation reagieren. Gemeinsam mit PGR (kodierendes Gen für den Progesteronrezeptor) wurden sie im vorliegenden Experiment genauer betrachtet. Abbildung 3.19 zeigt die Expression von FOS, MYC und PGR nach der E2-Stimulation. Alle drei Gene wurden signifikant heraufreguliert, wobei FOS und MYC besonders deutlich nach sehr frühen Zeitpunkten (40 min bis 4 h) exprimiert wurden. PGR stieg 2 h nach E2-Kontakt kontinuierlich an und hatte sich nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle bereits verdreifacht.

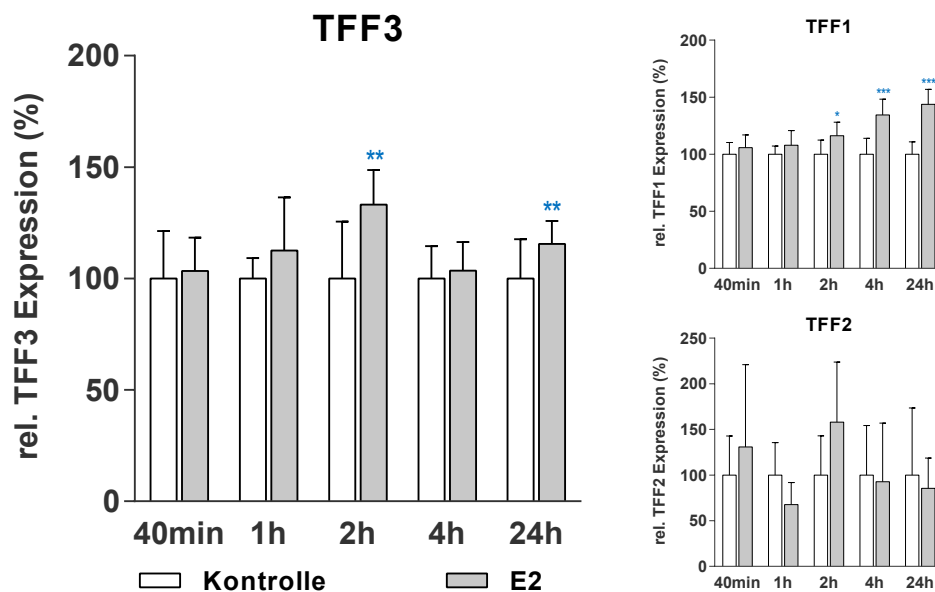


Abbildung 3.20: Expression der Trefoilpeptide durch E2-Stimulation (10 nM) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Stimulation erfolgte in serumfreiem Medium, nachdem die ECC-1-Zellen zuvor für 48 h in Hungermedium (1 % CCS) inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Expression des jeweiligen Gens normiert auf HPRT1 als endogenem Referenzgen ($\cong 100\%$). Replikate: $n = 9$. Statistik: multipler t-Test mit Berücksichtigung mehrerer Zeitpunkte nach der Holm-Sidak-Methode; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abbildung 3.20 zeigt die Expression aller Trefoilpeptide nach E2-Stimulation. Wie bereits im ersten Versuch (Abbildung 3.18 auf Seite 66), wurde TFF3 signifikant durch E2 nach 2 h und zusätzlich nach 24 h heraufreguliert. Auch TFF1 wurde wie zuvor durch E2 ab 2 h konstant heraufreguliert. Die TFF2-Expression war, wie bereits erwähnt, nahe der Nachweisgrenze, weshalb es insgesamt zu einer großen Streuung der normalisierten Werte kam. Bezüglich seiner E2-Stimulation ist daher keine Aussage zu treffen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in zwei unabhängigen Experimenten bereits nach 2 h eine signifikante Heraufregulation von TFF3 durch Anwesenheit von 17β -Estradiol in ECC-1-Zellen beobachtet werden konnte. Die Stimulation von $TNF\alpha$ führte nach 48 h zu einer signifikanten Herunterregulation von TFF3.

3.3.2 Stimulation mit rekombinantem TFF3

Zur Untersuchung der TFF3-Wirkung auf humane endometriale Zellen wurden Stimulationen mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem TFF3 und verschiedenen Inkubationsdauern (4 h, 24 h, 48 h) in ECC-1-Zellen durchgeführt. Dabei wurde die Wirkung auf die Expression verschiedener Gene sowie auf die Viabilität, Proliferation und Apoptose der Zellen analysiert.

3.3.2.1 Genexpression nach Stimulation mit TFF3 und Kostimulation mit $\text{TNF}\alpha$

Die Untersuchung von verändertem Expressionsverhalten ausgewählter Gene durch TFF3-Stimulation erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen. Im ersten Versuch wurden die Zellen mit 30 und 100 ng/mL TFF3 sowie mit 10 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Da sich keine signifikanten Effekte bei diesen niedrigen TFF3-Konzentrationen ergaben, wurde ein zweiter Versuch mit 100, 1.000 und 10.000 ng/mL TFF3 durchgeführt.

Um den Effekt von TFF3 auf eine durch $\text{TNF}\alpha$ induzierte Wirkung zu beobachten, wurde im Rahmen des ersten Versuchs auch eine Kostimulation von TFF3 mit $\text{TNF}\alpha$ durchgeführt. Diese ergab jedoch keinen Unterschied zu einer alleinigen $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung. Aufgrund des fehlenden Effekts wird in den folgenden Abbildungen nur die Expression nach alleiniger $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation neben denen der unterschiedlichen TFF3-Konzentrationen dargestellt.

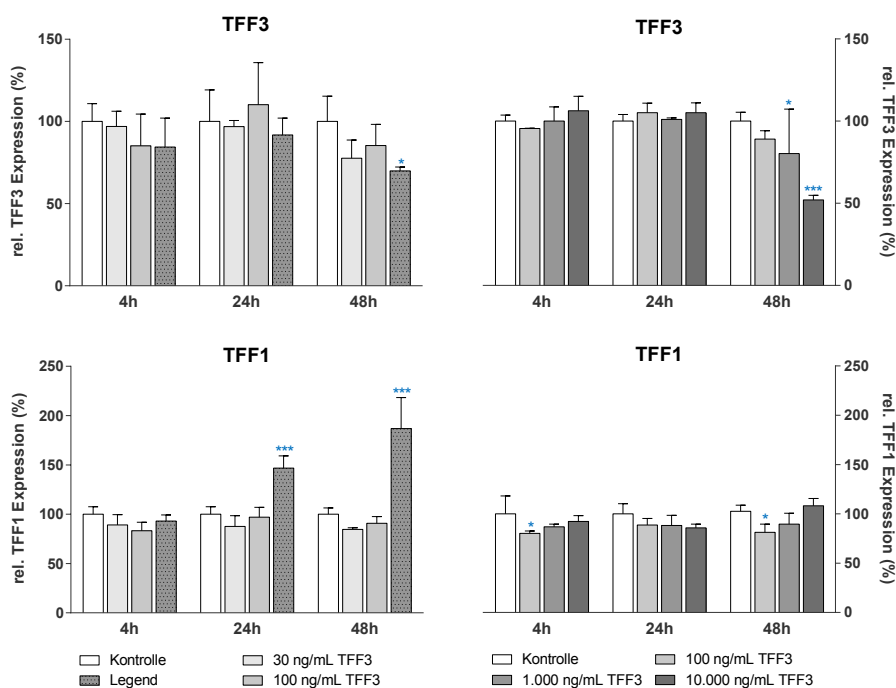


Abbildung 3.21: Genexpression von TFF3 und TFF1 nach Stimulation mit TFF3 sowie mit $\text{TNF}\alpha$.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Expression des jeweiligen Gens normiert auf HPRT1 als endogenem Referenzgen ($\cong 100\%$). Replikate: $n=3$. Statistik: Two Way ANOVA; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

In Abbildung 3.21 ist zu sehen, dass durch Stimulation mit TFF3 (1.000 und 10.000 ng/mL) nach 48 h in den ECC-1-Zellen die zelleigene Expression von TFF3 signifikant herunterreguliert war. Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ führte nach 48 h zu einer signifikanten Herunterregulation von TFF3.

Die TFF1-Expression in den Zellen blieb durch das von außen zugeführte TFF3 unbeeinflusst und zeigte keinerlei Veränderungen. Im Gegensatz zu TFF3 wurde TFF1 jedoch durch $\text{TNF}\alpha$ ab 24 h deutlich und kontinuierlich heraufreguliert. Nach 48 h zeigte sich die TFF1-Expression im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt.

Eine Eigenschaft von TFF3 ist es, im Rahmen der Wundheilung die Migration von Epithelzellen zu bewirken. Dafür ist eine Auflösung des Zell-Zell-Kontaktes Voraussetzung, welche durch Herunterregulation bestimmter Adhäsionsmoleküle gesteuert werden kann. Um dies im vorliegenden Modell zu untersuchen, wurde die Expression von α -, β - und γ -Catenin sowie von E-Cadherin und Adenomatous polyposis coli (APC) bestimmt. Abbildung 3.22 auf der nächsten Seite zeigt, dass TFF3-Stimulation keinen Einfluss auf die Expression von α -, β - und γ -Catenin hatte. $\text{TNF}\alpha$ hingegen führte zu einer Heraufregulation aller drei Catenine. γ -Catenin war nach 24 h, α - und β -Catenin waren nach 48 h signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Expression von E-Cadherin blieb von einer Stimulation durch TFF3 unbeeinflusst (Abbildung 3.22), wurde aber wie die der Catenine durch $\text{TNF}\alpha$ signifikant heraufreguliert (ab 24 h).

APC hingegen wurde ab einer Konzentration von 1.000 ng/mL TFF3 bereits nach 4 h und mit einer Konzentration von 100 ng/mL nach 48 h signifikant herunterreguliert.

Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ führte ähnlich wie bei den Cateninen zu einer signifikanten Überexpression von APC (nach 48 h).

Im Rahmen des ersten Experiments, bei der eine Stimulation nur mit niedrigen TFF3-Konzentrationen (30 und 100 ng/mL) bzw. mit $\text{TNF}\alpha$ erfolgte, waren zusätzlich auch die Expression von TFF2, ER α und MUC5B bestimmt worden, welche in Abbildung 3.23 dargestellt sind. TFF2 zeigte sich insgesamt in ECC-1-Zellen nur sehr gering exprimiert, deshalb kam es bei den normalisierten Werten teilweise zu einer großen Standardabweichung der ermittelten Expressionsdaten. Nach 48 h ergab sich ein signifikanter Anstieg von TFF2 durch 100 ng/mL TFF3 sowie durch $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation. Die Expression von ER α wurde durch TFF3-Stimulation nicht signifikant beeinflusst. Durch $\text{TNF}\alpha$ ergab sich eine Heraufregulation von ER α , die nach 48 h signifikant war. Die Expression von MUC5B, welches im Uterus gemeinsam mit TFF3 vorliegt, wurde durch die Stimulation mit TFF3 nicht beeinflusst.

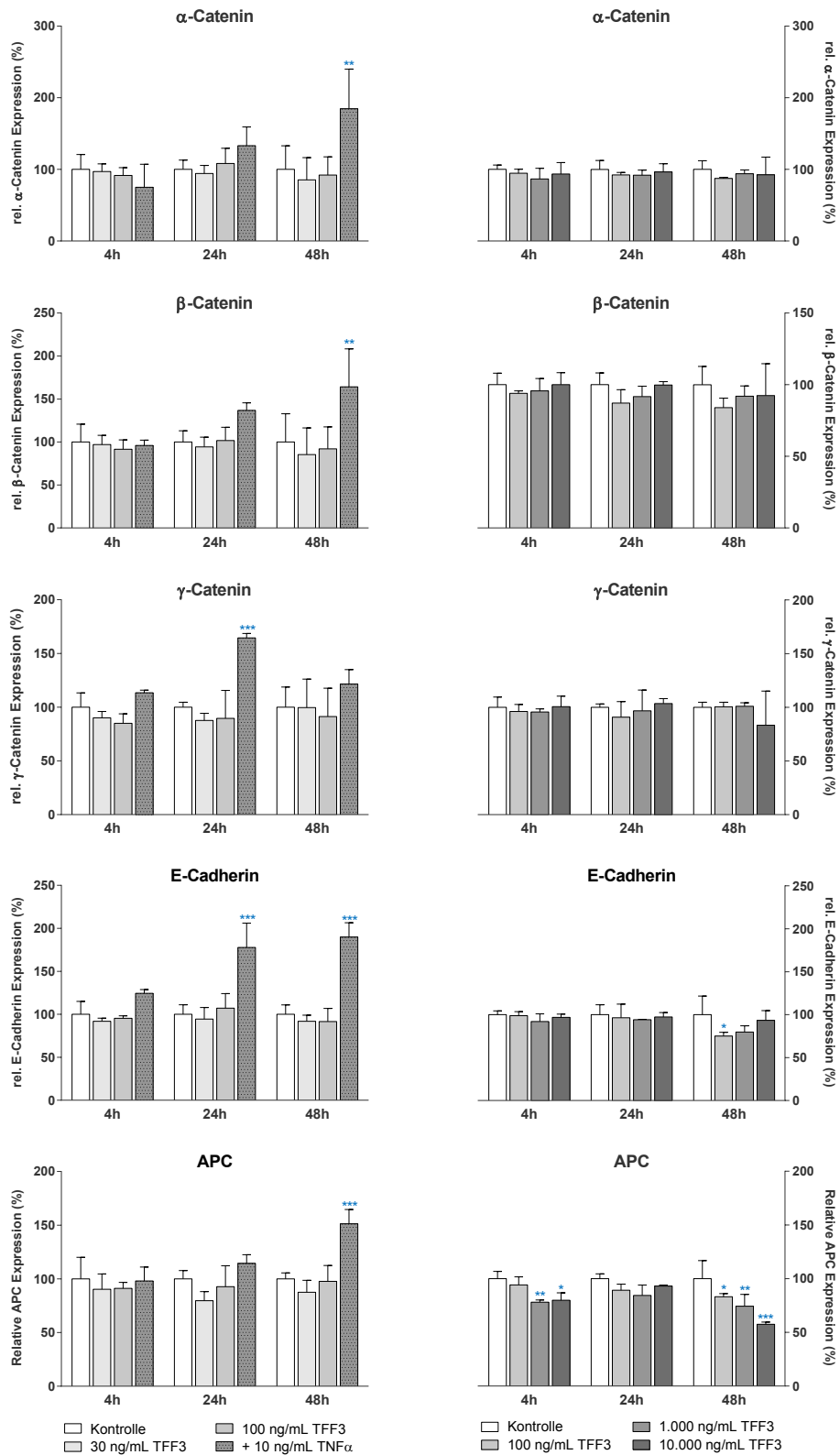


Abbildung 3.22: Genexpression von α -, β -, γ -Catenin, E-Cadherin und APC nach Stimulation mit TFF3 bzw. mit TNF α in ECC-1-Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Expression des jeweiligen Gens normiert auf HPRT1 als endogenem Referenzgen ($\cong 100\%$). Replikate: $n = 3$. Statistik: Two Way ANOVA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

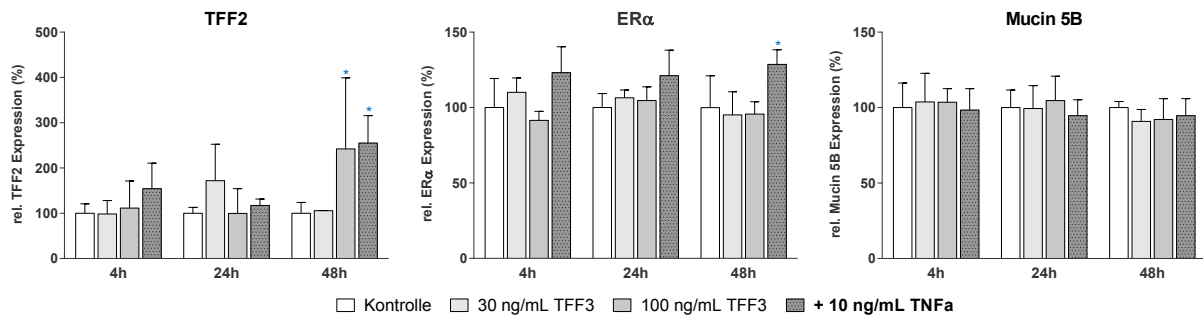


Abbildung 3.23: Genexpression von TFF2, ER α und MUC5B nach Stimulation mit TFF3 sowie mit TNF α in ECC-1-Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen Expression des jeweiligen Gens normiert auf HPRT1 als endogenem Referenzgen ($\cong 100\%$). Replikate: $n = 3$. Statistik: Two Way ANOVA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation mit TFF3 zu einer signifikanten Herunterregulation der zelleigenen TFF3-Expression führte. Des Weiteren wurde APC durch TFF3 bereits nach 4 h signifikant herunterreguliert, wobei die Expression der Catenine und von E-Cadherin unverändert blieb. APC ist im Rahmen des Wnt-Signalwegs am Abbau von β -Catenin beteiligt und hat somit modulierende Wirkung auf die Stabilität des Zelladhäsionskomplex aus Cateninen und E-Cadherin. Dies könnte im Rahmen der Endometriose von Bedeutung sein.

3.3.2.2 Zellviabilität, Apoptose und Proliferation nach Stimulation mit TFF3 und Kostimulation mit TNF α

Für die physiologische Funktion von TFF3 werden in der Literatur die Beteiligung an Reparaturvorgängen der beschädigten Darmmukosa beschrieben sowie Effekte auf die Zellviabilität. Zudem zeigten In-vitro-Untersuchungen in Darmzellen anti-apoptotische Eigenschaften für TFF3, wohingegen die Beeinflussung der Zellproliferation unklar ist.

Um den Effekt von TFF3 auf Viabilität, Apoptose und Proliferation von endometrialen Zellen zu untersuchen, wurden ECC-1-Zellen zunächst mit 30 und 100 ng/mL TFF3 stimuliert (A), parallel erfolgte eine Kostimulation von analogen TFF3-Konzentrationen gemeinsam mit 10 ng/mL TNF α . Neben seiner pro-apoptotischen Wirkung, spielt TNF α eine wichtige Rolle bei der progressiven Entwicklung der Endometriose. Es ist sowohl im Serum als auch in Peritonealflüssigkeiten betroffener Frauen erhöht. Die hier durchgeführte kombinierte Stimulation von TFF3 mit TNF α sollte einen inflammatorischen Zustand in den Zellen simulieren, so wie er auch in der Endometriose auftritt.

Um die Wirkung höherer TFF3-Konzentrationen zu untersuchen, wurde wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, ein zweiter unabhängiger Versuchsdurchgang (B) durchgeführt mit 100, 1.000 und 10.000 ng/mL TFF3. Auch hier erfolgte parallel eine Kostimulation mit 10 ng/mL TNF α . Im Folgenden werden die Versuche A und B mit den verschiedenen eingesetzten TFF3-Konzentrationen jeweils mit Mono- und Kostimulation untereinander aufgeführt.

Zellviabilität mittels CellTiter Glo[®]

Mittels des CellTiter-Glo[®] (Promega) wurde der Einfluss von TFF3 alleine und in Kombination mit TNF α auf die Viabilität endometrialer Zellen untersucht. Sein Prinzip basierte auf der Bestimmung des ATP-Gehalts als Maß für die metabolische Aktivität der Zellen.

Wie in Abbildung 3.24 zu erkennen, kam es bei der Stimulation mit TFF3 ab einer Konzentration von 100 ng/mL zu einer erhöhten Viabilität endometrialer Zellen nach 48 h (A+B). Bei einer gleichzeitigen Gabe von 10 ng/mL TNF α kehrte sich dieser Effekt hingegen ins Gegenteil um. Je höher die gleichzeitige TFF3-Konzentration, desto geringer war die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dies war schon nach einer 4-stündigen Inkubation zu erkennen und verstärkte sich nach 24 h und 48 h weiter.

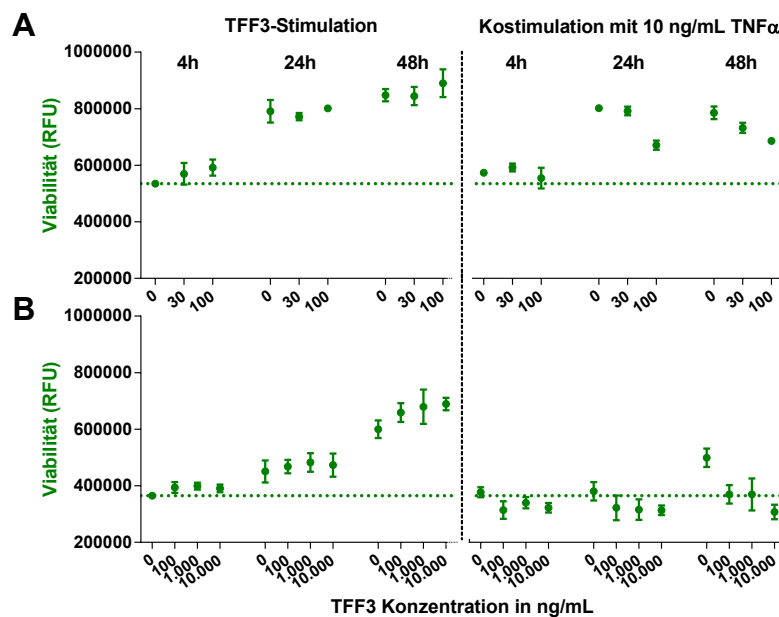


Abbildung 3.24: Zellviabilität mittels CellTiter Glo[®] in endometrialen ECC-1-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen TFF3-Konzentrationen für 4 h, 24 h, oder 48 h (*links*). **A:** 30 und 100 ng/mL TFF3, **B:** 100, 1.000 und 10.000 ng/mL TFF3. Parallel erfolgte eine Kostimulation mit 10 ng/mL TNF α (*rechts*). RFU: *Relative Fluorescence Unit*; grüne gepunktete Linie: Kontrollwert nach 4 h ohne TFF3- oder TNF α -Stimulation.

Zellviabilität und Apoptose mittels ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay

Zur genaueren Analyse der in dem Viabilitätsassay beobachteten Wirkung von TFF3 alleine sowie in Kombination mit TNF α in endometrialen Zellen wurde im Folgenden auf einen Multiplex-Assay der Firma Promega zurückgegriffen. Dieser ermöglichte es in ein und demselben Well neben der Viabilität auch die induzierte Apoptose in den Zellen zu messen. Dadurch konnten interindividuelle Variationen zwischen verschiedenen Versuchsplatten vermieden und eine Aussage zum Zusammenhang zwischen Viabilität und Apoptose in den verschiedenen Behandlungsgruppen gemacht werden.

Die in grün dargestellte Viabilität in Abbildung 3.25 zeigte denselben Verlauf wie bereits durch Messung mit dem CellTiter-Glo® in Abbildung 3.24 beobachtet wurde. Die Stimulation mit TFF3 ab einer Konzentration von 100 ng/mL ließ eine verbesserte Viabilität der endometrialen Zellen erkennen. Bei einer gleichzeitigen Gabe von 10 ng/mL TNF α kehrte sich dieser Effekt ins Gegenteil um. Je höher die TFF3-Konzentration bei der Kostimulation, desto geringer war die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt war bei einer Konzentration von 100 ng/mL TFF3 mit TNF α bereits nach 4 h zu erkennen. Eine Konzentration von nur 30 ng/mL TFF3 schien nicht ausreichend zu sein, um einen Effekt auf die Zellviabilität zu haben, sowohl mit als auch ohne TNF α -Kostimulation. Der in Abbildung 3.25 rot dargestellte Verlauf der Apoptose zeigt nur geringe Veränderungen zwischen den einzelnen Konzentrationen bei alleiniger Stimulation mit TFF3. Bei der Kostimulation mit TNF α nach 48 h wurde deutlich, dass TFF3-Konzentrationen ab 1.000 ng/mL die pro-apoptotische Wirkung des TNF α noch verstärkten, während zeitgleich die Viabilität deutlich absank.

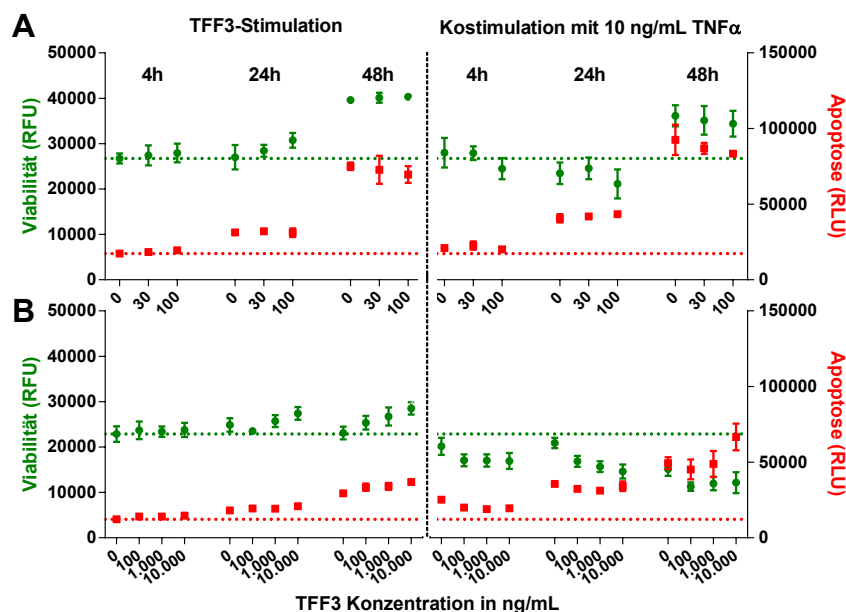


Abbildung 3.25: Zellviabilität und Apoptose mittels ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay in endometrialen ECC-1-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen TFF3-Konzentrationen für 4 h, 24 h, oder 48 h (*links*). **A:** 30 und 100 ng/mL TFF3, **B:** 100, 1.000 und 10.000 ng/mL TFF3. Parallel erfolgte eine Kostimulation mit 10 ng/mL TNF α (*rechts*). RFU/RLU: relative fluorescence/luminescence unit; gepunktete Linie: Kontrolle nach 4 h ohne TFF3- bzw. TNF α -Stimulation.

Zellproliferation mittels BrdU-Inkorporations-Assay

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, war die reduzierte Viabilität bei hohen TFF3-Konzentrationen mit $\text{TNF}\alpha$ -Kostimulation vermutlich auf einen Anstieg der Apoptose zurückzuführen. Die gesteigerte Viabilität war jedoch durch alleinige TFF3-Gabe sowie die Reduzierung bei niedrigen TFF3-Konzentrationen mit $\text{TNF}\alpha$ -Kostimulation nicht durch eine veränderte Apoptose erklärbar. Aus diesem Grund wurde ein BrdU-Inkorporations-Assay angeschlossen, welcher Informationen über die Proliferation der Zellen liefern sollte. Durch den Einbau des Thymidin-Analogon BrdU in die DNA während der Zellteilung konnte das Ausmaß der Proliferation bestimmt werden.

Abbildung 3.26 zeigt die Proliferation der Zellen nach Stimulation mit verschiedenen TFF3-Konzentrationen. Analog der Viabilitätsmessung war durch steigende TFF3-Konzentration ein ähnlich leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der Proliferation zu erkennen. Auffällig war der sehr deutliche Abfall der Proliferationsrate bei einer kombinierten Gabe von TFF3 und $\text{TNF}\alpha$. Nach 24 h führte bereits eine Konzentration von 30 ng/mL TFF3 bei der Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ zu einer deutlichen Herabsetzung der Proliferationsrate im Vergleich zu $\text{TNF}\alpha$ alleine.

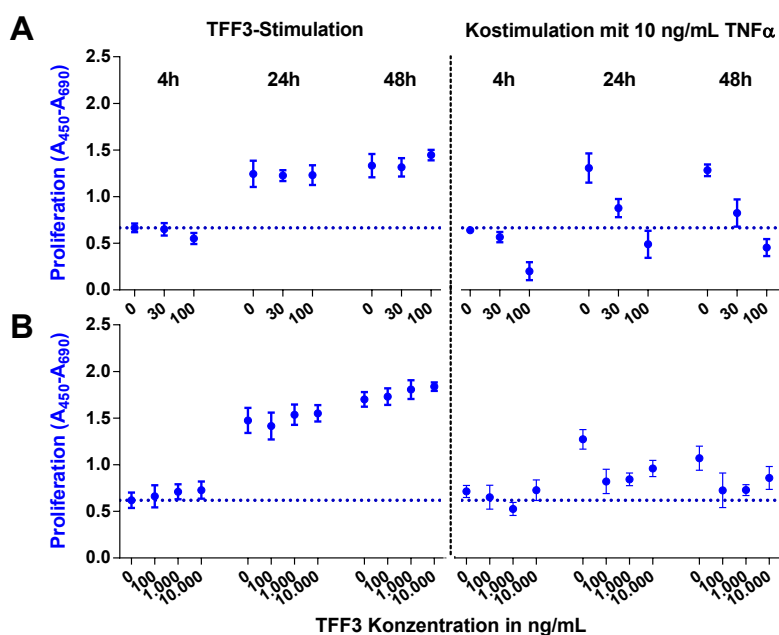


Abbildung 3.26: Proliferation mittels BrdU-Inkorporations-Assay von endometrialen ECC-1-Zellen nach Stimulation mit verschiedene TFF3-Konzentrationen für 4 h, 24 h, oder 48 h (links). A: 30 und 100 ng/mL TFF3, B: 100, 1.000 und 10.000 ng/mL TFF3. Parallel erfolgte eine Kostimulation mit 10 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ (rechts). A: Absorption; blaue gepunktete Linie: Kontrollwert nach 4 h ohne TFF3 oder $\text{TNF}\alpha$ Stimulation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TFF3 alleine ab einer Konzentration von 100 ng/mL zu einer gesteigerten Viabilität der Zellen führte. Durch gleichzeitige Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ hingegen kehrte sich dieser Effekt deutlich um: Mit steigender TFF3-Konzentration war ein sehr deutlicher Rückgang von Viabilität und Proliferation zu verzeichnen. Der pro-apoptotische Effekt des $\text{TNF}\alpha$ wurde nach 48 h durch die Anwesenheit von TFF3 drastisch verstärkt.

Kapitel 4

Diskussion

Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen und betrifft in etwa jede zehnte Frau im Alter zwischen 15 und 50 Jahren. Da die genaue Ursache und Entstehung der Endometriose bis heute nicht geklärt ist, stellt sie ein noch immer deutlich unterschätztes Problem von medizinischer und volkswirtschaftlicher Relevanz dar. Aus diesem Grund ist es von großer Wichtigkeit, weitere an der Pathophysiologie beteiligte Faktoren zu identifizieren, um darauf basierend neue Therapieansätze zu entwickeln.

Das in den 90er Jahren erstmals beschriebene Schleimhautprotein Trefoil factor 3 (TFF3) ist neben seinen protektiven und regenerativen Eigenschaften, vermutlich durch seine pro-invasiven und pro-angiogenen Wirkungen auch an der Entstehung und Entwicklung verschiedener Tumore, wie z. B. dem Endometriumskarzinom beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Expression von TFF3 in Endometriose gezeigt werden. Es war sowohl in peritonealen Endometrioseherden exprimiert als auch signifikant in der Peritonealflüssigkeit erkrankter Frauen und im Mausmodell erhöht. Zudem korrelierten die TFF3-Spiegel mit weiteren an der Pathophysiologie beteiligten Faktoren. Im Serum erkrankter Frauen waren keine erhöhten TFF3-Konzentrationen zu beobachten. Dafür zeigte sich eine zyklusabhängige Regulation systemischer TFF3-Spiegel während des Menstruationszyklus. Im endometrialen Zellkulturmodell wurde die TFF3-Expression durch 17β -Estradiol (E2) heraufreguliert und durch $\text{TNF}\alpha$ herunterreguliert. Die Behandlung mit rekombinantem TFF3 führte in den Zellen zu einer Herunterregulation von Adenomatous polyposis coli (APC) und verstärkte durch eine gemeinsame Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ dessen pro-apoptischen Effekte deutlich.

Zusammenfassend geben die in dieser Arbeit präsentierten Daten erstmals Einblick in die Expression und Regulation von TFF3 in der Endometriose und erlauben erste Vermutungen über dessen Wirkung im Rahmen der Pathogenese. Diese sollen im Folgenden genauer betrachtet und diskutiert werden.

4.1 TFF3 in klinischer und experimenteller Endometriose

4.1.1 Regulierte Proteine in der Peritonealflüssigkeit

Die Peritonealflüssigkeit ist ein sogenanntes Transsudat, das aufgrund kolloidosmotischer Druckgefälle (vorwiegend aus Plasma und Ovar) durch Gefäßwände und Epithelien in den Bauchraum hindurch treten kann (115). Die große Oberfläche des Peritoneums erlaubt zudem die Diffusion zahlreicher niedermolekularer Stoffe aus dem Plasma in das Abdomen (238).

Die Zusammensetzung zwischen der Peritonealflüssigkeit gesunder und an Endometriose erkrankter Frauen unterscheidet sich durch eine erhöhte Anzahl an Immunzellen sowie einer erhöhten Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren (116, 159). Endometriotische Läsionen im Bauchraum führen zu einem lokalen Anstieg aktivierter Makrophagen, die unter anderem $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 freisetzen und die Entstehung lokaler Entzündungsherde begünstigen (81, 233). Durch den inflammatorischen Einfluss werden auch mesotheliale und endometriotische Zellen zur Freisetzung weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert (159). Daneben ist in der Peritonealflüssigkeit von Frauen die freie E2-Konzentration deutlich höher als im Plasma, wo Steroidhormone zu einem Großteil an Transportproteinen gebunden vorliegen (116). Während der ersten Hälfte des Menstruationszyklus wird durch den heranwachsenden Follikel im Ovar zunächst konstant E2 in den Peritonealraum abgegeben. Bei der durch die Ovulation bedingten Ruptur des Follikels wird sein gesamter Inhalt in den Bauchraum entleert, was kurzzeitig zu einer 100-mal höheren E2-Konzentration, als zu der im Plasma führt (116). Da die Peritonealflüssigkeit in direktem Kontakt mit den im Bauchraum befindlichen Läsionen steht, beeinflussen die enthaltenen pro-inflammatorischen Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone die Invasion und Proliferation von ektopen endometriotischen Zellen stärker als etwa zirkulierende Faktoren im Plasma (159, 238).

4.1.1.1 TFF3

Die vorliegende Arbeit zeigte erstmals eine signifikante Erhöhung der TFF3-Konzentration in Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose. Die histologische Analyse von endometriotischen Läsionen bestätigte deren lokale TFF3-Expression im glandulären Epithel. Daher ist anzunehmen, dass die Ursache der erhöhten TFF3-Konzentration auf die peritonealen Endometrioseherde zurückzuführen ist. TFF3 wird vermutlich durch diese in den Bauchraum sezerniert und kann dadurch sowohl auto- als auch parakrin auf benachbarte Zellen eine Wirkung ausüben. Die TFF3-Konzentration in den Peritonealflüssigkeiten zeigte keine Korrelation mit dem rAFS-Schweregrad der Endometriose (*revised American Fertility Society Score*). Dies könnte auf eine unterschiedliche Aktivität einzelner Läsionen zurückzuführen sein, welche bei der angewendeten Klassifizierungsmethode nur ungenügende Berücksichtigung findet.

Auch durch experimentell erzeugte Endometriose im Mausmodell waren signifikant erhöhte

TFF3-Spiegel in den Peritoneallavagen der Tiere zu verzeichnen. Die Endometrioseinduktion war durch Transplantation von Uterusfragmenten aus syngenen Spendern an das Peritoneum erfolgt. Zur Simulation verschiedener Endometriose-Schweregrade war den Tieren eine unterschiedliche Anzahl an Uterusfragmenten transplantiert worden. Die höchsten TFF3-Spiegel wurden in den Tieren mit den meisten Läsionen gemessen. Im Mausmodell kann davon ausgegangen werden, dass alle Läsionen in einem vergleichbaren Aktivitätsstadium waren und daher bei insgesamt mehr endometriotischem Gewebe dementsprechend mehr TFF3 in den Peritonealraum sezerniert werden konnte. Die erhöhten TFF3-Spiegel in den murinen Peritoneallavagen waren bis vier Wochen nach Transplantation zu beobachten. Zu späteren Zeitpunkten wiesen Tiere mit und ohne induzierter Endometriose vergleichbar niedrige TFF3-Konzentrationen auf. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass TFF3 vor allem zu Beginn an der Implantation von ekto-phen endometrialen Zellen in das Peritoneum beteiligt ist. Die immunhistochemische Analyse muriner Läsionen zeigte allerdings auch zu späteren Zeitpunkten eine TFF3-Expression in den Epithelzellen. Das Ausbleiben erhöhter TFF3-Spiegel in Peritoneallavagen zu dieser Zeit könnte mit der morphologischen Umwandlung des murinen endometriotischen Gewebes in Zysten und mit der Ausbildung nach außen hin abgeschlossener Drüsen in Verbindung stehen. Nachdem Implantation und Neoangiogenese des endometriotischen Gewebes abgeschlossen waren, wurde TFF3 womöglich durch die luminalen Epithelzellen in das Innere der Zyste sezerniert und gelangte von Stromazellen umschlossen vermutlich nicht mehr in den Peritonealraum der Tiere. TFF3 wird als eine Art lokales Akute-Phase-Protein unmittelbar nach mukosalen Verletzungen heraufreguliert und stärker sekretiert (209). Diese Eigenschaft könnte der Grund des leichten TFF3-Anstiegs auch in den scheinoperierten Kontrollen sein. Während die naive Kontrollgruppe keinem operativen Eingriff unterzogen wurde, waren den scheinoperierten Tieren zur Simulation der Transplantation, Suturen in das Peritoneum gesetzt worden. Die durch die Operation entstandene Verletzung des peritonealen Mesothels könnte zu dem leichten TFF3-Anstieg in den Peritoneallavagen geführt haben. Dies zeigt, dass vermutlich auch mesotheliale Epithelzellen in der Lage sind, TFF3 zu produzieren. In Tieren mit induzierter Endometriose waren die höchsten TFF3-Konzentrationen zu messen, was demzufolge auf das Vorhandensein der endometriotischen Läsionen zurückzuführen war.

4.1.1.2 Auswahl relevanter Proteine

In den humanen Peritonealflüssigkeiten wurden neben TFF3 noch weitere für die Pathophysiologie der Endometriose potenziell relevanten Proteine bestimmt. Dabei wiesen die lokalen Konzentrationen von Cancer-Antigen 125 (CA 125), Interleukin (IL)-8, Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), Matrix-Metalloproteinase (MMP)-7 und Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF) signifikant positive Korrelationen mit den gemessenen TFF3-Spiegeln auf. TFF3 könnte demzufolge an ähnlichen Prozessen der Endometriose-Entwicklung involviert sein, wie die genannten und in der Literatur teils häufig beschriebenen Faktoren.

Das bekannteste Markerprotein für Endometriose ist CA 125. Es wurde durch seine Heraufregulation in erkrankten Frauen zeitweise als systemisch-diagnostischer Biomarker gehandelt (152). Da es aber genauso oft bei anderen benignen und malignen Erkrankungen erhöht ist, insbesondere beim Ovarialkarzinom, hat es durch seine geringe Spezifität keine Bedeutung in der Endometriose-Diagnostik erlangt (152). CA 125 ist ein membranintegriertes Glykoprotein und wird unter anderem von Epithelzellen des Reproduktionstrakts und des Peritoneums exprimiert. Im Serum von Frauen mit Endometriose ist es insbesondere bei fortgeschrittenen Stadien erhöht (12, 44), während es in der Peritonealflüssigkeit für die Erkennung früher Stadien eine bessere Sensitivität aufzuweisen scheint (6). Amaral et al. beschrieb eine positive Korrelation zwischen CA 125-Spiegeln in Serum und Peritonealflüssigkeit (6), während andere Autoren keinen Zusammenhang zwischen systemischen und lokalen Konzentrationen feststellen konnten (67, 99, 203). In der vorliegenden Arbeit war CA 125 in den Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu den Kontrollen signifikant heraufreguliert. Dabei zeigten sich die höchsten Mittelwerte sowohl für das fortgeschrittene Stadium rAFS IV als auch bei Rezidiv-Patientinnen im Stadium rAFS I. Auch für einen weiteren membranintegrierten Tumormarker, CA 19-9, sind erhöhte Spiegel in Frauen mit Endometriose beschrieben worden (84, 120). Korrelationen mit dem Erkrankungsstadium zeigten sich im Serum, nicht aber in der Peritonealflüssigkeit. In der vorliegenden Studie ergab sich zwar für das rAFS-Stadium IV eine signifikante Heraufregulation, jedoch wiesen die Werte insgesamt viele Ausreißer und daher eine große Streuung auf. Eine eindeutige Aussage zu CA 19-9 war daher nicht möglich.

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-8 wird von Makrophagen sowie von endometriotischen und mesothelialen Zellen sezerniert. Durch seine pro-angiogenen Eigenschaften wird eine Beteiligung an der Neoangiogenese ektoper Läsionen vermutet (172). Arici et al. beobachteten nach IL-8-Stimulation in-vitro eine gesteigerte Zellproliferation und Adhäsionsbereitschaft endometrialer Stromazellen (7, 9). In Peritonealflüssigkeiten wurden bereits mehrfach erhöhte IL-8-Konzentrationen für Frauen mit Endometriose beschrieben. Dabei zeigten sich sowohl positive (33, 137, 165, 178) als auch negative Korrelationen mit dem jeweiligen Erkrankungsstadium (73). In Einklang mit den widersprüchlichen Literaturdaten waren in der vorliegenden Studie IL-8-Spiegel in Frauen mit den rAFS-Stadien I und IV signifikant erhöht. IL-8 könnte demnach sowohl zu Beginn bei der Implantation und Neoangiogenese als auch in fortgeschrittenen Stadien an der Proliferation ektoper Endometriumszellen beteiligt sein.

Daneben spielen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in der Endometriose eine bedeutende Rolle durch den Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix bei der Invasion endometrialer Zellen in das Peritoneum. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 in Endometrioseherden ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zum gesunden Endometrium aufweisen (96). Ihre Expression wird vor allem durch E2 und Zytokine, wie IL-1 und TNF α induziert (176). In dieser Arbeit waren MMP-1, MMP-7, MMP-10 und TIMP-1 in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose zum Teil signifikant erhöht. MMP-3 zeigte

sich als einzige Metalloproteinase signifikant erniedrigt. In-vitro-Studien in einem Arthrosemodell zeigten, dass TFF3 die Expression von MMPs aktivieren konnte und somit vermutlich in der Lage ist, modulierend auf Umbauprozesse extrazellulärer Matrix zu wirken (176). MCP-1 ist eines der wichtigsten und potentesten chemotaktischen Zytokine zur Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen (198). Es wird von verschiedenen Immunzellen sowie von endometriotischen und mesothelialen Zellen sezerniert (197, 236, 237). Die Produktion von MCP-1 wird durch IL-1 und TNF α stimuliert (61). In Frauen mit Endometriose wurden erhöhte Konzentrationen beschrieben, wobei in der Peritonealflüssigkeit die höchsten Werte während früher Stadien gemessen wurde (5, 8). Die Autoren vermuteten daher eine wichtige Rolle für MCP-1 insbesondere bei der Entstehung der Erkrankung (197). In der vorliegenden Studie zeigte MCP-1 aufgrund einer großen Streuung von Einzelwerten keinen signifikanten Unterschied zwischen Frauen mit und ohne Endometriose, auch wenn ein Trend zu höheren Werten bei erkrankten Frauen zu erkennen war. Da besonders hohe Einzelwerte sowohl in frühen als auch in späten Stadien auftraten, konnte kein Zusammenhang mit dem Schweregrad ausgemacht werden.

Kolonie-stimulierende Faktoren (CSFs) sind in erster Linie hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die stimulierend auf die Proliferation unreifer Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems wirken. In Frauen mit Endometriose wurden in vorangegangenen Studien erhöhte Konzentrationen von Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (M-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) beschrieben. G-CSF fand im Zusammenhang mit Endometriose bisher noch keine Erwähnung.

In der vorliegenden Studie waren die Konzentrationen von G-CSF in den Peritonealflüssigkeiten erkrankter Frauen signifikant heraufreguliert. Die Werte zeigten zudem eine hochsignifikante Korrelation mit den TFF3-Spiegeln. G-CSF wird bei Entzündungen und Infektionen ausgeschüttet und wirkt aktivierend auf neutrophile Granulozyten sowie stimulierend auf deren Produktion. Exprimiert wird es sowohl in Makrophagen als auch in Mesothelzellen des Peritoneums und in endometrialen Epithel- und Stromazellen, insbesondere in Deziduazellen während der Sekretionsphase und in der Plazenta (123, 179, 205). In-vitro ließ sich die G-CSF-Produktion durch Stimulation mit IL-1 und TNF α aktivieren (113, 123, 221). G-CSF war zudem in der Lage, die Proliferation und Migration endothelialer Zellen zu bewirken und scheint daher auch in der Neoangiogenese eine Rolle zu spielen (31, 221).

Neutrophile Granulozyten (kurz: Neutrophile) stellen die größte Gruppe der Leukozyten im Blut dar und sind die ersten Immunzellen in geschädigtem oder entzündetem Gewebe. Sie gehören wie die Makrophagen zum angeborenen unspezifischen Immunsystem und sind in der Regel für die Phagozytose von Krankheitserregern zuständig. Neben der initialen Immunantwort spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung. Nach Aktivierung schütten Neutrophile verschiedene pro-inflammatorische Zytokine, MMPs und VEGF aus und sind demnach an Umbauprozessen extrazellulärer Matrix und an der Angiogenese beteiligt (89). Während

vor allem in frühen Stadien der Endometriose die Anzahl an Makrophagen besonders hoch ist, wurden für Neutrophile zu allen Zeitpunkten und Schweregraden deutlich erhöhte Werte in der Peritonealflüssigkeit beschrieben (206). Dennoch finden sich bisher nur wenige Studien, die die Rolle der Neutrophilen im Rahmen der Endometriose genauer untersuchten (89). Insgesamt kann G-CSF demnach nicht nur als reiner hämatopoetischer Wachstumsfaktor betrachtet werden, sondern auch als ein Modulator akuter und chronischer Inflammation (65, 87, 103).

Darüber hinaus spielt das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) eine wichtige Rolle bei der systemischen Rekrutierung von Leukozyten, durch seine Beteiligung an deren transendothelialer Migration in inflammatorische Areale. VCAM-1 ist ein transmembranäres Glykoprotein und gehört der Immunglobulin-Superfamilie an. Neben Endothelzellen und Makrophagen wird es auch auf stromalen und epithelialen Endometriumszellen exprimiert (50, 110). Die Expression wird durch Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und $\text{IFN}\gamma$ aktiviert (50). Auch wenn es bisher nur wenige Daten zu VCAM-1 in der Endometriose gibt, ist eine Beteiligung an Entzündungs- und Adhäsionsvorgängen basierend auf den vorhandenen Publikationen denkbar. Bisherige Studien zeigten systemisch erhöhte Konzentrationen von in Plasma gelöstem VCAM-1, insbesondere bei fortgeschrittener Endometriose (13, 49). In der Peritonealflüssigkeit von fünf Frauen mit Endometriose und acht Kontrollen, zeigte sich kein Unterschied zwischen den VCAM-1-Konzentrationen (49). In der vorliegenden Studie hingegen war es in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose signifikant erniedrigt, insbesondere im Stadium rAFS I. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die Zellen bei Endometriose weniger VCAM-1 exprimieren oder es aus unbekanntem Gründen zu einer reduzierten Ablösung von der Zellmembran kommt und demnach weniger lösliches VCAM-1 nachzuweisen ist.

4.1.2 TFF3 im Rahmen systemischer Inflammation

Die Reaktion verschiedener Gewebe auf Verletzungen und Infektionen drückt sich meist in Form einer unspezifischen Immunantwort mit lokaler Entzündung aus. Die dabei stattfindende Permeabilisierung von Gefäßen erlaubt die Leukozyteninfiltration in das geschädigte Areal. Die aktivierten Immunzellen setzen verschiedene Mediatoren, wie z. B. IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ frei und initiieren dadurch die systemische Immunantwort mit dem Anstieg von Akute-Phase-Proteinen im Serum (200). Durch die während der Menstruation retrograd in den Bauchraum eingewanderten Endometriumszellen, können ähnliche Prozesse ausgelöst werden, wobei noch unklar ist, ob und inwiefern eine systemische Immunantwort in der Endometriose von Bedeutung ist (3). Akute-Phase-Proteine sind in der Lage durch Neutralisierung inflammatorischer Agenzien eine Schädigung des umliegenden, nicht betroffenen Gewebes zu reduzieren, die Ausbreitung von Infektionen zu verhindern und die Wundheilung zu unterstützen. Sie werden primär von Hepatozyten in der Leber gebildet. Einige wenige können auch von anderen Zelltypen, wie etwa von aktivierten Makrophagen oder Endothelzellen sezerniert werden (142, 200). Die Konzentrations-

bestimmung von Akute-Phase-Proteinen im Serum wird sowohl beim Menschen als auch beim Tier im Rahmen der Diagnostik für im Organismus stattfindende inflammatorische Prozesse herangezogen.

Im Mausmodell dieser Arbeit konnten bis zu vier Wochen nach Endometrioseinduktion systemisch erhöhte Spiegel der Akute-Phase-Proteine Serum Amyloid A3 (SAA-3), Serum Amyloid P und Haptoglobin beobachtet werden.

SAA-3 gehört zu der Familie der Apolipoproteine und liegt im Serum an High-Density-Lipoproteinen (HDLs) gebunden vor. Im Gegensatz zu SAA-1 und SAA-2 wird es auch von Makrophagen gebildet und kann daher ohne systemische Aktivierung lokal sezerniert werden (142). SAP gehört wie das C-reaktive Protein (CRP) zur Pentraxin-Familie. Speziesabhängig agiert meist nur eines der beiden als Akute-Phase-Protein. Im Menschen wird CRP im Rahmen einer Inflammation innerhalb weniger Stunden heraufreguliert, während die SAP-Konzentration konstant bleibt. In der Maus ist es insbesondere SAP, das nach einem inflammatorischen Stimulus heraufreguliert wird (126, 200). Haptoglobin ist primär für die Bindung von freiem Hämoglobin zuständig und wurde in Frauen von endometriotischen Zellen sezerniert gefunden. Daneben besitzt es immunmodulierende und angiogene Eigenschaften (193, 194). Abrao et al. beobachtete in Frauen mit Endometriose eine systemische Heraufregulation der Akute-Phase-Proteine SAA und CRP in den Stadien rAFS III und IV (1). Andere Studien zeigten für CRP nur sehr schwache oder gar keine erhöhten Werte (129, 140, 173). In Frauen mit Endometriuskarzinom war SAA im Serum signifikant heraufreguliert (43). In endometriotischen Läsionen, nicht aber im eutopen Endometrium, wurde die Expression eines Proteins *Endo 1* beschrieben, das sich vom humanen Serum-Haptoglobin nur durch ein verändertes Glykosylierungsmuster unterscheidet (193). Es ist in der Lage, an Makrophagen zu binden und deren Phagozytoseaktivität zu verringern. Gleichzeitig stimuliert es die Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF α , wodurch wiederum in Form eines positiven Rückkopplungsmechanismus die Produktion von Akute-Phase-Proteinen stimuliert bzw. aufrechterhalten wird (194).

Im vorliegenden Mausmodell zeigte der Anstieg der Akute-Phase-Proteine zu frühen Zeitpunkten in Tieren mit induzierter Endometriose einen ähnlichen Verlauf wie die peritoneal erhöhten TFF3-Spiegel. Auffällig war hingegen, dass nach zwei Wochen nicht etwa Tiere mit sechs Uterustransplantaten die höchsten Konzentrationen an SAA-3, Haptoglobin und SAP aufwiesen, sondern Tiere, denen neben zwei Uterustransplantaten, vier Suturen gesetzt wurden und die demnach weniger endometriotisches Gewebe im Bauchraum aufwiesen. Die erhöhten Spiegel fielen in dieser Gruppe nach vier Wochen deutlich ab, wohingegen in Tieren mit den sechs Transplantaten die Werte erst nach sechs Wochen wieder auf Normalniveau sanken. Für die initiale systemische Antwort der Akute-Phase-Proteine scheint die Anzahl der Läsionen zweitrangig zu sein. Hingegen wird die Nachhaltigkeit einer systemischen Reaktion offenbar durch eine größere Menge an endometriotischem Gewebe verstärkt.

Nach sechs Wochen waren in keiner Versuchsgruppe mehr erhöhte Werte von Akute-Phase-Proteinen zu beobachten. Demnach schien nach abgeschlossener Implantation des transplantierten Gewebes die systemische Inflammation zurückzugehen. Dies deckt sich, neben den beschriebenen peritonealen TFF3-Werten, auch mit dem Milzgewicht der Tiere. In murinen Kolitismodellen verursachen systemische Entzündungsreaktionen eine Splenomegalie, welche im Menschen für gewöhnlich nicht zu beobachten ist (118, 195). Auch wenn die Ursache der Vergrößerung des lymphatischen Organs unklar ist, kann das Milzgewicht im Mausmodell als Marker für im Organismus ablaufende inflammatorische Erkrankungen herangezogen werden. Experimentell induzierte Endometriose führte in der vorliegenden Studie durch die aktivierten inflammatorischen Prozesse zu einer Splenomegalie. Das erhöhte Milzgewicht korrelierte hochsignifikant mit den peritonealen TFF3-Konzentrationen der Tiere. Der lokale TFF3-Anstieg stand demnach in den betreffenden Tieren im Zusammenhang mit der jeweiligen Immunantwort. Passend dazu wiesen Cook et al. die Expression von TFF3 in lymphatischen Geweben der Ratte nach (Lymphknoten, Knochenmark und Milz) (45). Auch wenn die Konzentration im Vergleich zum Gastrointestinaltrakt gering war, ließ sich in der Milz die TFF3-Genexpression durch intraperitoneale Injektion von Endotoxinen innerhalb von 14 h signifikant heraufregulieren. Die erhöhte Expression hielt wenigstens 14 Tage an. In-vitro beobachteten Cook et al. zudem eine durch TFF3 gesteigerte Monozytenmigration (45). Eine andere Gruppe zeigte in einem autologen Mausmodell, dass im Peritonealraum der Tiere nach Transplantation von Uterusfragmenten die Leukozytenzahl signifikant anstieg (131).

Zusammen mit der im vorangegangenen Abschnitt 4.1.1 gezeigten Korrelation von TFF3 mit MCP-1- und G-CSF-Konzentrationen in Peritonealflüssigkeit erkrankter Frauen, weisen die Daten auf eine mögliche Beteiligung von TFF3 an der Leukozytenrekrutierung hin. Demnach könnte TFF3 durch seine immunmodulierenden Eigenschaften die Entstehung der Endometriose begünstigen.

4.1.3 TFF3-Expression in eutopem und ektopem Endometrium

Erstmalig wurde in dieser Arbeit histologisch die Expression von TFF3 in endometriotischen Läsionen auf Protein- und mRNA-Ebene gezeigt. Bisher gibt es nur wenige Publikationen, die TFF3 im Uterus der Frau beschreiben und das mit widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Expression im Endometrium. Madsen et al. zeigten mittels der Immunhistochemie zwar eine deutliche Expression von TFF3 im Schleimhautepithel der Vagina, jedoch nur vereinzelt positive Zellen im Drüsenepithel des proliferativen Endometriums (136). Haroun et al. wiesen hingegen eine starke Expression von TFF3 sowohl in epithelialen als auch in stromalen Zellen von sekretorischem Endometrium nach (85). In der vorliegenden Arbeit war TFF3 im untersuchten proliferativen Endometrium vorwiegend im Drüsenepithel und vereinzelt auch in Zellen des Stromas exprimiert. Im ektopen Endometrium endometriotischer Läsionen war die Lokalisation von TFF3 auf das Epithel beschränkt.

Wiede et al. konnten zwar kleine Mengen TFF3-mRNA, aber kein TFF3-Protein mittels Western-Blot in Endometrium feststellen (230). Dafür zeigten sie eine starke TFF3-Expression im Drüsenepithel der Endozervix und identifizierten TFF3 als ein Hauptbestandteil des zervikalen Mukus (230). Wie Samson et al. mittels ELISA herausfanden, war die TFF3-Konzentration zum Zeitpunkt der Ovulation im zervikalen Mukus am höchsten, während sie in der sekretorischen Phase deutlich absank (182). Dieser Abfall konnte im Endometrium auch auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Eine Genexpressionsstudie von Borthwick et al. zeigte in der Sekretionsphase ein 50-fach niedrigeres Transkriptionslevel von TFF3 als in der Proliferationsphase (26). Analog dazu war in einer Mikroarray-Studie von Kao et al. TFF3 während des „Implantationsfensters“ (mittlere sekretorische Phase) das am stärksten herunterregulierte Gen von rund 12.000 untersuchten Genen (107).

Zervikaler Mukus dient in der Regel als Schutz insbesondere gegenüber Mikroorganismen. Im Rahmen des Menstruationszyklus kontrolliert er das Eindringen von Spermien. TFF3 ist neben der protektiven und regenerativen Wirkung vermutlich gemeinsam mit Muzinen für die viskoelastischen Eigenschaften des Zervixmukus verantwortlich (88, 214). Während TFF3 von den Becherzellen des Darms gemeinsam mit MUC2 sezerniert wird, liegt es im Uterus vorwiegend mit MUC5B zusammen vor (228). Für eine gemeinsame Sekretion spricht, dass sowohl für TFF3 als auch für MUC5B zum Zeitpunkt der Ovulation die höchsten Konzentrationen im zervikalen Mukus beschrieben wurden (74, 93). Zudem wird in-vitro sowohl für TFF3 als auch für MUC5B eine durch E2 stimulierbare Expression beschrieben (39, 141). Auch eine Proteom-Analyse des endometrialen Sekrets wies TFF3 und MUC5B gemeinsam nach (35). Die zyklische und vermutlich hormonregulierte Expression könnte ein Hinweis darauf sein, dass TFF3 im Rahmen des Menstruationszyklus an den Auf- und Umbauprozessen des Endometriums beteiligt ist.

Im Mausmodell war TFF3 ebenfalls sowohl im eutopen als auch im ektopen Endometrium exprimiert. TFF3 war zu allen Sektionszeitpunkten (2 bis 14 Wochen) in Läsionen und Uteri nachweisbar. Dabei fiel auf, dass die TFF3-Expression zwischen einzelnen Tieren zum Teil unterschiedlich stark war. Dies könnte wie in der Frau, auf eine zyklisch regulierte TFF3-Expression in murinem Endometrium zurückzuführen sein. Auch Nager weisen einen vier bis fünf Tage dauernden, sogenannten Estruszyklus mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Endometriums auf. In der Literatur fand sich lediglich ein Bericht, der die Genexpression von TFF3 im murinen Uterus untersuchte und auch bestätigen konnte (138).

Im Gegensatz zum eutopen Endometrium unterscheiden sich Endometrioseherde hinsichtlich der im Rahmen des Menstruationszyklus ablaufenden morphologischen Veränderungen. Dies ist vermutlich auf das veränderte Expressionsmuster und die verringerte Anzahl von Steroidrezeptoren zurückzuführen (19, 102). Eine unterschiedliche TFF3-Expression zwischen ektopem und eutopem Endometrium ist denkbar, konnte aber aufgrund der wenigen zur Verfügung stehenden Endometriumsproben in der vorliegenden Studie nicht untersucht werden.

4.1.4 Regulation systemischer TFF3-Spiegel

4.1.4.1 TFF3-Regulation bei Endometriose

Als typisches sekretorisches Protein findet sich TFF3 auch im systemischen Blutkreislauf. In verschiedenen Krebserkrankungen (Endometrium, Pankreas, Magen, Kolon und Lunge) wurden zudem erhöhte Serum- bzw. Plasmaspiegel für TFF3 beschrieben. Diese korrelierten zwar mit der lokalen Expression im Tumorgewebe, jedoch nicht mit dem Erkrankungsstadium (4, 95, 105, 171, 225). Daneben sind erhöhte TFF3-Serumspiegel auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und bei chronischer Niereninsuffizienz zu beobachten (58, 76, 223, 224). Im Endometriuskarzinom wurde bereits mehrfach eine heraufregulierte Expression von TFF3 beschrieben (22, 83, 145, 146). Bei der Verwendung von TFF3 als diagnostischen Serummarker für das Endometriuskarzinom, zeigten Bignotti et al. eine deutlich höhere Sensitivität als bei der Messung des klassischen und häufig verwendeten Tumormarkers CA 125 (22).

Um die Eignung von TFF3 als potenziellen systemischen Biomarker in der Endometriose zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Konzentration in Seren von 75 Frauen mit und 43 Frauen ohne Endometriose bestimmt. Dafür erfolgten pro Frau vier Blutabnahmen vor und vier Blutabnahmen nach Durchführung einer Laparoskopie mit Entfernung vorhandener endometriotischer Läsionen. Die jeweiligen Probenahmen erfolgten einmal am ersten Tag des Zyklus mit Beginn der Menstruation, einmal am neunten Tag des Zyklus während der proliferativen Phase sowie zweimal in der sekretorischen Phase, drei und elf Tage nach erfolgter Ovulation mit LH-Peak. Die Messung mittels ELISA ergab sowohl prä- als auch post-laparoskopisch keinen Unterschied der TFF3-Konzentration im Serum von Frauen mit und ohne Endometriose. Vereinzelte Ausreißerwerte nach oben wurden nur in Frauen mit Endometriose beobachtet, welche nach Entfernung der endometriotischen Läsionen wieder absanken. Insgesamt scheinen die Endometrioseherde im Bauchraum aufgrund ihrer verhältnismäßig geringen Größe nur sehr wenig oder gar kein TFF3 in den Blutkreislauf zu sezernieren. Tumore oder inflammatorische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts weisen oft ein deutlich größeres Volumen bzw. Areal auf und scheinen daher in der Lage zu sein, systemische TFF3-Konzentrationen zu beeinflussen. Basierend auf diesen Resultaten ist TFF3 nicht zur Verwendung als systemischer Biomarker für Endometriose geeignet.

Auch im Endometriose-Mausmodell war kein systemischer TFF3-Anstieg in Tieren mit endometriotischen Läsionen zu beobachten. Stattdessen wurde in Tieren mit sechs Läsionen sogar eine signifikante Herunterregulation der TFF3-Spiegel im Serum gemessen. Ob die bestehende Inflammation mit diesem Effekt in Verbindung stand, lässt sich nicht klären. Die erniedrigten Konzentrationen waren bis zu acht Wochen nach Transplantation zu beobachten. Das entspricht einem längeren Zeitraum als die Heraufregulation von TFF3 in Peritoneallavagen und von Akute-Phase-Proteinen im Serum andauerte. Ein TFF3-Rezeptor konnte bis heute nicht identifiziert werden, dennoch wird davon ausgegangen, dass TFF3 die meisten seiner Wirkungen

rezeptorvermittelt ausübt (111, 162). In welchen Geweben oder Organen dieser möglicherweise exprimiert wird und wann, ist unbekannt. Die erniedrigten TFF3-Spiegel im Serum ließen sich durch die Bindung des zirkulierenden Peptids an seinen Rezeptor in bestimmten Organen erklären. Dieser könnte durch einen bestimmten Stimulus im Zielgewebe vermehrt exprimiert worden sein und TFF3 binden, um eine TFF3-vermittelte Wirkung in Gang zu setzen. Dadurch würde TFF3 im Serum „verbraucht“ werden und die erniedrigten Konzentrationen erklären.

4.1.4.2 TFF3-Regulation während des Menstruationszyklus

Unabhängig von einer diagnostizierten Endometriose wurde in allen untersuchten Frauen eine zyklusabhängige Regulation der systemischen TFF3-Spiegel beobachtet, welche sich durch eine statistisch signifikante Variation zwischen aufeinanderfolgenden Blutabnahmen zeigte. Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 genauer erläutert, weist lokales TFF3 im eutopen Endometrium eine zyklusabhängige Expression auf. Hohe mRNA-Level werden vorwiegend im proliferativen Endometrium beobachtet, niedrige während der sekretorischen Phase. Im endometrialen Zellkulturmodell zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Heraufregulation für TFF3 nach E2-Stimulation. Dies deckt sich mit den Literaturdaten (141). Trotz dieser offensichtlich estrogenregulierten Expression von TFF3, konnte bis heute keine Zyklusabhängigkeit im Serum von Frauen nachgewiesen werden. Eine vorangegangene Studie untersuchte biologische Schwankungen von systemischen TFF3-Spiegeln, konnte in den sieben untersuchten Frauen jedoch keinen Unterschied zwischen Menstruation, proliferativer Phase, Ovulation und sekretorischer Phase feststellen (223). Eine andere Studie zeigte zur Zeit um die Ovulation eine signifikant höhere Sekretion von TFF3 in den zervikalen Mukus, systemische Spiegel der 18 untersuchten Frauen blieben hingegen unverändert (182). Während der Schwangerschaft wurde in Frauen ein massiver Anstieg von TFF3 im Serum beobachtet (181). Die Konzentrationen erreichten dabei bis zu 47-mal höhere Konzentrationen als acht Wochen nach der Geburt. Die genannten Untersuchungen zur TFF3-Regulation während des Menstruationszyklus erfolgten an sehr kleinen Patientenkollektiven, was vermutlich ein Hauptgrund für die nicht signifikanten Resultate war. In der vorliegenden Arbeit wurde Serum von insgesamt 118 Frauen analysiert. Sowohl in Frauen mit als auch ohne Endometriose und sowohl vor als auch nach Laparoskopie mit Entfernung vorhandener endometriotischer Läsionen, zeigten die TFF3-Spiegel eine zyklusabhängige Regulation im Serum. Die höchsten Werte wurden dabei zum einen in der proliferativen (Tag 9) und zum anderen in der späten sekretorischen Phase des Menstruationszyklus (LH+11d) gemessen, während niedrigere TFF3-Konzentrationen am ersten Tag der Menstruation (Tag 1) und wenige Tage nach Ovulation (LH+3d) zu messen waren. Die Heraufregulation während der proliferativen Phase ist vermutlich auf die hohen systemischen Estrogenspiegel während dieser Zeit zurückzuführen. Verschiedene Autoren postulieren aufgrund der erhöhten Expression eine Beteiligung von TFF3 an den regenerativen Prozessen des Endometriums nach der Menstruation (26, 183, 230). Während der sekretorischen Phase werden die niedrigsten Expressionslevel

von TFF3 im Endometrium beschrieben (26, 107). Auch im Serum waren zu Beginn der sekretorischen Phase niedrige TFF3-Konzentrationen zu messen, die in der späten sekretorischen Phase wieder anstiegen. In der Literatur gibt es keine Daten zur lokalen Expression von TFF3 im Endometrium während der spät-sekretorischen Phase oder der Menstruation. Die Zeit kurz vor der Menstruation ist geprägt von niedrigen Estrogen- und fallenden Progesteronspiegeln (siehe auch Abbildung 1.2 auf Seite 5). Progesteron besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften und sein Entzug resultiert in einer Induktion inflammatorischer Gene und einer Vasokonstriktion von Spiralarterien im Endometrium mit einhergehender Ischämie. In-vitro konnte bei hypoxischen Bedingungen eine *Hypoxia Inducible Factor 1* (HIF-1)-abhängige Heraufregulation von TFF3 in Magen- und Kolonkarzinomzellen gezeigt werden (71, 90).

Auch durch inflammatorische Stimuli wird die Produktion von TFF3 heraufreguliert. Da die Menstruation ein hoch-inflammatorisch geprägter Prozess ist, war es daher verwunderlich, dass die systemischen TFF3-Spiegel zu dieser Zeit wieder abfielen. Möglicherweise sind die nekrotischen Veränderungen, mit dem einhergehenden Niedergang des endometrialen Gewebes Grund für die absinkenden TFF3-Spiegel im Blutkreislauf.

4.1.5 TFF3 im endometrialen Zellkulturmodell

4.1.5.1 TFF3-Regulation durch 17 β -Estradiol

Sowohl die TFF3-Expression im Endometrium als auch die Regulation in Serum weisen auf eine estrogenabhängige Regulation von TFF3 hin. Bisher untersuchten nur zwei Gruppen die TFF3-Regulation durch E2 im Zellkulturmodell genauer (11, 141). Die Beobachtung, dass TFF3 gemeinsam mit TFF1 nur in Estrogenrezeptor-positiven Brustkrebsarten exprimiert wurde (211), ließ May et al. annehmen, dass die TFF3-Expression, ähnlich wie die von TFF1 in Brustkrebs, unter der Kontrolle von Estrogenen steht (141, 211). Sie untersuchten daher die TFF3-Regulation in fünf estrogenresponsiven Brustkrebszelllinien. In allen Zellen war nach E2-Stimulation ein leichter bis starker Anstieg von TFF3-mRNA zu messen. In der Brustkrebszelllinie MCF-7 war eine gesteigerte Expression nach 2 h zu beobachten und erreichte nach 24 h ein Maximum. Auch Balcer-Kubiczek et al. wiesen nach 24-stündiger E2-Stimulation in MCF-7-Zellen und in estrogenresponsiven Magenkarzinomzellen eine signifikante Heraufregulation von TFF3-mRNA nach (11). Durch Behandlung mit dem selektiven Estrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen ließ sich die TFF3-Expression steigern, wenn auch in einem kleineren Ausmaß. Die Stimulation mit dem Antiestrogen ICI 164,384 führte zu keinem messbaren Effekt(141).

Um eine Estrogenregulation von TFF3 auch im endometrialen Zellkulturmodell zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit ECC-1-Zellen für unterschiedliche Zeiträume (40 min bis 48 h) mit E2 stimuliert und anschließend die mRNA-Konzentrationen der Trefoilpeptide bestimmt. Die Expression von TFF1 stieg durch E2-Stimulation kontinuierlich an und erreichte

vergleichbare Werte wie die typischen estrogenresponsiven Gene FOS, MYC und PGR. TFF3 zeigte zwar insgesamt einen niedrigeren, aber dennoch signifikanten Expressionsanstieg durch die Stimulation mit E2. In zwei unabhängigen Studien wies die Expression nach 2 h ein Maximum auf, während die Konzentration nach 4 h wieder annähernd Kontrollniveau erreichte. Nach 24 h zeigte sich ein erneuter Anstieg der TFF3-Expression. Das Auftreten dieser zwei Expressionspeaks ist zunächst erstaunlich, könnte aber ein Hinweis darauf sein, dass die TFF3-Expression über unterschiedliche Stimuli oder Signalwege aktiviert wurde. Zum Beispiel wäre es denkbar, dass die durch E2 heraufregulierten Faktoren verantwortlich für den erneuten Anstieg der TFF3-Genexpression waren. Für Trefoilpeptide konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, ihre Expression gegenseitig durch eine indirekte Aktivierung des EGF-Rezeptors zu stimulieren (207). Somit wäre es denkbar, dass der erste TFF3-Anstieg nach 2 h auf die Stimulation mit E2 und der zweite Peak nach 24 h auf die durch E2 induzierbaren Faktoren, wie z. B. TFF1 zurückzuführen ist.

4.1.5.2 Funktionelle Wirkung von TFF3

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die Expression und die Regulation von TFF3 in klinischer und experimenteller Endometriose untersucht wurden, war es ebenso von Interesse, mit welchen Funktionen TFF3 an der Entstehung und Entwicklung der Erkrankung beteiligt sein könnte. In der Literatur werden für TFF3 vor allem anti-apoptische und motogene Eigenschaften beschrieben (57, 111). Ob TFF3 auch eine Wirkung auf die Zellproliferation aufweist ist aufgrund widersprüchlicher Daten unklar. TFF3 scheint in verschiedenen Zellen unterschiedliche Effekte zu vermitteln. Mit TFF3 transfizierte MCF-7-Brustkrebszellen wiesen eine gesteigerte Proliferation mit gleichzeitig verringerter Apoptose auf (106). Eine anschließende PCR-Analyse ergab die Heraufregulation am Zellzyklus beteiligter Gene die für einen schnelleren Übergang von der G₁- zur S-Phase verantwortlich waren und zudem eine Herunterregulation von Apoptose-beteiligter Gene wie Caspase-7. Analog führte die Hemmung der TFF3-Expression mittels *Antisense*-Molekül in einer Magenkarzinomzelllinie zu einem verringerten Zellwachstum und einer reduzierten Tumorigenität (36). Dahingegen wiesen wiederum TFF3-transfizierte Kolonkarzinomzellen in-vitro und in-vivo ebenfalls ein reduziertes Zellwachstum auf (218).

Um die Wirkung von TFF3 im Rahmen dieser Arbeit in endometrialen Zellen zu untersuchen, wurden Stimulationsversuche in ECC-1-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TFF3 durchgeführt. Zur Simulation der inflammatorischen Umgebung ektooper Läsionen erfolgte zusätzlich eine Kostimulation mit TNF α . In der vorliegenden Arbeit konnte durch TFF3 alleine kein Effekt auf die Proliferation oder Apoptose beobachtet werden. Dafür war eine geringfügig verbesserte Viabilität der Zellen zu erkennen. Auffallend war, dass sowohl Viabilität als auch Proliferation der endometrialen Zellen bei einer gleichzeitigen Stimulation mit TNF α rapide absanken. Dieser Effekt nahm mit steigender TFF3-Konzentration sowie mit der Zeit deutlich zu. TFF3 schien demnach die Wirkung von TNF α zu verstärken.

Verschiedene Autoren zeigten zudem, dass TFF3 in der Lage war, die Expression von E-Cadherin herunterzuregulieren und über eine indirekte Aktivierung des EGF-Rezeptors die Phosphorylierung von β -Catenin zu bewirken (60, 132, 144). Beides führt zu einer Destabilisierung des Zelladhäsionskomplex und ermöglicht somit vermutlich eine Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte. Um diesen Effekt auch in endometrialen Zellen zu untersuchen, wurde die Genexpression von Zelladhäsionsproteinen nach TFF3-Stimulation untersucht. Weder für E-Cadherin, noch für α -, β oder γ -zeigte sich eine signifikante Veränderung der mRNA-Konzentration. Stattdessen war die Expression von Adenomatous polyposis coli (APC) durch TFF3-Stimulation signifikant herunterreguliert. APC ist ein wichtiges Protein im Rahmen des Wnt-Signalwegs. Es ist Teil des Degradationskomplex, welcher freies β -Catenin dem Proteasom zum Abbau zuführt (siehe auch Abbildung 1.3 auf Seite 10). Durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs wird der Degradationskomplex inhibiert und überschüssiges β -Catenin wandert in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktor für an der Migration und Proliferation beteiligter Gene zu agieren (42). Die beobachtete Herunterregulation von APC könnte eine unvollständige Ausbildung des Degradationskomplex bedingen und somit eine unkontrollierte Aktivierung des Wnt-Signalwegs bewirken.

4.2 TFF3 und seine potenzielle Beteiligung an der Pathogenese der Endometriose

Die genaue Entstehung der Endometriose konnte bis heute nicht geklärt werden. Als am weitesten verbreitet gilt die Transplantationstheorie nach Sampson (180), welche besagt, dass abgelöste vitale Endometriumszellen durch retrograde Menstruation in den Bauchraum gelangen und dort aufgrund immunologischer Veränderungen an das Peritoneum adhären (siehe auch Abbildung 4.1). Basierend auf dieser Theorie sind Migration, Adhäsion, Invasion, Proliferation und Neoangiogenese entscheidende Faktoren bei der Entstehung endometriotischer Läsionen. Daneben spielt auch das Immunsystem eine wichtige Rolle.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Verbindung mit bekannter Literatur, liegt die Vermutung nahe, dass TFF3 durch seine multiplen Eigenschaften in vielerlei Hinsicht in diese Prozesse involviert ist. Abbildung 4.1 zeigt die potenzielle Beteiligung von TFF3 an Migration, Invasion, Neoangiogenese und Immunmodulation im Rahmen der Pathogenese von Endometriose und soll zudem im Folgenden zusammenfassend erläutert werden.

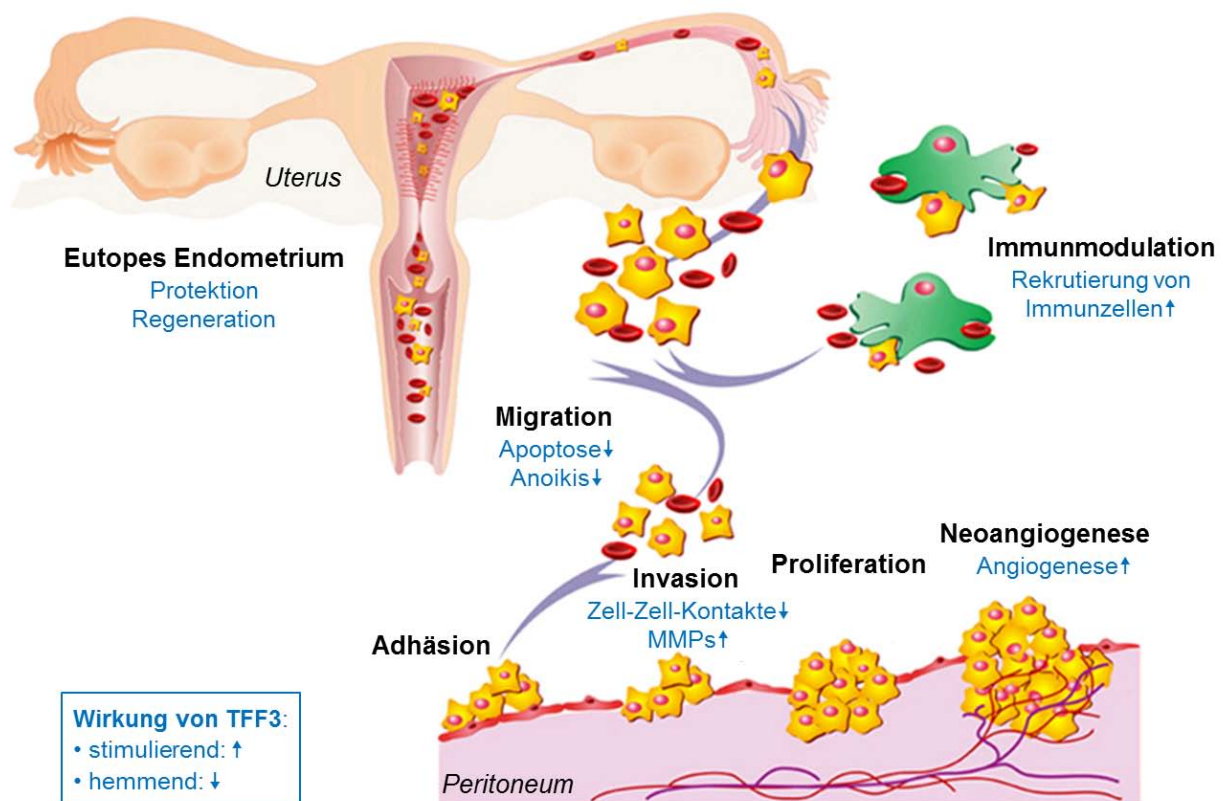


Abbildung 4.1: TFF3 im Uterus und seine potenzielle Beteiligung an der Pathogenese der Endometriose (Abb. modifiziert nach (135)). TFF3 ist vermutlich in der Lage, die Migration vitaler Endometriumszellen im Rahmen der retrograden Menstruation zu begünstigen und ihre Invasion in das Peritoneum sowie die Neoangiogenese zu unterstützen. Zudem erfolgt durch TFF3 womöglich eine Immunmodulation mit verstärkter Rekrutierung von Immunzellen.

Physiologische Funktion von TFF3 in eutopem Endometrium

In Epithelzellen des eutopen Endometriums wird TFF3 zyklusabhängig gemeinsam mit MUC5B sezerniert. Es ist vermutlich für die Integrität und den Schutz der endometrialen und zervikalen Mukosa verantwortlich sowie für die viskoelastischen Eigenschaften des zervikalen Mukus. Zudem ist TFF3 aufgrund der lokalen und systemischen Heraufregulation während der proliferativen Phase wahrscheinlich an der Regeneration des Endometriums im Rahmen des Menstruationszyklus beteiligt.

Migration – Retrograde Menstruation

Während der Menstruation kommt es zur Ablösung endometrialer Zellfragmente, die retrograd in den Peritonealraum wandern. Zahlreiche Publikationen beschreiben eine TFF3-vermittelte Induktion der Zellmigration im Rahmen gastrointestinaler Wundheilung mit gleichzeitiger Hemmung von Apoptose und Anoikis. Auch die ektopen Endometriumszellen könnten von dieser Wirkung durch TFF3 profitieren und ein vorzeitiges Absterben verhindern.

Adhäsion an das Peritoneum

Das Mesothel stellt normalerweise eine natürliche Barriere gegenüber Adhäsion und Invasion ektoper Endometriumszellen dar. Inflammatorische Prozesse, die Exposition von Menstruationsblut oder auch endometriales Gewebe selbst können eine Schädigungen des empfindlichen Epithels bewirken und ein Anhaften begünstigen (52). Die Adhäsion an sich wird vermutlich über Integrine vermittelt, welche in der Lage sind, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte auszubilden (220). Exprimiert werden Integrine sowohl auf Mesothel- als auch auf endometrialen Zellen (97). Zudem wird eine durch Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion der endometrialen Zellen mit dem Mesothel diskutiert (220). TFF3 scheint keinen adhäsionsfördernden Einfluss auf Endometriums- und Mesothelzellen auszuüben. Im Gegenteil, TFF3 bewirkt vielmehr eine Auflösung bereits bestehender Zell-Zell-Kontakte, was bedeutend für die nachfolgende Invasion ist.

Invasion in das Peritoneum

Um implantierte Läsionen ausbilden zu können, müssen adhärierte Endometriumszellen neben dem Mesothel die Basalmembran durchdringen. Diese befindet sich unter der Mesothelschicht und grenzt das Epithel von dem darunter liegenden Zellverbund ab. TFF3 besitzt modulierende Eigenschaften auf Zelladhäsionsmoleküle (E-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin, APC), die für den Zellverbund insbesondere von epithelialen Zellen verantwortlich sind. Durch Herunterregulation oder Phosphorylierung der genannten Proteine erfolgt eine Destabilisierung des Zelladhäsionskomplexes. Dies führt zu einer Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte im Mesothel und induziert somit das Vorstoßen zur Basalmembran (37). Um diese zu durchdringen, sind proteolytische Enzyme wie die MMPs notwendig, die für den Umbau der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. In-vitro-konnte durch TFF3-Stimulation eine erhöhte Produktion der MMPs nachgewiesen werden. Zudem wurde ein gesteigertes invasives Wachstum beobachtet (37, 62, 240).

Proliferation endometriotischer Zellen

Ob TFF3 einen Einfluss auf die Zellproliferation hat, ist aufgrund widersprüchlicher Daten unklar. Vermutlich ist die Beobachtung eines gesteigerten Wachstums meist auf eine durch TFF3 verringerte Apoptose zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit konnte nur eine geringfügig verbesserte Viabilität und Proliferation in endometrialen Zellen beobachtet werden, während andere Publikationen einen positiven, negativen bzw. gar keinen Effekt durch TFF3 auf die Zellproliferation zeigten (36, 106, 218).

Neoangiogenese in endometriotischen Läsionen

Kleine Zellverbände ektooper endometriotischer Zellen sind in der Lage, sich durch Diffusion mit den notwendigen Nährstoffen zu versorgen. Größere Implantate ab 1 mm^3 hingegen sind zum Überleben auf die Bildung neuer Blutgefäße angewiesen (64). Als wichtigster und in der Peritonealflüssigkeit erkrankter Frauen erhöhter Angiogenesefaktor ist VEGF zu nennen. Er aktiviert Endothelzellen bereits vorhandener Blutgefäße, welche dadurch beginnen sich zu teilen und proteolytische Enzyme wie MMPs zu produzieren. Anschließend erfolgt die Migration der Endothelzellen in Richtung des Stimulus mit Entstehung neuer kapillarer Blutgefäße. Neben VEGF existieren noch zahlreiche weitere Angiogenesefaktoren, wie z. B. IL-8, EGF, Angiopoietin und $\text{TNF}\alpha$. Die Expression der Angiogenesefaktoren wird genauso wie die von TFF3 durch hypoxische Zustände und Aktivierung der HIFs stimuliert. Im HET-CAM-Assay (Hühnereitest an der Chorion-Allantois-Membran) wurde für TFF3 eine dosisabhängige pro-angiogene Wirkung beschrieben, die mit der von VEGF vergleichbar war (175). Diese für die Wundheilung wichtige Eigenschaft, würde auch die Versorgung von Endometriuszellen nach erfolgter Implantation unterstützen.

Immunmodulation

Durch TFF3 wird in-vitro eine gesteigerte Monozytenmigration beschrieben (45). Zudem wiesen in der vorliegenden Arbeit die TFF3-Spiegel in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose eine hochsignifikante Korrelation mit MCP-1 und G-CSF auf. TFF3 könnte demnach immunmodulatorische Eigenschaften aufweisen und in der Endometriose an der Leukozytenrekrutierung beteiligt sein.

4.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigte zum einen die Expression von TFF3 in eutopem und ektopem Endometrium und zum anderen Hinweise für eine mögliche Beteiligung von TFF3 an der Entstehung der Endometriose.

Aufbauend auf den gezeigten Daten sind jedoch weiterführende Studien notwendig, um die Rolle von TFF3 in der Endometriose genauer zu studieren. Zu Beginn sollte insbesondere überprüft werden, ob auch Mesothelzellen in der Lage sind, TFF3 zu exprimieren. Dies ist notwendig, um zu klären ob die erhöhten TFF3-Spiegel allein auf die Sezernierung durch endometriotische Läsionen oder durch den inflammatorischen Stimulus auch auf Mesothelzellen zurückzuführen ist. Von Interesse ist außerdem, ob TFF3 in tief infiltrierender Endometriose verstärkt exprimiert wird. In invasiven und infiltrierenden Brust- und Magenkarzinomen konnte eine deutlich höhere TFF3-Expression nachgewiesen werden als in anderen Formen (106, 234). Des Weiteren sollte sowohl im eutopen als auch im ektopen Endometrium die zyklusabhängige Expression von TFF3, insbesondere während der prämenstruellen Phase sowie der Menstruation, untersucht werden. Dies ist wichtig, um festzustellen ob TFF3 auch bei Prozessen während der Menstruation im eutopen Endometrium eine Rolle spielt. In einem experimentellen Endometriosemodell mit TFF3-Knockout-Mäusen könnte zudem untersucht werden, inwiefern sich die Implantation des endometrialen Gewebes im Vergleich zum Wildtyp verhält. Daraus würden wichtige Erkenntnisse über die Beteiligung von TFF3 an der Invasion und Neoangiogenese von endometrialem Gewebe gewonnen werden.

Da die Entstehung und Entwicklung der Endometriose bis heute nur unzureichend geklärt ist, sind die neuen Daten zu TFF3 vor allem für das Verständnis der pathophysiologischen Prozesse von großer Bedeutung. Darüber hinaus könnten die neu gewonnenen Erkenntnisse für die Entwicklung zukünftiger Therapieansätze eine Rolle spielen.

Zusammenfassung

Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen und betrifft im Durchschnitt jede zehnte Frau im reproduktiven Alter. Sie wird definiert als das Vorkommen von endometrialen Stroma- und Epithelzellen außerhalb der Gebärmutter. Bis heute ist die genaue Ursache und Pathophysiologie noch nicht gänzlich geklärt.

Trefoil Factor 3 (TFF3) ist ein Protein, welches für den Schutz und die Regeneration der gastrointestinalen Mukosa mitverantwortlich ist. TFF3 wird auch in anderen Schleimhautepithelien exprimiert, wie z. B. in der Brust oder dem Uterus. Pathologisch wird es bei inflammatorischen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts sowie in verschiedenen Tumoren als heraufreguliert beschrieben.

Bisher liegen keine Daten zu TFF3 in der Endometriose vor. Die in der Literatur beschriebenen anti-apoptischen, pro-invasiven und pro-angiogenen Eigenschaften lassen eine Beteiligung an den pathophysiologischen Prozessen bei der Entstehung und Entwicklung von Endometriose vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression und Regulation von TFF3 in klinischer und experimenteller Endometriose untersucht und seine mögliche Beteiligung an der Pathogenese diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels histologischer Methoden die TFF3-Expression in Epithelzellen des eutopen Endometriums sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Erstmals wurde die Expression in endometriotischen Läsionen der Endometriose gezeigt. Bei der Untersuchung von Peritonealfüssigkeiten war die TFF3-Konzentration in Frauen mit Endometriose ($n = 34$) signifikant höher als in Frauen ohne der Erkrankung ($n = 16$). Die erhöhten TFF3-Level korrelierten mit weiteren, ebenso heraufregulierten Proteinen: CA 125 – einem bekannten Tumor- und Endometriosemarker, IL-8 – einem pro-inflammatorischen und pro-angiogenen Zytokin, MMP-7 – einem am Gewebeumbau beteiligten proteolytischen Enzym sowie MCP-1 und G-CSF – zwei an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligten Faktoren.

Im Serum von Frauen mit Endometriose ($n = 75$) war keine Erhöhung der TFF3-Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrolle ($n = 42$) messbar. Dafür zeigte sich eine signifikante zyklusabhängige Regulation der systemischen TFF3-Spiegel während des Menstruationszyklus. Die höchsten Werte wurden dabei in der proliferativen und in der späten sekretorischen Phase detektiert, während die niedrigsten TFF3-Konzentrationen am ersten Tag der Menstruation und drei Tage nach der Ovulation während der frühen sekretorischen Phase zu messen waren.

Für weitere Untersuchungen wurde in einem In-vivo-Modell Endometriose durch syngene

Transplantation von Uterusfragmenten an das Peritoneum von C57BL/6-Mäusen induziert. Immunhistologische Studien zeigten zu allen Sektionszeitpunkten (2, 4, 8 bzw. 14 Wochen) die Expression von TFF3 in den endometriotischen Läsionen und Uteri der Tiere. In den Peritoneallavagen waren die TFF3-Konzentrationen zu frühen Zeitpunkten (2 und 4 Wochen nach Transplantation) signifikant erhöht. Die heraufregulierten TFF3-Spiegel korrelierten mit Markern für systemische Inflammation wie Milzgewicht und Akute-Phase-Proteinen (SAP, SAA-3, Haptoglobin).

In endometrialen ECC-1-Zellen konnte durch Stimulation mit 17β -Estradiol nach 2 h eine signifikant erhöhte Genexpression von TFF3 gemessen werden. Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ führte nach 24 h zu einer signifikanten Herunterregulation von TFF3-mRNA. Die Stimulation mit rekombinatem TFF3 führte in ECC-1-Zellen zu einer erniedrigten Expression von Adenomatous polyposis coli (APC), während die von E-Cadherin und den Cateninen unverändert blieb. Die TFF3-Stimulation führte zu einer verbesserten Zellviabilität während es bei Kostimulation mit $\text{TNF}\alpha$ dessen pro-apoptische Wirkung signifikant verstärkte.

Die vorliegende Arbeit liefert erstmalig Hinweise dafür, dass TFF3 an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sein könnte. Nach der Transplantationstheorie von Sampson entsteht Endometriose durch retrograde Menstruation mit der Migration vitaler Endometriumszellen in den Bauchraum und ihrer Implantation in das Peritoneum. TFF3 weist eine Vielzahl von Eigenschaften auf, die die Migration, Invasion und Neoangiogenese von Endometriumszellen begünstigen könnten. Auch eine Beteiligung von TFF3 an der Immunmodulation durch Leukozytenrekutierung ist denkbar. Die neugewonnen Erkenntnisse dieser Arbeit tragen insgesamt zum Verständnis pathophysiologischer Prozesse in der Endometriose bei und könnten für die Entwicklung zukünftiger Therapieansätze von Bedeutung sein.

Summary

Endometriosis is a chronic gynecological disease, characterized by endometrial tissue outside the uterus. It affects 10 % of women during reproductive age. The pathogenesis and pathophysiology of this disease is still unsolved. Trefoil factor 3 (TFF3) is a peptide involved in the protection and regeneration of the small and large intestinal epithelia. In a smaller amount it is also expressed from a various amount of mucous epithelia, like in the breast or the uterus. It is pathologically elevated in a wide range of human carcinomas and gastrointestinal inflammatory conditions. Until today, nothing is known about the expression and regulation of TFF3 in endometriosis. Literature data describes anti-apoptotic, pro-invasive and pro-angiogenic effects of TFF3. Therefore, TFF3 might be involved in the pathogenesis and progression of endometriosis. The aim of this study was to examine whether TFF3 is expressed and regulated in clinical and experimental endometriosis and if it plays a role in the development of this disease.

Using immunohistochemistry and in situ hybridization TFF3 was localized in glandular epithelia cells of eutopic endometrium. For the first time TFF3 expression in endometriotic lesions was shown. In peritoneal fluids of women with endometriosis TFF3 concentrations were significantly elevated and correlated with regulated factors, such as CA 125, IL-8, MMP-7, MCP-1 and G-CSF. TFF3 serum levels showed no difference between endometriosis patients and controls but revealed a significant cycle dependency throughout the menstrual cycle of women with highest levels in proliferative and late secretory phase.

In an experimental mouse model for endometriosis TFF3 expression was shown in endometriotic lesions and uteri using immunohistochemistry. TFF3 levels in peritoneal lavages of mice were significantly increased during early stages. Elevated TFF3 values correlated with systemic parameters for inflammation such as spleen size and acute phase proteins in serum.

In endometrial ECC-1 cells TFF3 expression was upregulated by stimulation with estradiol and downregulated by $\text{TNF}\alpha$. Incubation with recombinant TFF3 led to decreased expression of adenomatous polyoma catenin (APC), while the expression of E-cadherin and catenins remained unchanged. TFF3 improved cell viability, whereas in combination with $\text{TNF}\alpha$ it augmented apoptotic effects.

This study indicates for the first time a potential role for TFF3 in the pathogenesis of endometriosis. Regarding transplantation theory, endometriosis is a result of retrograde menstruation including the migration of vital endometrial cells into the peritoneal cavity and their implantation at ectopic sites. Based on the expression and regulation in endometriosis shown in this

DISKUSSION

study, combined with its functions described in previous publications, TFF3 seems to be involved in migration, invasion and neoangiogenesis of endometrial cells as well as in immunomodulation. In conclusion, the findings of this study contribute to the understanding of pathophysiological processes in endometriosis and might be of relevance for the development of future therapeutic approaches.

Literaturverzeichnis

- [1] Abrao M.S., Podgaec S., Filho B.M., Ramos L.O., Pinotti J.A., de Oliveira R.M. (1997). The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod*, 12, 2523-2527.
- [2] Advanced Cell Diagnostics (2013). User Manual PART 2. RNAscope® 2.0 HD Detection Kit (BROWN).
- [3] Agic A., Xu H., Finas D., Banz C., Diedrich K., Hornung D. (2006). Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol Obstet Invest*, 62, 139-147.
- [4] Aikou S., Ohmoto Y., Gunji T., Matsushashi N., Ohtsu H., Miura H., Kubota K., Yamagata Y., Seto Y., Nakajima A., Goldenring J.R., Kaminishi M., Nomura S. (2011). Tests for serum levels of trefoil factor family proteins can improve gastric cancer screening. *Gastroenterology*, 141, 837-845 e831-837.
- [5] Akoum A., Lemay A., McColl S., Turcot-Lemay L., Maheux R. (1996). Elevated concentration and biologic activity of monocyte chemotactic protein-1 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 66, 17-23.
- [6] Amaral V.F., Ferriani R.A., Sa M.F., Nogueira A.A., Rosa e Silva J.C., Rosa e Silva A.C., Moura M.D. (2006). Positive correlation between serum and peritoneal fluid CA-125 levels in women with pelvic endometriosis. *Sao Paulo Med J*, 124, 223-227.
- [7] Arici A. (2002). Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 955, 101-109; discussion 118, 396-406.
- [8] Arici A., Oral E., Attar E., Tazuke S.I., Olive D.L. (1997). Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril*, 67, 1065-1072.
- [9] Arici A., Seli E., Zeyneloglu H.B., Senturk L.M., Oral E., Olive D.L. (1998). Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1201-1205.
- [10] Attar E., Bulun S.E. (2006). Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update*, 12, 49-56.
- [11] Balcer-Kubiczek E.K., Harrison G.H., Xu J.F., Gutierrez P.L. (2002). Coordinate late expression of trefoil peptide genes (pS2/TFF1 and ITF/TFF3) in human breast, colon, and gastric tumor cells exposed to X-rays. *Mol Cancer Ther*, 1, 405-415.
- [12] Barbati A., Cosmi E.V., Spaziani R., Ventura R., Montanino G. (1994). Serum and peritoneal fluid CA-125 levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 61, 438-442.
- [13] Barrier B.F., Sharpe-Timms K.L. (2002). Expression of soluble adhesion molecules in sera of women with stage III and IV endometriosis. *J Soc Gynecol Investig*, 9, 98-101.
- [14] Baus-Loncar M., Giraud A.S. (2005). Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2921-2931.
- [15] Becherer E., Schindler A. E. (Hg) (2010). Endometriose. Ganzheitlich verstehen und behandeln - Ein Ratgeber. Kohlhammer Verlag. S.22.
- [16] Beck E.-G. (2005) Biokurs Abbildung <http://www.biokurs.de/skripten/bilder/menst3.gif>
- [17] Becker C.M., Wright R.D., Satchi-Fainaro R., Funakoshi T., Folkman J., Kung A.L., D'Amato R.J. (2006). A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol*, 168, 2074-2084.

- [18] Behrens J. (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, 18, 15-30.
- [19] Bergqvist A., Ferno M. (1993). Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison according to localization and recurrence. *Fertil Steril*, 60, 63-68.
- [20] Bergqvist A., Bruse C., Carlberg M. and Carlstrom K. (2001). Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril*, 75, 489-495.
- [21] Berno V., Amazit L., Hinojos C., Zhong J., Mancini M.G., Sharp Z.D. and Mancini M.A. (2008). Activation of estrogen receptor-alpha by E2 or EGF induces temporally distinct patterns of large-scale chromatin modification and mRNA transcription. *PLoS One*, 3, e2286.
- [22] Bignotti E., Ravaggi A., Tassi R.A., Calza S., Rossi E., Falchetti M., Romani C., Bandiera E., Odicino F.E., Pecorelli S., Santin A.D. (2008). Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *Br J Cancer*, 99, 768-773.
- [23] Bio-Rad Laboratories (2013). Principles of Bead-Based Multiplex Immunoassays. <http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/multiplex-immunoassays#2>.
- [24] Biovendor. Human Trefoil Factor 3 ELISA. Product Data Sheet ENG.001.A. http://www.biovendor.com/product/immunoassays/trefoil-factor-3-human-elisa/pdf/PDS_75_HTFF3E_ENG.001.A
- [25] BlueGene. Mouse Trefoil Factor 3 (TFF3) Elisa Kit. Manual. http://www.hoelzel-biotech.com/fileadmin/import/pdf/Bluegene/E03T0134__Manual.pdf
- [26] Borthwick J.M., Charnock-Jones D.S., Tom B.D., Hull M.L., Teirney R., Phillips S.C., Smith S.K. (2003). Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 9, 19-33.
- [27] Bulun S.E. (2009). Endometriosis. *N Engl J Med*, 360, 268-279.
- [28] Bulun S.E., Cheng Y.H., Yin P., Imir G., Utsunomiya H., Attar E., Innes J., Julie Kim J. (2006). Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, 248, 94-103.
- [29] Bulun S.E., Cheng Y.H., Pavone M.E., Xue Q., Attar E., Trukhacheva E., Tokunaga H., Utsunomiya H., Yin P., Luo X., Lin Z., Imir G., Thung S., Su E.J., Kim, J.J. (2010). Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med*, 28, 36-43.
- [30] Bulun S.E., Monsavaïs D., Pavone M.E., Dyson M., Xue Q., Attar E., Tokunaga H., Su, E.J. (2012). Role of estrogen receptor-beta in endometriosis. *Semin Reprod Med*, 30, 39-45.
- [31] Bussolino F., Wang J.M., Turrini F., Alessi D., Ghigo D., Costamagna C., Pescarmona G., Mantovani A., Bosia, A. (1989). Stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in human endothelial cells activated by granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. Evidence for a role in proliferation and migration. *J Biol Chem*, 264, 18284-18287.
- [32] Brandenberger A.W., Lebovic D.I., Tee M.K., Ryan I.P., Tseng J.F., Jaffe R.B., Taylor R.N. (1999). Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Mol Hum Reprod*, 5, 651-655.
- [33] Calhaz-Jorge C., Costa A.P., Santos M.C., Palma-Carlos M.L. (2003). Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in patients with endometriosis depend on the severity of the disorder and are higher in the luteal phase. *Hum Reprod*, 18, 593-597.
- [34] Cao X., Yang D., Song M., Murphy A., Parthasarathy S. (2004). The presence of endometrial cells in the peritoneal cavity enhances monocyte recruitment and induces inflammatory cytokines in mice: implications for endometriosis. *Fertil Steril*, 82 Suppl 3, 999-1007.
- [35] Casado-Vela J., Rodriguez-Suarez E., Iloro I., Ametzazurra A., Alkorta N., Garcia-Velasco J.A., Matorras R., Prieto B., Gonzalez S., Nagore D., Simon L., Elortza F. (2009). Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. *J Proteome Res*, 8, 4622-4632.

- [36] Chan M.W., Chan V.Y., Leung W.K., Chan K.K., To K.F., Sung J.J., Chan F.K. (2005). Anti-sense trefoil factor family-3 (intestinal trefoil factor) inhibits cell growth and induces chemosensitivity to adriamycin in human gastric cancer cells. *Life Sci*, 76, 2581-2592.
- [37] Chan V.Y., Chan M.W., Leung W.K., Leung P.S., Sung J.J., Chan F.K. (2005). Intestinal trefoil factor promotes invasion in non-tumorigenic Rat-2 fibroblast cell. *Regul Pept*, 127, 87-94.
- [38] Chen Y.H., Lu Y., De Plaen I.G., Wang L.Y., Tan X.D. (2000). Transcription factor NF-kappaB signals antianoinic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 274, 576-582.
- [39] Choi H.J., Chung Y.S., Kim H.J., Moon U.Y., Choi Y.H., Van Seuningen I., Baek S.J., Yoon H.G., Yoon J.H. (2009). Signal pathway of 17beta-estradiol-induced MUC5B expression in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40, 168-178.
- [40] Chung H.W., Wen Y., Choi E.A., Hao L., Moon H.S., Yu H.K., Polan M.L. (2002). Pleiotrophin (PTN) and midkine (MK) mRNA expression in eutopic and ectopic endometrium in advanced stage endometriosis. *Mol Hum Reprod*, 8, 350-355.
- [41] Chwieralski C.E., Schnurra I., Thim L., Hoffmann W. (2004). Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31, 528-537.
- [42] Clevers H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127, 469-480.
- [43] Cocco E., Bellone S., El-Sahwi K., Cargnelutti M., Buza N., Tavassoli F.A., Schwartz P.E., Rutherford T.J., Pecorelli S., Santin A.D. (2010). Serum amyloid A: a novel biomarker for endometrial cancer. *Cancer*, 116, 843-851.
- [44] Colacurci N., Fortunato N., De Franciscis P., Fratta M., Cioffi M., Zarccone R., Cardone A. (1996). Serum and peritoneal CA-125 levels as diagnostic test for endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 66, 41-43.
- [45] Cook G.A., Familiari M., Thim L., Giraud A.S. (1999). The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett*, 456, 155-159.
- [46] Cummings A.M., Metcalf J.L. (1995). Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol*, 9, 233-238.
- [47] Curry T.E., Jr., Osteen K.G. (2001). Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod*, 64, 1285-1296.
- [48] Curtis S.W., Washburn T., Sewall C., DiAugustine R., Lindzey J., Couse J.F., Korach K.S. (1996). Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12626-12630.
- [49] Daniel Y., Geva E., Amit A., Eshed-Englender T., Baram A., Fait G., Lessing J.B. (2000). Do soluble cell adhesion molecules play a role in endometriosis? *Am J Reprod Immunol*, 43, 160-166.
- [50] Defrere S., Donnez J., Moulin P., Befahy P., Gonzalez-Ramos R., Lousse J.C., Van Langendonck A. (2008). Expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human endometrial stromal and epithelial cells is regulated by interferon-gamma but not iron. *Gynecol Obstet Invest*, 65, 145-154.
- [51] Delvoux B., Groothuis P., D'Hooghe T., Kyama C., Dunselman G., Romano A. (2009). Increased production of 17beta-estradiol in endometriosis lesions is the result of impaired metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 876-883.
- [52] Demir Weusten A.Y., Groothuis P.G., Dunselman G.A., de Goeij A.F., Arends J.W., Evers J.L. (2000). Morphological changes in mesothelial cells induced by shed menstrual endometrium in vitro are not primarily due to apoptosis or necrosis. *Hum Reprod*, 15, 1462-1468.
- [53] D'Hooghe T.M., Bambra C.S., Suleman M.A., Dunselman G.A., Evers H.L., Koninckx P.R. (1994). Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril*, 62, 635-638.
- [54] D'Hooghe T.M., Bambra C.S., Raeymaekers B.M., Hill J.A. (1999). Pelvic inflammation induced by diagnostic laparoscopy in baboons. *Fertil Steril*, 72, 1134-1141.

- [55] D'Hooghe T.M., Bambra C.S., Xiao L., Peixe K., Hill J.A. (2001). Effect of menstruation and intrapelvic injection of endometrium on inflammatory parameters of peritoneal fluid in the baboon (*Papio anubis* and *Papio cynocephalus*). *Am J Obstet Gynecol*, 184, 917-925.
- [56] Diel P., Schmidt S., Vollmer G. (2002). In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777, 191-202.
- [57] Dignass A., Lynch-Devaney K., Kindon H., Thim L., Podolsky D.K. (1994). Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest*, 94, 376-383.
- [58] Du T.Y., Luo H.M., Qin H.C., Wang F., Wang Q., Xiang Y., Zhang Y. (2013). Circulating Serum Trefoil Factor 3 (TFF3) Is Dramatically Increased in Chronic Kidney Disease. *PLoS One*, 8, e80271.
- [59] Ebert AD. (2011) Endometriose: Ein Wegweiser für die Praxis. De Gruyter.
- [60] Efstathiou J.A., Noda M., Rowan A., Dixon C., Chinery R., Jawhari A., Hattori T., Wright N.A., Bodmer W.F., Pignatelli M. (1998). Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3122-3127.
- [61] Elnor S.G., Strieter R.M., Elnor V.M., Rollins B.J., Del Monte M.A., Kunkel S.L. (1991). Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human retinal pigment epithelial cells. *Lab Invest*, 64, 819-825.
- [62] Emami S., Le Floch N., Bruyneel E., Thim L., May F., Westley B., Rio M., Mareel M., Gaspach C. (2001). Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J*, 15, 351-361.
- [63] Emami S., Rodrigues S., Rodrigue C.M., Le Floch N., Rivat C., Attoub S., Bruyneel E., Gaspach C. (2004). Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides*, 25, 885-898.
- [64] Evers J.L., Dunselman G.A., Groothuis P. (2005). Now you see them, now you don't. *Fertil Steril*, 84, 31-32; discussion 38-39.
- [65] Eyles J.L., Roberts A.W., Metcalf D., Wicks I.P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2, 500-510.
- [66] Fazleabas A.T., Brudney A., Gurates B., Chai D., Bulun S. (2002). A modified baboon model for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 955, 308-317; discussion 340-302, 396-406.
- [67] Fisk N.M., Tan C.E. (1988). CA 125 in peritoneal fluid and serum of patients with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 29, 153-158.
- [68] Foster W.G., Ruka M.P., Gareau P., Foster R.A., Janzen E.G., Yang J.Z. (1997). Morphologic characteristics of endometriosis in the mouse model: application to toxicology. *Can J Physiol Pharmacol*, 75, 1188-1196.
- [69] Frixen U.H., Behrens J., Sachs M., Eberle G., Voss B., Warda A., Lochner D., Birchmeier W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 113, 173-185.
- [70] Fujimoto J., Ichigo S., Hori M., Tamaya T. (1996). Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol*, 10, 187-191.
- [71] Furuta G.T., Turner J.R., Taylor C.T., Hershberg R.M., Comerford K., Narravula S., Podolsky D.K., Colgan S.P. (2001). Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med*, 193, 1027-1034.
- [72] Gaetje R., Kotzian S., Herrmann G., Baumann R., Starzinski-Powitz A. (1997). Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol*, 150, 461-467.
- [73] Gazvani M.R., Christmas S., Quenby S., Kirwan J., Johnson P.M., Kingsland C.R. (1998). Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to stage of disease. *Hum Reprod*, 13, 1957-1961.

- [74] Gipson I.K., Moccia R., Spurr-Michaud S., Argueso P., Gargiulo A.R., Hill J.A., 3rd, Offner G.D., Keutmann H.T. (2001). The Amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 594-600.
- [75] Göretzlehner G., Göretzlehner U. (2008). Orale Kontrazeptiva und Langzyklus bei Endometriose. *J Gynäkol Endokrinol* 2:27-31.
- [76] Grønbaek H., Vestergaard E.M., Hey H., Nielsen J.N., Nexø E. (2006). Serum trefoil factors in patients with inflammatory bowel disease. *Digestion*, 74, 33-39.
- [77] Grosskinsky C.M., Halme J. (1993). Endometriosis: the host response. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 7, 701-713.
- [78] Grümmer R. (2006). Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update*, 12, 641-649.
- [79] Grümmer R., Schwarzer F., Bainczyk K., Hess-Stumpp H., Regidor P.A., Schindler A.E., Winterhager E. (2001). Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod*, 16, 1736-1743.
- [80] Halis G., Mechsner S., Ebert, A. D. (2010) Diagnose und Therapie der tief-infiltrierenden Endometriose. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 446-55.
- [81] Halme J., Becker S., Wing R. (1984). Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 148, 85-90.
- [82] Halme J., Hammond M.G., Hulka J.F., Raj S.G., Talbert L.M. (1984). Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*, 64, 151-154.
- [83] Han G., Sidhu D., Duggan M.A., Arseneau J., Cesari M., Clement P.B., Ewanowich C.A., Kalloger S.E., Kobel M. (2013). Reproducibility of histological cell type in high-grade endometrial carcinoma. *Mod Pathol*, 26, 1594-1604.
- [84] Harada T., Kubota T., Aso T. (2002). Usefulness of CA19-9 versus CA125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril*, 78, 733-739.
- [85] Haroun S., Altmae S., Kuningas M., Stavreus-Evers A. (2013). The association of trefoil factor 3 gene polymorphisms and haplotypes with unexplained female infertility: Molecular insights into TFF3 regulation in receptive phase endometrium. *Hum Fertil (Camb)*, 16, 291-298.
- [86] Harris T.J. (2012). An introduction to adherens junctions: from molecular mechanisms to tissue development and disease. *Subcell Biochem*, 60, 1-5.
- [87] Hartung T., Doecke W.D., Gantner F., Krieger G., Sauer A., Stevens P., Volk H.D., Wendel A. (1995). Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood*, 85, 2482-2489.
- [88] Hauser F., Poulson R., Chinery R., Rogers L.A., Hanby A.M., Wright N.A., Hoffmann W. (1993). hP1.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6961-6965.
- [89] Herington J.L., Bruner-Tran K.L., Lucas J.A., Osteen K.G. (2011). Immune interactions in endometriosis. *Expert Rev Clin Immunol*, 7, 611-626.
- [90] Hernandez C., Santamatilde E., McCreath K.J., Cervera A.M., Diez I., Ortiz-Masia D., Martinez N., Calatayud S., Esplugues J.V., Barrachina M.D. (2009). Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *Br J Pharmacol*, 156, 262-272.
- [91] Hill J.A. (1997). Immunology and endometriosis. Fact, artifact, or epiphenomenon? *Obstet Gynecol Clin North Am*, 24, 291-306.
- [92] Hoffmann W., Jagla W., Wiede A. (2001). Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol*, 16, 319-334.
- [93] Hoffmann W., Jagla W. (2002). Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol*, 213, 147-181.

- [94] Huang J.C., Papasakelariou C., Dawood M.Y. (1996). Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 65, 931-934.
- [95] Huang Y.G., Li Y.F., Wang L.P., Zhang Y. (2013). Aberrant expression of trefoil factor 3 is associated with colorectal carcinoma metastasis. *J Cancer Res Ther*, 9, 376-380.
- [96] Hudelist G., Singer C.F., Keckstein J. (2005). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Bedeutung für die Menstruation und Endometriose. *Zentralbl Gynakol.*, 127(5), 320-4.
- [97] Hull M.L., Escareno C.R., Godsland J.M., Doig J.R., Johnson C.M., Phillips S.C., Smith S.K., Tavare S., Print C.G., Charnock-Jones D.S. (2008). Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment. *Am J Pathol*, 173, 700-715.
- [98] Ignar-Trowbridge D.M., Nelson K.G., Bidwell M.C., Curtis S.W., Washburn T.F., McLachlan J.A., Korach K.S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4658-4662.
- [99] Ismail M.A., Rotmensch J., Mercer L.J., Block B.S., Salti G.I., Holt J.A. (1994). CA-125 in peritoneal fluid from patients with nonmalignant gynecologic disorders. *J Reprod Med*, 39, 510-512.
- [100] Iwabe T., Harada T., Tsudo T., Nagano Y., Yoshida S., Tanikawa M., Terakawa N. (2000). Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 824-829.
- [101] Jacobson T.Z., Duffy J.M., Barlow D., Koninckx P.R., Garry R. (2009). Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001300.
- [102] Jänne O., Kauppila A., Kokko E., Lantto T., Ronnberg L., Vihko R. (1981). Estrogen and progesterin receptors in endometriosis lesions: comparison with endometrial tissue. *Am J Obstet Gynecol*, 141, 562-566.
- [103] Jensen P.O., Moser C., Kharazmi A., Presler T., Koch C., Hoiby N. (2006). Increased serum concentration of G-CSF in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Cyst Fibros*, 5, 145-151.
- [104] Jorgensen K.H., Thim L., Jacobsen H.E. (1982). Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept*, 3, 207-219.
- [105] Kaise M., Miwa J., Tashiro J., Ohmoto Y., Morimoto S., Kato M., Urashima M., Ikegami M., Tajiri H. (2011). The combination of serum trefoil factor 3 and pepsinogen testing is a valid non-endoscopic biomarker for predicting the presence of gastric cancer: a new marker for gastric cancer risk. *J Gastroenterol*, 46, 736-745.
- [106] Kannan N., Kang J., Kong X., Tang J., Perry J.K., Mohankumar K.M., Miller L.D., Liu E.T., Mertani H.C., Zhu T., Grandison P.M., Liu D.X., Lobie P.E. (2010). Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. *Neoplasia*, 12, 1041-1053.
- [107] Kao L.C., Tulac S., Lobo S., Imani B., Yang J.P., Germeyer A., Osteen K., Taylor R.N., Lessey B.A., Giudice L.C. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 143, 2119-2138.
- [108] Keenan J.A., Chen T.T., Chadwell N.L., Torry D.S., Caudle M.R. (1995). IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, 34, 381-385.
- [109] Khoufache K., Michaud N., Harir N., Kibangou Bondza P., Akoum A. (2012). Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review. *Minerva Endocrinol*, 37, 75-92.
- [110] Kim K.H., Park J.K., Choi Y.W., Kim Y.H., Lee E.N., Lee J.R., Kim H.S., Baek S.Y., Kim B.S., Lee K.S., Yoon S. (2013). Hexane extract of aged black garlic reduces cell proliferation and attenuates the expression of ICAM-1 and VCAM1 in TNF-alpha-activated human endometrial stromal cells. *Int J Mol Med*, 32, 67-78.
- [111] Kjellef S. (2009). The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1350-1369.
- [112] Knapp V. J. (1999) How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertil Steril* 72, 10-14.

- [113] Koeffler H.P., Gasson J., Ranyard J., Souza L., Shepard M., Munker R. (1987). Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 70, 55-59.
- [114] Kokorine I., Nisolle M., Donnez J., Eeckhout Y., Courtoy P.J., Marbaix E. (1997). Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril*, 68, 246-251.
- [115] Koninckx P.R., Renaer M., Brosens I.A. (1980). Origin of peritoneal fluid in women: an ovarian exudation product. *Br J Obstet Gynaecol*, 87, 177-183.
- [116] Koninckx P.R., Kennedy S.H., Barlow D.H. (1998). Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update*, 4, 741-751.
- [117] Konopka B., Skasko E., Kluska A., Goluda M., Janiec-Jankowska A., Paszko Z., Ujec M. (1998). Changes in the concentrations of receptors of insulin-like growth factor-I, epithelial growth factor, oestrogens and progestagens in adenomyosis foci, endometrium and myometrium of women during menstrual cycle. *Eur J Gynaecol Oncol*, 19, 93-97.
- [118] Krieglstein C.F., Cerwinka W.H., Laroux F.S., Grisham M.B., Schurmann G., Bruwer M., Granger D.N. (2001). Role of appendix and spleen in experimental colitis. *J Surg Res*, 101, 166-175.
- [119] Kupker W., Felberbaum R., Bauer O., Diedrich K. (1996). [Significance of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in endometriosis]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 56, 239-242.
- [120] Kurdoglu Z., Gursoy R., Kurdoglu M., Erdem M., Erdem O., Erdem A. (2009). Comparison of the clinical value of CA 19-9 versus CA 125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril*, 92, 1761-1766
- [121] Kyama C.M., Debrock S., Mwenda J.M., D'Hooghe T.M. (2003). Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 123.
- [122] Kyama C.M., Overbergh L., Debrock S., Valckx D., Vander Perre S., Meuleman C., Mihalyi A., Mwenda J.M., Mathieu C., D'Hooghe T.M. (2006). Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 85, 1667-1675.
- [123] Lanfrancone L., Boraschi D., Ghiara P., Falini B., Grignani F., Peri G., Mantovani A., Pelicci P.G. (1992). Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood*, 80, 2835-2842.
- [124] Langer G., Jagla W., Behrens-Baumann W., Walter S., Hoffmann W. (1999). Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 2220-2224.
- [125] Laschke M.W., Korbel C., Rudzitis-Auth J., Gashaw I., Reinhardt M., Hauff P., Zollner T.M., Menger M.D. (2010). High-resolution ultrasound imaging: a novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol*, 176, 585-593.
- [126] Le P.T., Muller M.T., Mortensen R.F. (1982). Acute phase reactants of mice. I. Isolation of serum amyloid P-component (SAP) and its induction by a monokine. *J Immunol*, 129, 665-672.
- [127] Lebovic D.I., Mueller M.D., Taylor R.N. (2001). Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 75, 1-10
- [128] Leiva M.C., Hasty L.A., Pfeifer S., Mastroianni L., Jr., Lyttle C.R. (1993). Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 168, 592-598.
- [129] Lermann J., Mueller A., Korber F., Oppelt P., Beckmann M.W., Dittrich R., Renner S.P. (2010). Evaluation of high-sensitivity C-reactive protein in comparison with C-reactive protein as biochemical serum markers in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 93, 2125-2129.
- [130] Lessey B.A., Metzger D.A., Haney A.F., McCarty K.S., Jr. (1989). Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy. *Fertil Steril*, 51, 409-415.

- [131] Lin Y.J., Lai M.D., Lei H.Y., Wing L.Y. (2006). Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*, 147, 1278-1286.
- [132] Liu D., el-Hariry I., Karayiannakis A.J., Wilding J., Chinery R., Kmiot W., McCrea P.D., Gullick W.J., Pignatelli M. (1997). Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab Invest*, 77, 557-563.
- [133] Liu D.T., Hitchcock A. (1986). Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol*, 93, 859-862.
- [134] Liu Y., Tu D., Zhu H., Ma E., Chen X. (2013). Lanthanide-doped luminescent nano-bioprobes: from fundamentals to biodetection. *Nanoscale*, 5, 1369-1384.
- [135] Lousse J.C., Van Langendonck A., Defrere S., Ramos R.G., Colette S., Donnez J. (2012). Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 23-40.
- [136] Madsen J., Nielsen O., Tornøe I., Thim L., Holmskov U. (2007). Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*, 55, 505-513.
- [137] Malhotra N., Karmakar D., Tripathi V., Luthra K., Kumar S. (2012). Correlation of angiogenic cytokines-leptin and IL-8 in stage, type and presentation of endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, 28, 224-227.
- [138] Mashimo H., Podolsky D.K., Fishman M.C. (1995). Structure and expression of murine intestinal trefoil factor: high evolutionary conservation and postnatal expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 210, 31-37.
- [139] Masiakowski P., Breathnach R., Bloch J., Gannon F., Krust A., Chambon P. (1982). Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res*, 10, 7895-7903.
- [140] Matarese G., Alviggi C., Sanna V., Howard J.K., Lord G.M., Carravetta C., Fontana S., Lechler R.I., Bloom S.R., De Placido G. (2000). Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2483-2487.
- [141] May F.E., Westley B.R. (1997). Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J Pathol*, 182, 404-413.
- [142] Meek R.L., Eriksen N., Benditt E.P. (1992). Murine serum amyloid A3 is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 7949-7952.
- [143] Meyer R. (1919). Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralblatt für Gynäkologie*, 43, 745-50.
- [144] Meyer zum Buschenfelde D., Hoschutzky H., Tauber R., Huber O. (2004). Molecular mechanisms involved in TFF3 peptide-mediated modulation of the E-cadherin/catenin cell adhesion complex. *Peptides*, 25, 873-883.
- [145] Mhaweche-Fauceglia P., Wang D., Samrao D., Liu S., DuPont N.C., Pejovic T. (2013). Trefoil factor family 3 (TFF3) expression and its interaction with estrogen receptor (ER) in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 130, 174-180.
- [146] Mhaweche-Fauceglia P., Yan L., Liu S., Pejovic T. (2013). ER+ /PR+ /TFF3+ /IMP3- immunoprofile distinguishes endometrioid from serous and clear cell carcinomas of the endometrium: a study of 401 cases. *Histopathology*, 62, 976-985.
- [147] Millipore (2011) Mouse Acute Phase Magnetic Bead Panel 1. Manual. <http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/9fb4d4fd6f5670a1852578b5006ce397/\protect\T1\textdollarFILE/MAP1MAG-76K.pdf>
- [148] Millipore (2011) Mouse Acute Phase Magnetic Bead Panel 2. Manual. <http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/5420f60fe6f85fac852578b5006c5898/\protect\T1\textdollarFILE/MAP2MAG-76K.MPX.pdf>
- [149] Missmer S.A., Hankinson S.E., Spiegelman D., Barbieri R.L., Malspeis S., Willett W.C., Hunter D.J. (2004). Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstet Gynecol*, 104, 965-974.

- [150] Missmer S.A., Hankinson S.E., Spiegelman D., Barbieri R.L., Marshall L.M., Hunter D.J. (2004). Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol*, 160, 784-796.
- [151] Mo B., Vendrov A.E., Palomino W.A., DuPont B.R., Apparao K.B., Lessey B.A. (2006). ECC-1 cells: a well-differentiated steroid-responsive endometrial cell line with characteristics of luminal epithelium. *Biol Reprod*, 75, 387-394.
- [152] Mol B.W., Bayram N., Lijmer J.G., Wiegerinck M.A., Bongers M.Y., van der Veen F., Bossuyt P.M. (1998). The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 70, 1101-1108.
- [153] Mutschler E., Geisslinger G. Krömer H.K., Ruth P. Schäfer-Korting M. (2008). *Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- [154] Neunhoffer E., Lawrenz B. (2011) *Arzneimitteltherapie 2011. Therapieoptionen der Endometriose*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 29, 35-41.
- [155] Nishida M., Nasu K., Narahara H. (2011). Role of chemokines in the pathogenesis of endometriosis. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 1196-1204.
- [156] Nisolle M., Casanas-Roux F., Donnez J. (2000). Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil Steril*, 74, 306-312.
- [157] Noble, L. S., K. Takayama, et al. (1997). Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82(2): 600-606.
- [158] Olikar A.J., Harris A.E. (1971). Endometriosis of the bladder in a male patient. *J Urol*, 106, 858-859.
- [159] Oral E., Olive D.L., Arici A. (1996). The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update*, 2, 385-398.
- [160] Oral E., Arici A. (1996). Peritoneal growth factors and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol*, 14, 257-267.
- [161] Osteen K.G., Yeaman G.R., Bruner-Tran K.L. (2003). Matrix metalloproteinases and endometriosis. *Semin Reprod Med*, 21, 155-164.
- [162] Otto W.R., Thim L. (2005). Trefoil factor family-interacting proteins. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2939-2946.
- [163] Perry J.K., Kannan N., Grandison P.M., Mitchell M.D., Lobie P.E. (2008). Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab*, 19, 74-81.
- [164] Pinkert T.C., Catlow C.E., Straus R. (1979). Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer*, 43, 1562-1567.
- [165] Pizzo A., Salmeri F.M., Ardita F.V., Sofo V., Tripepi M., Marsico S. (2002). Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, 54, 82-87.
- [166] Podolsky D.K., Lynch-Devaney K., Stow J.L., Oates P., Murgue B., De-Beaumont M., Sands B.E., Mahida Y.R. (1993). Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem*, 268, 12230.
- [167] Poulson R., Hanby A.M., Lalani E.N., Hauser F., Hoffmann W., Stamp G.W. (1997). Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol*, 183, 30-38.
- [168] Prentice A., Randall B.J., Weddell A., McGill A., Henry L., Horne C.H., Thomas E.J. (1992). Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: endometrium and peritoneal mesothelium. *Hum Reprod*, 7, 1318-1325.
- [169] Promega GmbH (2011). *Zellbasierte & Biochemische Assays von Promega*. http://www.promega.de/~media/files/promega%20worldwide/europe/promega%20germany/cba_pdf/1310_zellbasierte_assay_broschuere.pdf?la=de-DE.

- [170] Promega Corporation (2012). ApoLive-Glo™ Multiplex Assay – Technical Manual. <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/101/ApoLive-Glo%20Multiplex%20Assay%20Protocol.pdf>.
- [171] Qu Y., Yang Y., Ma D., Xiao W. (2012). Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol Rep*, 27, 1277-1283.
- [172] Rana N., Braun D.P., House R., Gebel H., Rotman C., Dmowski W.P. (1996). Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 65, 925-930.
- [173] Riley C.F., Moen M.H., Videm V. (2007). Inflammatory markers in endometriosis: reduced peritoneal neutrophil response in minimal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 86, 877-881.
- [174] Roche Diagnostics GnbH (2008). Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. Manual. http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf.
- [175] Rodrigues S., Van Aken E., Van Bocxlaer S., Attoub S., Nguyen Q.D., Bruyneel E., Westley B.R., May F.E., Thim L., Mareel M., Gespach C., Emami S. (2003). Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J*, 17, 7-16.
- [176] Rösler S., Haase T., Claassen H., Schulze U., Schicht M., Riemann D., Brandt J., Wohlrab D., Muller-Hilke B., Goldring M.B., Sel S., Varoga D., Garreis F., Paulsen F.P. (2010). Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 62, 815-825.
- [177] Rossi G., Somigliana E., Moschetta M., Santorsola R., Cozzolino S., Filardo P., Salmaso A., Zingrillo B. (2000). Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. *Arch Gynecol Obstet*, 263, 102-107.
- [178] Ryan I.P., Tseng J.F., Schriock E.D., Khorram O., Landers D.V., Taylor R.N. (1995). Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 63, 929-932.
- [179] Saito S., Fukunaga R., Ichijo M., Nagata S. (1994). Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor at the fetomaternal interface in murine and human pregnancy. *Growth Factors*, 10, 135-143.
- [180] Sampson J. (1927). Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 14, 422-469.
- [181] Samson M.H., Vestergaard E.M., Milman N., Poulsen S.S., Nexø E. (2008). Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest*, 68, 369-374.
- [182] Samson M.H., Chaiyarit P., Nortvig H., Vestergaard E.M., Ernst E., Nexø E. (2011). Trefoil factor family peptides in human saliva and cyclical cervical mucus. Method evaluation and results on healthy individuals. *Clin Chem Lab Med*, 49, 861-868.
- [183] Samson M.H. (2013). Quantitative measurements of trefoil factor family peptides: possibilities and pitfalls. *Scand J Clin Lab Invest*, 73, 193-202.
- [184] Sarma D., Iyengar P., Marotta T.R., terBrugge K.G., Gentili F., Halliday W. (2004). Cerebellar endometriosis. *AJR Am J Roentgenol*, 182, 1543-1546.
- [185] Satyaswaroop P.G., Zaino R.J., Mortel R. (1983). Human endometrial adenocarcinoma transplanted into nude mice: growth regulation by estradiol. *Science*, 219, 58-60.
- [186] Satyaswaroop P.G., Tabibzadeh S.S. (1991). Extracellular matrix and the patterns of differentiation of human endometrial carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 51, 5661-5666.
- [187] Schindler A.E., Foertig P., Kienle E., Regidor P.A. (2000). Early treatment of endometriosis with GnRH-agonists: impact on time to recurrence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 93, 123-125.
- [188] Schindler A.E. (2011). Dienogest in long-term treatment of endometriosis. *Int J Womens Health*, 3, 175-184.
- [189] Schweppe K.-W. (2005) Diagnostik und Therapie der Endometriose. *Frauenarzt*, 46, 373-81.

- [190] Schweppe K.-W. (2011) Endometriose – Entstehung, Diagnostik, Behandlungsmöglichkeiten und Probleme in Klinik und Praxis. *J Reproduktionsmed Endokrinol*, 8, 180-94.
- [191] Schweppe K.-W. (2013) Fortschritte in der medikamentösen Therapie der Endometriose. CME medipoint, Nürnberg. http://www.cme-medipoint.de/fortbildungen/Endometriose_CME.pdf.
- [192] Sharbati J. (2010) Mukosale Genexpression während der porcinen postnatalen Darmentwicklung und Einfluss einer Probiotikagabe. Online-Dissertation. Freie Universität Berlin. http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000007379/1_Diss_Sharbati.pdf?hosts=
- [193] Sharpe-Timms K.L., Piva M., Ricke E.A., Surewicz K., Zhang Y.L., Zimmer R.L. (1998). Endometriotic lesions synthesize and secrete a haptoglobin-like protein. *Biol Reprod*, 58, 988-994.
- [194] Sharpe-Timms K.L., Zimmer R.L., Ricke E.A., Piva M., Horowitz G.M. (2002). Endometriotic haptoglobin binds to peritoneal macrophages and alters their function in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 78, 810-819.
- [195] Siegmund B., Rieder F., Albrich S., Wolf K., Bidlingmaier C., Firestein G.S., Boyle D., Lehr H.A., Loher F., Hartmann G., Endres S., Eigler A. (2001). Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 296, 99-105.
- [196] Sillem M., Pifti S., Koch A., Neher M., Jauckus J., Runnebaum B. (2001). Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 95, 167-174.
- [197] Song M., Karabina S.A., Kavtaradze N., Murphy A.A., Parthasarathy S. (2003). Presence of endometrial epithelial cells in the peritoneal cavity and the mesothelial inflammatory response. *Fertil Steril*, 79 Suppl 1, 789-794.
- [198] Sozzani S., Locati M., Zhou D., Rieppi M., Luini W., Lamorte G., Bianchi G., Polentarutti N., Allavena P., Mantovani A. (1995). Receptors, signal transduction, and spectrum of action of monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. *J Leukoc Biol*, 57, 788-794.
- [199] Starzinski-Powitz A., Handrow-Metzmacher H., Kotzian S. (1999). The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis? *Mol Med Today*, 5, 304-309.
- [200] Steel D.M., Whitehead A.S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today*, 15, 81-88.
- [201] Story L., Kennedy S. (2004). Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J*, 45, 132-138.
- [202] Suemori S., Lynch-Devaney K., Podolsky D.K. (1991). Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 11017-11021.
- [203] Szubert M., Suzin J., Wierzbowski T., Kowalczyk-Amico K. (2012). CA-125 concentration in serum and peritoneal fluid in patients with endometriosis - preliminary results. *Arch Med Sci*, 8, 504-508.
- [204] Tabibzadeh S. (1995). Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. *Hum Reprod Update*, 1, 303-323.
- [205] Tanaka T., Miyama M., Masuda M., Mizuno K., Sakamoto T., Umesaki N., Ogita S. (2000). Production and physiological function of granulocyte colony-stimulating factor in non-pregnant human endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol*, 14, 399-404.
- [206] Tariverdian N., Siedentopf F., Rucke M., Blois S.M., Klapp B.F., Kentenich H., Arck P.C. (2009). Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *J Reprod Immunol*, 80, 80-90.
- [207] Taupin D., Wu D.C., Jeon W.K., Devaney K., Wang T.C., Podolsky D.K. (1999). The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest*, 103, R31-38.
- [208] Taupin D.R., Kinoshita K., Podolsky D.K. (2000). Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 799-804.

- [209] Taupin D., Podolsky D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 721-732.
- [210] Te Linde R.W., Scott R.B. (1950). Experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 60, 1147-1173.
- [211] Theisinger B., Seitz G., Dooley S., Welter C. (1996). A second trefoil protein, ITF/hp1.B, is transcribed in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 38, 145-151.
- [212] Thibodeau L.L., Prioleau G.R., Manuelidis E.E., Merino M.J., Heafner M.D. (1987). Cerebral endometriosis. Case report. *J Neurosurg*, 66, 609-610.
- [213] Thim L. (1997). Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci*, 53, 888-903.
- [214] Thim L., Madsen F., Poulsen S.S. (2002). Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest*, 32, 519-527.
- [215] Thim L., May F.E. (2005). Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2956-2973.
- [216] Tian X., Liu Z., Niu B., Zhang J., Tan T.K., Lee S.R., Zhao Y., Harris D.C., Zheng G. (2011). E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 567305.
- [217] Tirado-Gonzalez I., Barrientos G., Tariverdian N., Arck P.C., Garcia M.G., Klapp B.F., Blois S.M. (2010). Endometriosis research: animal models for the study of a complex disease. *J Reprod Immunol*, 86, 141-147.
- [218] Uchino H., Kataoka H., Itoh H., Hamasuna R., Koono M. (2000). Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. *Gastroenterology*, 118, 60-69.
- [219] Valle R.F. (2002). Endometriosis: current concepts and therapy. *Int J Gynaecol Obstet*, 78, 107-119.
- [220] van der Linden P.J., de Goeij A.F., Dunselman G.A., van der Linden E.P., Ramaekers F.C., Evers J.L. (1994). Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril*, 61, 85-90.
- [221] Vandermolen D.T., Gu Y. (1996). Human endometrial expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and its receptor, stimulation of endometrial G-CSF production by interleukin-1 beta, and G-CSF inhibition of choriocarcinoma cell proliferation. *Am J Reprod Immunol*, 36, 278-284.
- [222] Vercellini P., Crosignani P.G., Abbiati A., Somigliana E., Vigano P., Fedele L. (2009). The effect of surgery for symptomatic endometriosis: the other side of the story. *Hum Reprod Update*, 15, 177-188.
- [223] Vestergaard E.M., Poulsen S.S., Gronbaek H., Larsen R., Nielsen A.M., Ejskjaer K., Clausen J.T., Thim L., Nexø E. (2002). Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3. *Clin Chem*, 48, 1689-1695.
- [224] Vestergaard E.M., Brynskov J., Ejskjaer K., Clausen J.T., Thim L., Nexø E., Poulsen S.S. (2004). Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Clin Lab Invest*, 64, 146-156.
- [225] Vestergaard E.M., Borre M., Poulsen S.S., Nexø E., Tørring N. (2006). Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 807-812.
- [226] Wang F., Flanagan J., Su N., Wang L.C., Bui S., Nielson A., Wu X., Vo H.T., Ma X.J., Luo Y. (2012). RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 14, 22-29.
- [227] Weed J.C., Arquembourg P.C. (1980). Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol*, 23, 885-893.
- [228] Wickstrom C., Davies J.R., Eriksen G.V., Veerman E.C., Carlstedt I. (1998). MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J*, 334 (Pt 3), 685-693.
- [229] Wiede A., Jagla W., Welte T., Kohnlein T., Busk H., Hoffmann W. (1999). Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*, 159, 1330-1335.
- [230] Wiede A., Hinz M., Canzler E., Franke K., Quednow C., Hoffmann W. (2001). Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res*, 303, 109-115.

- [231] Witz C.A. (2003). Cell adhesion molecules and endometriosis. *Semin Reprod Med*, 21, 173-182.
- [232] Wood G.A., Fata J.E., Watson K.L., Khokha R. (2007). Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*, 133, 1035-1044.
- [233] Wu M.Y., Ho H.N. (2003). The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, 49, 285-296.
- [234] Yamachika T., Werther J.L., Bodian C., Babyatsky M., Tatematsu M., Yamamura Y., Chen A., Itzkowitz S. (2002). Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 8, 1092-1099.
- [235] Yang J.Z., Agarwal S.K., Foster W.G. (2000). Subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates the pathophysiology of endometriosis in the cynomolgus monkey. *Toxicol Sci*, 56, 374-381.
- [236] Yih S., Katabuchi H., Araki M., Matsuura K., Takeya M., Takahashi K., Okamura H. (2001). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in peritoneal endometriotic cells. *Virchows Arch*, 438, 70-77.
- [237] Yoshimura T., Yuhki N., Moore S.K., Appella E., Lerman M.I., Leonard E.J. (1989). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett*, 244, 487-493.
- [238] Young, V. J., J. K. Brown, et al. (2013). The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update* 19(5): 558-569.
- [239] Zhang R.J., Wild R.A., Ojago J.M. (1993). Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. *Fertil Steril*, 59, 1196-1201.
- [240] Zheng Q., Gao J., Li H., Guo W., Mao Q., Gao E., Zhu Y.Q. (2013). Trefoil factor 3 peptide regulates migration via a Twist-dependent pathway in gastric cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 438, 6-12.
- [241] Zhou H.E., Nothnick W.B. (2005). The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Front Biosci*, 10, 569-575.
- [242] (1997). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*, 67, 817-821.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden im Vorfeld bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Kongressbeiträge

Henze D., Doecke W.-D., Hornung D., Machens K., Schmitz A., Zollner T.M., Gashaw I. *Trefoil factor 3 – a new biomarker candidate for experimental and clinical endometriosis*. Posterbeitrag. Joint International Congress of the American and European Society for Reproductive Immunology 2012, Hamburg, GER. Ausgezeichnet mit dem *Best Poster Award*.

Henze D., Gashaw I., Hornung D., Agueusop I., Machens K., Schmitz A., Zollner T.M., Doecke W.-D. *Trefoil factor 3 – a new player in clinical and experimental endometriosis?* Posterbeitrag. 15th World Congress on Human Reproduction 2013, Venice, ITA.

Henze D., Doecke W.-D., Obendorf M., Ahsen O., Zollner T.M., Gashaw I. *Expression and regulation of trefoil factor 3 in endometrial cells*. Posterbeitrag. 2nd European Congress on Endometriosis 2013, Berlin, GER. Ausgezeichnet mit dem *First Poster Prize*.

Abstracts

Henze D., Doecke W.-D., Hornung D., Machens K., Schmitz A., Zollner T.M., Gashaw I. (2012). *Trefoil factor 3 – a new biomarker candidate for experimental and clinical endometriosis*. J Reprod Immunol, 94, 64-65. doi:10.1016/j.jri.2012.03.356.

Henze D., Doecke W.-D., Obendorf M., Zollner T.M., Gashaw I. (2013). *Expression and regulation of trefoil factor 3 in endometrial cells*. J Endometriosis, 5 (Suppl 1), 1-74. doi:10.5301/je.2013.11623.

Originalveröffentlichung

Henze D., Gashaw I., Hornung D., Agueusop I., Ahsen O., Machens K., Schmitz A.A., Doecke W.-D. *Endometriosis leads to an increased trefoil factor 3 (TFF3) concentration in the peritoneal cavity but does not alter systemic levels*. Eingereicht zur Veröffentlichung beim Journal *PLOS ONE* (02/2014).

