

Aus der Klinik für Gynäkologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Charakterisierung Endometriose-assoziiierter Immunzellinfiltrate (EMaICI)

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Petia Bauer

aus Plovdiv

Datum der Promotion: 22.09.2017

Die Wissenschaft von heute ist der Irrtum von morgen.

Jakob von Üxküll (1864-1944)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abstrakt	VIII
Abstract	IX
1 Einleitung	1
1.1 Endometriose	1
1.1.1 Definition und Erscheinungsformen	1
1.1.2 Klassifikation	2
1.1.3 Pathogenese	2
1.1.4 Symptome	4
1.1.5 Diagnostik	5
1.1.6 Therapie	5
1.2 Immunologie der Endometriose	5
1.2.1 Zelluläre Immunität	6
1.2.2 Humorale Immunität (Antikörper, Komplementsystem, Interleukine)	7
1.2.3 Immunzellen	8
1.3 Ziel	12
2 Materialien und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Patientinnen	13
2.1.2 Kontrollgruppen	16
2.1.2 Endometriosegewebe auf Paraffinschnitte	17
2.1.3 Lymphknoten als Kontrolle	17
2.1.4 Monoklonale Antikörper	17
2.1.5 Medium und Reagenzien	18
2.2 Methoden - Immunhistochemische Färbungsprotokolle	24

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	Immunhistochemischer Nachweis der CD3, CD4, CD8, CD56, CD25, CD45RO, CD68, CD20.....	24
2.2.2	Immunhistochemisches Färbungsprotokoll für Foxp3+ (Santa Cruz Biotechnology, INC) (1:200)	25
3	Testung verschiedener CD-Marker auf Lymphknoten durch IHC auf Paraffinschnitte.....	27
3.1	CD3+ T-Zellen.....	27
3.2	CD4+ T-Helfer-Zellen.....	28
3.3	CD8+ zytotoxische T-Zellen.....	28
3.4	CD20+ B-Zellen	29
3.5	CD68+ Macrophagen.....	29
3.6	CD56+ NK-Zellen.....	30
3.7	CD25+ regulatorische T-Zellen	30
3.8	CD45RO-Protokoll	31
3.9	Foxp3-Protokoll.....	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung.....	33
4.1.1	Ektopes Endometrium.....	33
4.1.1.1	Peritoneale Endometriose.....	33
4.1.1.2	Adenomyose.....	35
4.1.1.3	Rektovaginale Endometriose (DIE).....	35
4.1.1.4	Ovarielle Endometriose.....	35
4.1.2	Eutopes Endometrium.....	35
4.2	Immunhistochemische Charakterisierung von Immunzellen in Endometriose-assoziierten Infiltraten.....	39
4.2.1	Ektopes Endometrium.....	39
4.2.1.1	T-Lymphozyten.....	39
4.2.1.2	B-Lymphozyten.....	41

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.3 Makrophagen.....	41
4.2.2 Eutopes Endometrium.....	44
5 Diskussion	47
6 Zusammenfassung.....	51
7 Tabellenverzeichnis	53
8 Abbildungsverzeichnis	54
9 Grafikverzeichnis	57
10 Literaturverzeichnis	58
11 Eidesstattliche Versicherung	63
12 Lebenslauf.....	64
13 Publikationsliste.....	67
14 Danksagung.....	68

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenomyose
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase Methode
AK	Antikörper
C	Komplementsystem
CD	Differenzierungsmarker "Cluster of Differentiation" Antigene
CTL	zytotoxische T-Zellen
IL-x	Interleukine
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
DIE	tief-infiltrierende rektovaginale Endometriose (Deep infiltrating rectovaginal endometriosis)
EDT	Endometriosis disease theory
EM	Endometriose
EMaICI	Endometriose-assoziierte Immuzellinfiltrate
EML	Endometrioseläsionen
EN1/pEM	Endometrium von den Patientinnen mit peritonealer Endometriose
EN2/AM	Endometrium von den Patientinnen mit Adenomyose
EN3 ^K /UM	Endometrium von den Patientinnen mit Uterus myomatosus, Kontrolle
ENZIAN	Name des Hotels in Weissensee, Carinthia (Austria), wo 2002 die Klassifikation der DIE von der SEF Gruppe entwickelt wurde
ET	ektopes endometriales Gewebe (ectopic endometriotic tissues)
FKS	fetales Kälberserum
GnRH	Gonadotropin-releasing hormon
ICI	Immuzellinfiltrate
IHC	Immunhistochemie
IFN	Interferon
IUD	intrauterine device
LSAB	Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode
LK	Lymphknoten
M/AM	Myometrium/Adenomyose
M/UM	Myometrium/Uterus myomatosus
nd.	not determined

Abkürzungsverzeichnis

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLD	Nicht-läsional Darm
NLP	Nicht-läsional Peritoneum
NLO	Nicht-läsional Ovarium
Ov.EM	ovarielle Endometriose
p	proliferative Phase
pEM	peritoneale Endometriose
PB	peripheres Blut
PF	peritoneale Flüssigkeit
rASRM	(revised) American Society for Reproductive Medicine (-classification)
RT	Raumtemperatur
s	sekretorische Phase
SD	Standardabweichung (Standard of Deviation)
SEF	Stiftung Endometrioseforschung (Endometriose Research Foundation)
TH	T-Helferzellen
TNM	Tumor/Nodi=Knoten/Metastasen - Klassifikation
T-reg	T-regulatorische Zellen (CD25+Foxp3+)
TRIS	Tris-Buffered Saline

Abstrakt

Einleitung: Die Charakterisierung Endometriose-assoziiierter Immunzellinfiltrate (EMaICI), die bisher noch nicht beschrieben wurden. Ihre Zellart, Anzahl/mm², Größe und Lokalisation im Bezug zur EML hin werden in verschiedenen Formen der Endometriose untersucht.

Material und Methoden: Immunhistochemische Analyse der EMaICI mittels Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, CD45RO CD56, CD68 auf Paraffinschnitte von 60 prämenopausalen Frauen mit histologisch gesicherter Endometriose wurde dargestellt.

Ergebnisse: Bei allen Formen der Endometriose konnten EMaICI nachgewiesen werden, die in der Umgebung der EML lokalisiert liegen. Die EMaICI beinhalten die Immunzellen: T-Lymphozyten (CD3+, CD4+, CD8+, CD45RO+), B-Lymphozyten (CD20+) und Makrophagen (CD68+). Die meisten und größten EMaICI fanden sich in den peritonealen EML. In der Adenomyose waren die EMaICI reduziert und kleiner im Vergleich zu anderen Endometrioseformen. Es waren keine NK-Zellen (CD56+) und keine regulatorischen T-Zellen (CD25+ Foxp3+) in der EMaICI nachweisbar.

Zusammenfassung: Die Charakterisierung der EMaICI zeigt eine immunologische Umgebungsreaktion auf die EML. Weitere Analysen erlauben pathogenetische Zusammenhänge zu klären und diese könnten die Pathogenese der Endometriose in einem neuen Licht erscheinen lassen.

Schlagwörter: Endometriose, Endometriose-assoziierte Immunzellinfiltrate, Immunhistochemie, chronische Entzündung, Immunzellendefekt

Abstract

Objective: To identify and to characterize endometriosis-associated immune cell infiltrates (EMaICI). Furthermore, to define cells type, distribution (pro mm²), size and occurrence of EMaICI in various types of endometriosis.

Methods: Immunohistochemical characterization of immune cells in EMaICI by staining with monoclonal antibodies against CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD25, CD56, CD68 and CD20 on sections of paraffin-embedded endometriotic tissue in samples of 60 premenopausal women with histological confirmed endometriosis.

Results: EMaICI were observed in all the types of endometriosis, immunohistochemically identified as T-lymphocytes (CD3+), helper T-lymphocytes (CD4+), cytotoxic T lymphocytes (CD8+), antigen-experienced T lymphocytes "memory cells" (CD45RO+), macrophages (CD68+) and B lymphocytes (CD20+). The maximum frequency of EMaICI and their distribution per endometriotic lesion (EML) was observed in peritoneal endometriosis (pEM). In myometrium from adenomyosis (M/AM), EMaICI occurrence was lower and smaller in size in comparison with EMaICI seen in other forms of endometriosis. EMaICI were negative for regulatory T cells (CD25+Foxp3+) and natural killer cells (NK cells, CD56+).

Conclusion: Immunohistochemical characterization of various types of immunocompetent cells in EMaICI has demonstrated brisk infiltrates of immune cells pointing at several distinct immunological reactions within the microenvironment of different endometriotic lesion types. Further analysis is necessary to clarify in depth cell-cell interactions in all the different types of endometriotic lesions as well as their resulting effects in pathogenesis of the disease.

Keywords: endometriosis, endometriosis-associated immune cell infiltrates, immunohistochemistry, chronic inflammatory disease, immune cell defect

1 Einleitung

1.1 Endometriose

1.1.1 Definition und Erscheinungsformen

Das Krankheitsbild der Endometriose ist seit über 320 Jahren bekannt. Erste Beschreibungen stammen aus dem Jahre 1690. Der deutsche Arzt Daniel Schroen beschrieb die Endometriose, als „Geschwüre, die mit Beginn der Pubertät außerhalb der Gebärmutter auftreten“ (1,2).

Die Endometriose ist eine gutartige Erkrankung, welche 10-15 % der Frauen im reproduktionsfähigen Alter betrifft. Chirurgische Studien zeigen, dass die Endometriose bei bis zu 50 %, der Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch, sowie bei Frauen mit sehr starker Dysmenorrhoe und Blutungsstörung auftritt. 40-70 % der Frauen mit chronischen Unterbauchschmerzen sind ebenfalls betroffen. Über asymptomatische Verläufe liegen keine konkreten Daten vor, man geht aber davon aus, dass 50 % der Erkrankten keine schwerwiegenden Probleme haben (3,4).

Histomorphologisch wurde die Endometriose durch das Vorkommen von endometrialen einreihigen Drüsenzellen (Zylinderepithelien oder kubisches Epithel) und endometrialen Stromazellen außerhalb der Gebärmutterhöhle (5), in sogenannter ektooper Lokalisation, definiert. Die endometrialen einreihigen Drüsenzellen weisen eine zelluläre Aktivität auf, bzw. zeigen oft eine Progression und bilden Adhäsionen aus (6). Im Myometrium wird dieser Befund als Adenomyose bezeichnet (7). Die häufigste Lokalisation der Endometriose ist in den Ovarien, in den uterinen Ligamenten (8), und im Peritoneum des kleinen Beckens, insbesondere des Blasendaches. Eine Sonderform ist die tief-infiltrierende rektovaginale Endometriose (Deep infiltrating endometriosis (DIE)), die meist das rektovaginale Septum betrifft (9), aber auch am Dünndarm, Zökum, Sigma oder in der Blase vorkommen kann. Selten findet man Endometriose auch in anderen Organen wie der Lunge, der Pleura, den Lymphknoten (10), sowie im Weichgewebe (Narbenendometriose) (11).

Makroskopisch findet man bei der peritonealen Endometriose aktive weiße (W), gelbe (G) und rote (R), sowie inaktive schwarz-braune Herde (B) (12).

1.1.2 Klassifikation

Nach der Lokalisation der Herde wird die Endometriose in *Endometriosis genitalis interna* (Endometrioseherde innerhalb des Myometriums, sogenannte Adenomyosis uteri (A)), *Endometriosis genitalis externa* (Endometrioseherde außerhalb des Uterus im kleinen Becken (z.B. in den Ovarien, in den Ligamenta sacrouterina, im Douglas, im Blasenperitoneum)) und *Endometriosis extragenitalis* (Endometrioseherde außerhalb des kleinen Beckens (Lokalisation: der Blinddarm, der Darm, die Blase, die Vagina; seltener auch das zentrale Nervensystem, die Lymphknoten, die Leber, die Bauchspeicheldrüse oder die Lunge)) unterteilt (13). Die *rASRM (revised American Society for Reproductive Medicine) Klassifikation* berücksichtigt die Ausdehnung der Endometriose, bezogen auf die Fläche, die Infiltrationstiefe und das Ausmaß von Adhäsionen (12). Die *rASRM Klassifikation* berücksichtigt nicht die retroperitoneale Manifestation der Endometriose. Der Enzian-Score wurde als eine neue Ergänzung zur *rASRM-Klassifikation* für die tief-infiltrierende rektovaginale (DIE) Endometriose eingeführt (14). Der Enzian-Score unterscheidet, in Anlehnung an ein onkologisches Staging (Einstufung bei Tumorpatientinnen, wie bei Stadieneinteilungen des TNM- oder FIGO-Systems) anhand der Lokalisation und Ausdehnung, die tiefinfiltrierende Endometriose in drei Stadien: Stadium I < 1 cm, Stadium II 1-3 cm, Stadium III >3 cm und in drei Raumebenen: A - Septum rectovaginale und Vagina, B - Ligg. sacrouterinae, Parametrien, Beckenwand, Ureter, C - Rectum und „F“ als entfernte Manifestation der Endometriose (erarbeitet von der Stiftung Endometrioseforschung (SEF) 2010).

1.1.3 Pathogenese

Trotz intensiver Forschung kann man heute noch nicht genau sagen, wie die Endometriose entsteht. Es gibt verschiedene Theorien über die Entstehung der Endometriose, aber keine von diesen Theorien deckt alle vorkommenden Formen und unterschiedlichen Krankheitsbilder der Endometriose ab.

Es haben sich viele Theorien und Konzepte im Laufe der Zeit entwickelt.

Theorien

Die zuerst entwickelte *Coelom- bzw. Serosa-Metaplasie-Theorie* von R. Meyer (1919) (15) geht davon aus, dass die Endometriose aus Coelomepithel abstammendem Gewebe entsteht.

Später wurde die *Implantations- (bzw. Transplantations-) Theorie* (retrograde Menstruation) von J.A. Sampsons vom 1927 (16) entwickelt, welchem zufolge die Zellen durch Verschleppung endometrialer Zellen bei der retrograden Menstruation rückwärts durch die Eileiter in das kleine Becken gelangen. Die peritoneale Adhäsion und Proliferation des endometrialen Gewebes scheint dabei der Hauptmechanismus zu sein. Die Theorie erklärt aber nicht, die extraperitoneale Lokalisation der Endometriose. Für diese Theorie spricht aber die Tatsache, dass menstruales Endometrium vitale endometriale Zellen beinhaltet (17), sowie das endometriale Zellen bei der Menstruation auf die abdominale Fascie implantiert werden können und so eine Endometriose provozieren (18). Obwohl bei mehr als 90 % aller Frauen eine retrograde Menstruation beobachtet werden kann (15), bleibt unklar warum sie nur bei einem Teil der Frauen zur Entwicklung der Endometriose führt.

Das Archimeta-Konzept von Leyendecker (1998) beschrieb es als chronische Traumatisierung der Basalis mit infiltrativen Wachstum von endometrioiden Zellen. Die Bezeichnung Archimeta steht dabei für das Stratum functionale und Stratum basale des Endometriums, sowie des direkt angrenzenden Myometriums. Bei an Endometriose erkrankten Frauen wurden vermehrt Fragmente des Stratum basale im Menstrualblut gefunden. Beim Stratum subvasculare des Myometriums lag eine Hyperperistaltik (muskuläre Überaktivität) vor. Durch die Hyperperistaltik wird einerseits die retrograde Menstruation verstärkt, andererseits vermehrt retrograd menstruiertes Blut mit darin zahlreich enthaltenen Basalisfragmenten in das Peritoneum eingeschwemmt. Hierdurch wird die Entwicklung der Endometriose induziert (19).

Die Endometriose-Disease-Theorie (EDT) (Ph. Koninckx 1998) besagt, dass die Endometriose durch zelluläre oder genetische Veränderungen verursacht wird, so dass die Endometriosezellen teilweise Eigenschaften gutartiger Tumore zeigen können (20). Beim *Aromatase-Konzept*, Bulun (2000) (21) geht man von einer Hochregulation der Aromatase im Endometriosegewebe aus, was zu einer verstärkten lokalen Östrogenbildung, die wiederum die Bildung von Prostaglandin E2 stimuliert, führt.

Hormonelle Veränderungen begünstigen die Zellproliferation - Zellmigration, die Blutgefäßneubildung und Invasivität (22).

Die Zell- und molekularbiologischen Konzepte (Anna Starzinski-Powitz, 2001) gehen von einer Expression des N-Cadherin bei fehlendem E-Cadherin als Ursache für die Zellinvasivität und Metastasierung aus, welche bösartigen Tumoren (22, 23) entsprechen.

TIAR "Tissue injury and repair" von Leyendecker (2009) beschreibt ein Trauma im Bereich der Fundus-Cornealen Raphe zwischen Endometrium und Myometrium welche zu einer Hochregulation der Aromatase führt und ebenfalls die lokale Östrogensynthese als möglichen Mechanismus bei der Pathophysiologie der Endometriose einbezieht (24).

Die Immuntheorie: Dmowski (1981) zufolge spielen immunologische Faktoren als Ursache für die Entwicklung der Endometriose (4) eine wichtige Rolle. Endometriumzellen werden durch die verschiedenen körpereigenen Abwehr- und Reinigungsmechanismen nicht erkannt, nicht abgebaut oder nicht in ihrer Implantationskapazität gehemmt. Dies wird auf Veränderungen im originären Endometrium zurückgeführt (22). Es bleibt unklar, warum der Körper nicht mit einer immunologischen Antwort gegen Endometriumfragmente reagiert. Man müsste eigentlich davon ausgehen, dass die ektopen Zellen durch die lokale Immunabwehr zerstört und abgebaut werden.

1.1.4 Symptome

Die Symptompalette der Endometriose ist sehr unterschiedlich und dem Erscheinungsbild anderer Krankheiten ähnlich, so dass die Endometriose oft nicht gleich erkannt wird. Zu den typischen Symptomen gehören die folgenden Beschwerden (Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Dysurie, Dyschezie, Blutungsstörungen und chronische Unterbauchschmerzen (Tabelle 3)). Die sekundäre, prämenstruelle Dysmenorrhoe klingt nach dem Einsetzen der Menstruation wieder ab, ist aber eine typische Symptomatik für die Endometriose. Die Unterbauchschmerzen können diffus und sehr stark sein. Die unterschiedliche Klinik ist abhängig von der Lokalisation und den beteiligten Organen: für den Ovarialbefall sind Zystenbildungen typisch, Herde im Douglas-Raum - Kohabitationsschmerz (Dyspareunie) oder bei Herden im Rektum - Defäkationsschmerz (Dyschezie), Herde in der Blase - Blasenreizung (Dysurie) und

menstruale Hämaturie. Bei Adenomyosis uteri sind Blutungsstörungen und Regelschmerzen typisch.

Paradox ist, dass Frauen, die an einer Endometriose leiden, oft steril sind, ohne dass EM-Herde in den Eileitern nachgewiesen werden können (25). Das zeigt, dass Endometriose nicht nur eine lokale Erkrankung ist, sondern zu vielfältigen Veränderungen führt, die weitreichende Funktionseinschränkungen zur Folge haben. Oftmals kann aber Endometriose auch bei asymptomatischen Patientinnen als Zufallsbefund diagnostiziert werden.

1.1.5 Diagnostik

Nach ausführlicher Anamnese und Untersuchung mit Ultraschall sollte dann zur endgültigen Diagnosesicherung eine Laparoskopie erfolgen. In Ausnahmefällen kann zuvor noch ein MRT oder eine Sigmoidoskopie mit Endosonographie oder eine Zystoskopie erfolgen (22).

1.1.6 Therapie

Zurzeit existiert keine kausale Therapie. Es kann bislang nur symptomatisch therapiert werden. Grundlage der Therapie ist die operative Entfernung der Herde, gefolgt von einer hormonellen Therapie.

Bei der operativen Behandlung mittels Exzision oder Koagulation werden die Herde direkt zerstört. Die zusätzliche Schmerztherapie mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDa) oder Cox-2 Inhibitoren bewirken eine Verbesserung der Schmerzsymptomatik.

Die hormonelle Behandlung der Endometriose mit GnRH-Analoga, orale Kontrazeptiva („Pille“) oder Gestagenpräparate wird eingeleitet. Der Versuch Östrogen zu supprimieren, ändert gleichzeitig den immunologischen Status. Durch die hormonelle Therapie kann eine Kontrolle der Endometriose durchgeführt werden (22).

1.2 Immunologie der Endometriose

Neuen Theorien zufolge, spielt eine immunologische Komponente beim Auftreten der Endometriose eine wichtige Rolle (4). Die Frage ist, ob das Immunsystem ursächlich für

die Pathogenese verantwortlich ist, oder ob es infolge retrograd menstruierender Zellen übermäßig aktiviert ist. Mehrere Studien konnten eine veränderte zelluläre (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen) und humorale (mittels Antikörper, Komplementsystem und Interleukine) Immunabwehr bei den Betroffenen von der Endometriose beobachten.

1.2.1 Zelluläre Immunität

In vitro- Experimente haben gezeigt, dass der Abbau von endometrialen Zellen in erster Linie durch eine zelluläre Abwehr erfolgt, wobei unterschiedliche Komponenten des Immunsystems die antiendometriale Reaktivität determinieren (4, 26.)

Seit 1981 ist bekannt, dass unterschiedliche Komponenten des Immunsystems eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielen (4). Das normale Endometrium beinhaltet Immunzellen (27). Es handelt sich dabei überwiegend um T-Lymphozyten und Makrophagen (28). Diese sind direkt an den Epithel- und zwischen den Stromazellen lokalisiert (29).

In den ektopen Endometrioseläsionen hingegen finden sich signifikant erhöhte Mengen von T-Lymphozyten (Abb. 1) (30) und eine vermehrte Anzahl an Makrophagen im Vergleich zum eutopen Endometriumgewebe (31). Die NK-Zellen zerstören zwar im Versuchsaufbau die Endometriosezellen in vitro (32), sind aber im Stroma der ektopen, Läsionen reduziert (29). Die B-Lymphozyten werden in erhöhter Anzahl im endometrialen Gewebe bei Endometriosepatientinnen nachgewiesen (33).

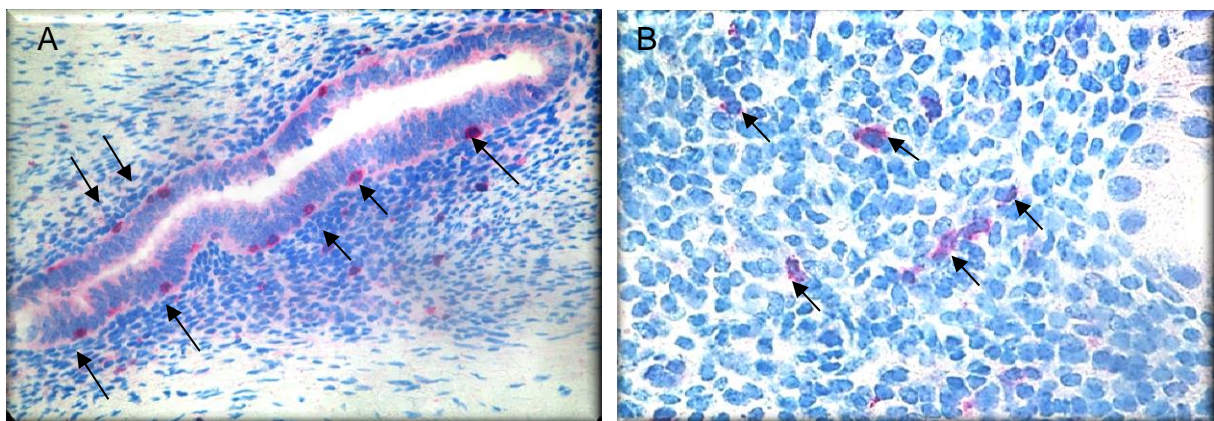


Abbildung 1:

T-Lymphozyten (CD3+) am Epithel (A) und am Stroma (B) (rot, Pfeile) einer EML (Vergrößerung 40-fach).

Zusammengefasst ist insgesamt eine erhöhte Anzahl der immunologischen Zellen (T-Lymphozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten) am Epithel der Drüsen und innerhalb des Stromas der Endometrioseläsionen beschrieben worden (30, 31, 34), die Anzahl der NK-Zellen ist reduziert. Bei den Endometriosepatientinnen erscheinen die NK-Zellen dysfunktional (Abwesenheit der Adhäsion und Zelllysis) gegenüber dem Antigen des Endometriums und zeigen eine verminderte Zytotoxizität (40). In der sekretorischen Phase des eutopen Endometriums sind die T-reg (Foxp3+ CD25+) vermindert, dies gilt aber nicht für das ektopes Endometrium von den Frauen mit Endometriose (35).

Die Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Veränderungen der Immunzellen im peripheren Blut, in peritonealer Flüssigkeit und in endometrialem Gewebe bei Patientinnen mit Endometriose.

Tabelle 1: Veränderungen der Immunzellpräsenz in peripherem Blut (PB), peritonealer Flüssigkeit (PF), endometrialem Gewebe (ET) bei Patientinnen mit Endometriose.

Immunzellen	PB	PF	ET	Literatur
Makrophagen	1↑	1↑	1↑	1 Haney et al., 1981; Oosterlynck et al.,1994; Becker et al.,1995; Wang et al.,2001; Jones et al.,1998.
NK Zellen (Natural Killers)	2↓	2↓	2↓	2 Oosterlynck et al.,1991; Vigano et al., 1991; Tanaka et al., 1992; Garzetti et al., 1993,1995; Iwasaki et al.,1993; Wilson et al., 1994 Ho et al., 1995; Jones et al.,1998.
T-Lymphozyten	3↓	3↓	3↑	3 Schawky et al.,1987; Klein et al.,1992,1994; Witz et al., 1994; Jones et al.,1996, 1998.
B-Lymphozyten	4↓ 5↑	4↑	6↑	4 Schawky et al., 1987; Agic et al., 2006; Gagne et al.,2003; 5 Badawy et al.,1987; 6 Oosterlynck et al.,1993.

1.2.2 Humorale Immunität (Antikörper, Komplementsystem, Interleukine)

Die humoralen Bestandteile des Immunsystems: das Komplementsystem (C), die Antikörper und die Interleukine (IL-x) scheinen auch bei der Endometriose verändert zu sein. Weed, Arquembourg und Issacson demonstrierten bereits IgA und C3 durch die Immunofluoreszenz (36, 37). Die Endometriumzellen stimulieren die Proliferation der Lymphozyten (29). Die aktivierten Immunzellen sezernieren Lymphokine, diese

scheinen für die Proliferation und Implantation von ektopischem endometrialem Gewebe verantwortlich zu sein (IL4, IL-6, TNF- α , IL-1, IL-8) (38, 39, 40, 41). Die IFN- γ -Konzentration in PF ist bei der Endometriose vermindert (32, 42).

Da das Immunsystem eine besondere Bedeutung für die Pathogenese der Endometriose hat und in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig behandelt wird, werden an dieser Stelle die grundlegenden Mechanismen der Immunzellen und die Immunantwort des Immunsystems dargestellt.

1.2.3 Immunzellen

1.2.3.1 Die T-Zellen

Für die zelluläre Abwehr (zellvermittelte Immunität) sind die T-Lymphozyten (CD3+) zuständig (Abb.2, Abb.3 A). T-Lymphozyten sind Lymphozyten die im Knochenmark gebildet werden und im Thymus heranreifen. Sie sind für chronische Entzündungen verantwortlich. Man unterscheidet innerhalb der T-Zellpopulation die nativen T-Lymphozyten (CD3+) und die Gedächtnis-T-Zellen (CD45+). In Abhängigkeit davon mit welcher Klasse die MHC-Moleküle („Major histocompatibility complex“) auf den T-Zellen reagieren, differenzieren sie zu T-Helferzellen (TH) (CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CTL)(CD8+). TH sind CD4+CD8-T-Lymphozyten. Ihr Rezeptor erkennt die MHC-Klasse-II-Moleküle. Es kommt zur Proliferation und Sekretion verschiedener Zytokine. Die aktivierten CD4+T-Lymphozyten können Makrophagen und Killerzellen aktivieren und B-Lymphozyten zur Antikörperbildung anregen. Mosmann et al. teilen die T-Helferzellen in TH1 und TH2 ein (43). TH1 sezernieren IL-2, IL-12, TNF-beta und IFN-gamma, TH2 sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 (44). Regulatorische T-Zellen (T-reg), beschrieben von Sakaguchi, gehören zu den CD4+-Helferzellen (45). Sie exprimieren die Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors (CD25+) an der Zelloberfläche (46) und den Transkriptionsfaktor (Foxp3+) (47), spezifisch auf MHC - II und Glykoprotein B7 (CD80 und CD86) und sezernieren IL-10, der ein sehr starker Immunsuppressor ist und die Entzündung inhibiert. Der negativ wirkende Transkriptionsfaktor Foxp3 gilt als Markerprotein von T-regulatorischen Zellen (T-reg) und ist wichtig für die Vermittlung der immunsuppressiven Funktionen (48).

Einleitung

CD4-CD8+ T-Lymphozyten zerstören die kranke Zelle direkt. Ihr Rezeptor erkennt Antigene, die von antigenpräsentierenden Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden (vor allem viral infizierte Zellen und Tumorzellen).

Gedächtniszellen

Manche CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sterben nicht wie die Effektorzellen nach dem Antigenkontakt ab, sondern werden zu langlebigen, funktionell ruhenden, immunkompetenten Gedächtniszellen, die CD45RO+ exprimieren (49, 50).

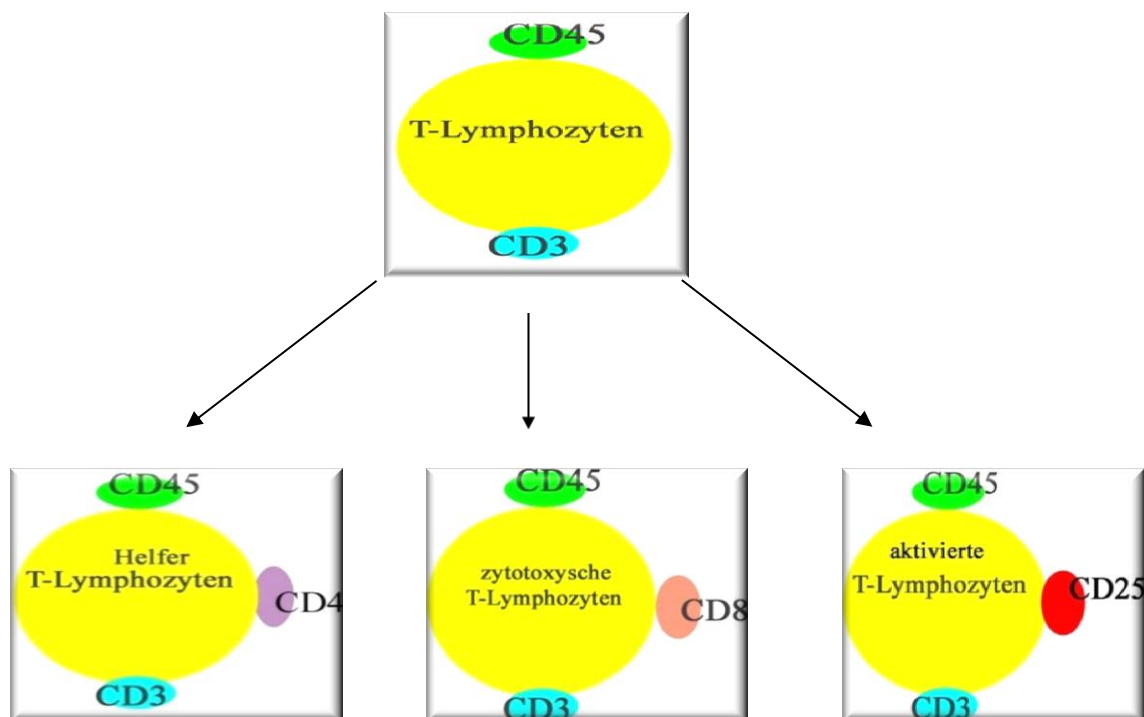


Abbildung 2:

Schematische Darstellung der Marker auf der Oberfläche der T-Zellen.

1.2.3.1 Die NK-Zellen

Die NK Zellen (CD56+) sind T-Zellen, die keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen, aber dennoch die Präsentation von MHC-I-Antigenkomplexen erkennen können. Sie tragen das Adhäsionsmolekül CD56 (N-CAM = Neural Cell Adhesion Molecule). Im Unterschied zu den zytotoxischen T-Lymphozyten sind sie nicht

antigenspezifisch und können ohne vorherige Antigenexposition sofort die Zielzelle (V.a. virusinfizierte und bösartig transformierte Körperzellen) zerstören.

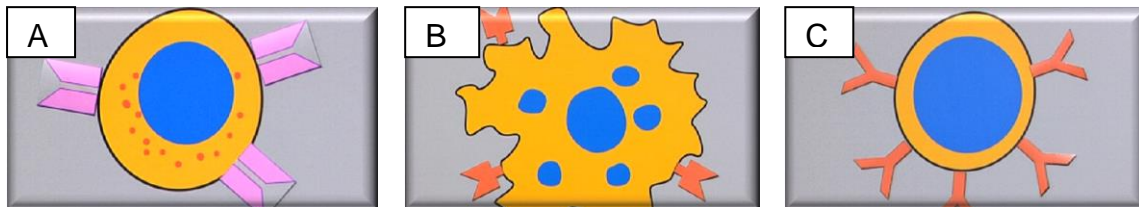


Abbildung 3:

Schematische Darstellung der Immunzellen A. T-Zelle B. Makrophage C. B-Zelle (aus Telekolleg Biologie).

1.2.3.2 Die Makrophagen

Makrophagen (CD68+) (Abb.3 B) sind gewebständige Zellen, die sich aus Monozyten differenzieren. Makrophagen phagozytieren den Erreger und präsentieren Antigene durch MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche. Hierfür spielen Sie als Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Rolle. Die Antigene können erst dadurch von T-Helferzellen erkannt werden, die daraufhin eine adaptive Immunantwort initiieren.

1.2.3.3 Die B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten (Abb.3 C) bilden Antikörper, welche Antigene direkt und mit hoher Affinität binden. B-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche eine Reihe von Oberflächenmarker, die funktionell wichtig sind und zu ihrer Identifizierung z. B. im menschlichen Blut oder in Gewebeproben verwendet werden können.

B-Lymphozyten beinhalten membranständige Immunglobuline (Antikörpern (CD19, CD20 und CD21)).

Die Tabelle 2 stellt die CD-Antigene mit ihrer zellulären Expression und Funktion dar.

Tabelle 2: „Cluster of differentiation“ Antigene

CD-Antigen	Zelluläre Expression	Funktion
CD3	T-Zellen	assoziiert mit dem T-Zell-Antigenrezeptor, Signaltransduktion
CD4	T-Zellen (Helfer)	Korezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle, Signaltransduktion
CD8	Zytotoxische T-Lymphozyten	Korezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle
CD45RO	T-Zell-Subpopulationen, Gedächtnis-T-Zellen	Isoform von CD45, erhöhte Signalisierung durch Antigen-Rezeptoren von B- und T-Zellen
CD20	B-Zellen	mögliche Funktion in der Regulation der B-Zell-Aktivierung, Kostimulation, Differenzierung
CD25 Foxp3	Regulatorische T-Zellen	IL-2-Rezeptor, α -Kette Regulation und Suppression der Immunantwort
CD56	NK-Zellen	Adhäsion
CD68	Makrophagen/Monozyten	Phagozytose

1.3 Ziel

Neben den bekannten T-, B-Lymphozyten und Makrophagen direkt am Epithel- und den Stromazellen der EML findet man auffällig häufig in mittelbarer Umgebung von Endometrioseläsionen Immunezellinfiltrate (ICI). Die Rolle dieser Endometriose-assoziierten Immunezellinfiltrate (EMaICI) in der Pathogenese der Endometriose ist völlig ungeklärt. Die Anwesenheit der Immunezellen in den EMaICI zeigt eine immunologische Umgebungsreaktion auf die EML und kann als inflammatorische Reaktion auf die Läsionen gewertet werden. Die Auswirkung auf die Mikroumgebung innerhalb der Endometrioseherde und auf die Pathogenese der Erkrankung ist unbekannt.

Die aktuelle Arbeit soll sich mit der Charakterisierung von EMaICI in Endometrioseläsionen befassen und mögliche immunologische Dysfunktionen bzw. Interaktionen zwischen Immunezellen und Zellen der EML untersuchen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Patientinnen

Für die Analysen wurden 60 Endometriosepatientinnen mit histologisch gesicherter Endometriose vom Endometriosezentrum der Charite zwischen Oktober 2005 bis Dezember 2008 ausgewählt. Im Rahmen der operativen Therapie (Hysterektomie und Salpingoovarektomie, laparoskopische Eingriffe wegen chronischer Unterbauchschmerzen und Sterilitätsabklärung, sowie Strichkürettage wegen Blutungsstörung) wurden die verschiedenen Endometrioseläsionen (peritoneale Endometrioseläsionen, Adenomyose, DIE und ovarielle Endometrioseläsionen) entnommen. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 23-45 Jahren (Mittelwert $34\pm 5,65$). Alle Patientinnen hatten reguläre Zyklen. Alle Patientinnen waren tumorfrei.

Tabelle 3: Klinische Daten I

<i>Symptome</i>	<i>n=60</i>
* <i>Dysmenorrhoe</i>	48 (80 %)
* <i>Dyspareunie</i>	44 (73,3 %)
* <i>Dyschezie</i>	21 (35 %)
* <i>Dysurie</i>	9 (15 %)
* <i>Blutungsstörungen</i>	33 (55%)
* <i>Unterleibschmerzen</i>	46 (76,6%)
* <i>Sterilität</i>	26 (43,3%)
* <i>Asymptomatisch</i>	5 (8,3%)

Materialien und Methoden

Tabellarisch sind die typischen Endometriosebeschwerden von 60 Frauen dargestellt (Tab.3). 12 (20%) Patientinnen, laparoskopiert oder laparotomiert wegen Endometriose-assoziierten Beschwerden, hatten histologisch gesicherte peritoneale Endometriose. Von denselben Patientinnen wurden eine Strichkürette (n=12) entnommen. Die Zyklusphasen der Patientinnen (proliferative (n=6) und sekretorische (n=6)) wurden nach dem histologischen Befund des Endometriums ermittelt. 24 (40%) Patientinnen, hysterektomiert wegen Blutungsstörungen, hatten eine Adenomyosis uteri (n=24). Die Endometrioseherde wurden bei 3 Patientinnen von der Scheidenwand exzidiert (n=3). Bei 3 Patientinnen (n=3) befanden sich die Endometrioseherde am Septum rectovaginalis. Bei 6 (12%) Patientinnen wurden durch darmchirurgische Eingriffe Endometrioseherde vom Darm freipräpariert. Des Weiteren wurden mittels Ovariectomie/Salpingoovarectomie bei 12 (20%) Patientinnen Endometrioseherde am Ovar entnommen und histologisch gesichert.

Alle Patientinnen (n=60) wurden nach rARSM-Klassifikation eingestuft. Hormonelle Therapie hatten 27 Patientinnen, davon 2 (3,3%) IUD (intrauterin levonorgestrel-releasing device), 5 (8,3%) kombinierte OC, 9 (15%) GnRH-Analoga, 5 (8,3%) Progesteron und 6 (10%) waren ohne anamnestische Daten. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der klinischen Daten der 60 Endometriosepatientinnen dieser Studie.

Die untersuchten Proben wurden gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin gewonnen und es lag ein Einverständnis aller Patientinnen vor.

Tabelle 4: Klinische Daten II

Patientinnen	n=60
Alter/ Mittelwert	34±5,65 (vom 23 bis 45)
Histologie	
• peritoneale EM	◇ 12 (20%)
• Adenomyose	◇ 24 (40%)
• DIE	◇ 12 (20%)
• ovarielle EM	◇ 12 (20%)
OP-Grund	
• peritoneale EM	➤ Sterilität
• Adenomyose	➤ Blutungsstörung
• DIE	➤ Unterleibsschmerzen
• ovarielle EM	➤ Zystenbildung
rASRM	
II	◇ 20 (33,3%)
III	◇ 36 (60%)
IV	◇ 4 (6,7%)
Hormone	
	• 33 (55%) ohne Hormone
	• 27 (55%) mit Hormone

2.1.2 Kontrollgruppen

Als Kontrollgruppe wurde Gewebe von prämenopausalen nicht an Endometriose erkrankten Patientinnen (n=60) genommen, die wegen anderer gutartiger Erkrankungen wie Ovarialzysten, Myome oder wegen Beschwerden wie Unterbauchschmerzen operiert worden waren. 12 Proben sind vom gesundem, nicht-läsionalem Peritoneum (Peritoneum, das im Rahmen einer Hysterektomie angefallen war). Es wurde bei der NLP nicht die Zyklusphase beachtet, aufgrund fehlender anamnestischer Daten. 24 Proben von Patientinnen mit Uterus myomatosus, die eine Hysterektomie erhielten, hatten Endometrium und Myometrium. 12 Proben sind von gesundem, nicht-läsionalem Darm (unauffällige Darmwand bei Darmteilresektion bei Divertikulitis), sowie 12 Proben von gesundem nicht-läsionalem Ovarium, entnommen durch Salpingoovarektomie für benigne Konditionen.

Tabelle 5: Gewebeproben

EM Gruppen	Kontrollgruppen
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peritoneale Endometriose (n=12)</i> <ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>proliferative Phase (n=6)</i> ➤ <i>sekretorische Phase (n=6)</i> • <i>Strichkürette (n=12) (EN1)</i> <ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>proliferative Phase (n=6)</i> ➤ <i>sekretorische Phase (n=6)</i> • <i>Adenomyosis (AM) (n=24)</i> <ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Endometrium (EN2/AM) (n=12)</i> ➤ <i>Myometrium (M/AM) (n=12)</i> • <i>DIE (n=12)</i> • <i>Ovarielle Endometriose (n=12)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Nicht-läsionales Peritoneum (NLP) (n=12) • Uterus myomatosus (n=24) <ul style="list-style-type: none"> ➤ Endometrium (EN3^K) (n=12) ➤ Myometrium (M/UM) (n=12) • Nicht-läsional Darm (NLD) (n=12) • Nicht-läsional Ovarium (NLO) (n=12)

2.1.2 Endometriosegewebe auf Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke wurden von der pathologischen Abteilung des Campus Benjamin Franklin der Charité Berlin zur Verfügung gestellt und es wurden 1-2 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Die peritonealen Endometrioseläsionen wurden entsprechend ihrer Lokalisation entnommen: Fossa ovarica (n=1), Sakrouterinligamente (n=4), Blasenperitoneum (Blasenumschlagsfalte) (n=3), Douglasraum (n=2), Lig. Infundibulopelvicum (n=1) sowie Fett- und Bindegewebe vom Peritoneum (n=1). Die Strichkürette von den Patientinnen mit histologisch gesicherter peritonealer Endometriose (n=12) wurde je nach Zyklusphase getrennt untersucht: proliferative Phase (n=6); sekretorische Phase (n=6). Es wurden Adenomyoseläsionen als Myometrium und Endometrium Gewebeproben entnommen (n=24). Die rektovaginalen Endometrioseherde (n=12) bestehen aus: Vaginalhinterwand (n=3), Septum rektovaginale (n=3), Dickdarmresektate (n=2), Rectosigmoid (n=1), Rectumresektate (n=3). In 12 Fällen (n=12) befanden sich die Endometrioseherde an den Ovarien (ovarielle Endometriosezysten (Endometrioma)).

2.1.3 Lymphknoten als Kontrolle

Lymphknoten wurden als positive und negative Kontrolle für die Testung der unterschiedlichen Marker verwendet.

2.1.4 Monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper wurden auf formalin-fixierten Paraffinschnitten verwendet. Bei allen Antikörpern handelt es sich um IgG-Antikörper der Maus (Tabelle 6).

Tabelle 6: Monoklonale Antikörper

AK	Spezifität	KLON	Firma	Verdünnung
CD3	T- Zellen	UCHT1	Dianova, Hamburg, Germany	1:20
CD4	T-Zellen (Helfer)	1F6	Dianova, Hamburg, Germany	1:20
CD8	Zytotoxische T-Lymphozyten	C8/144B	Dianova, Hamburg, Germany	1:50
CD25	IL-2R (T-cell growth factor receptor), regulatorische T- Zellen	35C04, 4C9	Dianova, Hamburg, Germany	1:50
CD45RO	T-Zell-Subpopulationen, Gedächtnis- T- Zellen	UCHL1	DakoCorporation, Carpinteria, USA	Ready-to-use
CD56	NK-Zellen	123.D5	Dianova, Hamburg, Germany	1:20
CD68	Makrophagen/Monozyten	KP1	Dianova, Hamburg, Germany	1:200
CD20	B-Zellen	L26	Dianova, Hamburg Hamburg Germany	1:50

2.1.5 Medium und Reagenzien

Citratpuffer: Citratpuffer 10 mM pH=6,0 enthält 18 ml Stammlösung A, 82 ml Stammlösung B und 900 ml Aqua destillata. Die Stammlösung A (Merck, Darmstadt, Deutschland) besteht aus 0,1 M Zitronensäure = 21,01 g $C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$ in 1000 Aqua destillata. Die Stammlösung B (Merck, Darmstadt, Deutschland) besteht aus 0,1 M Natriumcitrat = 29,41 g $C_6H_5O_7Na \cdot xH_2O$ in 1000 ml Aqua destillata. 1000 ml Citratpuffer wurde mit der jeweiligen Pipette (A bzw. B) in ein entsprechend großes Gefäß eingefüllt und mit Aqua destillata aufgefüllt. Die letzten Millimeter wurden sehr genau mit der

Materialien und Methoden

Spritzflasche dosiert. Der Schwimmfisch wurde in die Lösung getan, das Gefäß auf einen Magnetrührstab gestellt und das Gerät angestellt. Die Lösung wurde anschließend bei 2-8 °C im Kühlraum aufbewahrt.

Tris-Puffer: Tris-Puffer 50 mM bestehen aus 34,25 g TrisHCl, 4,0 g Tris Base, 43,9 g NaCl und wurden in 5.000 ml Aqua destillata aufgelöst.

FKS: 10 % fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland) (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland
Dako® Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako LSAB®+ System, AP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Diaminobenzidine (3,3` Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Derma Clean, nicht sterile Einmal-Untersuchungshandschuhe	Ansell, München
Ethanol (96%) reinst Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Falcon Serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25 mL	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Falcon Tubes 25 und 50 mL	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Fetales Kälberserum (FSK)	Biochrom, Berlin

Materialien und Methoden

Fuchsin Substrate-Chromogen-System	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Plastipur® sterile Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Trisma® Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trisma®Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) min 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Objekträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pasteur Pipetten	Brand GmbH + Co, Wertheim
Proteinase K	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co, Wertheim

Materialien und Methoden

Streptavidin-AP Coniugate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trizma® Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Holland

Materialien und Methoden

Tabelle 8: Geräte

Accu Jet (Pipettierhilfe)	Brand, Wertheim
Analysewaage Navigator TM	Ohaus, Giessen
Axiovert 25 Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bidestanlage GFL 2102	GFL, Burgwedel
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Canon PowerShot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Heizschrank/Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke und Kunkel, Taufen
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroliterzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Walldorf
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Materialien und Methoden

Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge eppendorf centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Ehret, Emmendingen
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
Universalzentrifuge Labofuge 400R, Rotor 70.Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt

2.2 Methoden - Immunhistochemische Färbungsprotokolle

Lymphozyten-Subpopulationen (T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen) und Makrophagen lassen sich mittels immunhistochemischer Färbung in ihrer unterschiedlichen Oberflächenstruktur unterscheiden (nach CD-Nomenklatur). Hierzu wurde das Gewebe durch ein Mikrotom in 1-2 µm dicke Paraffinschnitte auf Objektträger gebracht. Anschließend wurden die Paraffinschnitte im Kühlschrank bei 4° C gelagert.

2.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der CD3, CD4, CD8, CD56, CD25, CD45RO, CD68, CD20

Im ersten Schritt wurden die Paraffinschnitte bei 60°C für 2-15 Stunden gebacken. Die Paraffinschnitte wurden mit Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland) 2 mal 5 Minuten entparaffiniert und anschließend mit Aceton (J.T. Baker, Deventer, Holland) in Tris-Puffer (1:1) rehydriert. Die Demaskierung des Epitops erfolgte durch Kochen der Schnitte in einem Dampfdrucktopf für 40 Minuten in 10 mM Citratpuffer bei 95 °C (pH=6). Bei CD 25 wurden die Paraffinschnitte nach dem Kochen mit Proteinase K (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 6 Minuten vorbehandelt. Die Vorinkubierung der Paraffinschnitte erfolgt durch DAKO Biotin Blocking (System Avidin/Biotin). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Schnitte wurden sie mit fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die entparaffinierten Schnitte wurden 1 Stunde bei RT mit dem o. g Antikörper in verschiedenen Verdünnungen (Tab. 6) inkubiert: Anti-CD-Ab (CD3, CD4, CD8, CD56, CD25, CD68, CD20) mit Antibody Diluent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). Nach dreimaligem Waschen mit einem Tris-Puffer wurden die Schnitte mit dem Kaninchen-Anti-Maus IgG (Dako, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:400 mit Background reducing dilution (Dako, Hamburg, Deutschland) für 40 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal in Tris-Puffer gewaschen und mit alkalischer Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:400 mit Background reducing dilution (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für weitere 40 Minuten inkubiert. Die Paraffinschnitte wurden mit Anti-CDRO45-Antikörper Ready-to-use für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde DAKO LSAB+System AP (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer erfolgte die Entwicklung der CD positiven Zellkerne durch eine

Fuchsin-Farbreaktion. Anschließend erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun (30 Sekunden) und das Eindecken der Schnitte in Kaisers-Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Der positive Nachweis der oben genannten Antikörper konnte anhand der Rotfärbung der Zelloberfläche erbracht werden. Keine Rotfärbung der Zelloberflächen war an der Negativkontrolle (Lymphknoten) zu sehen, die anstelle des primären Antikörpers mit Tris-Puffer inkubiert worden waren. Zur Auswertung der Färbung wurden die Schnitte unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 20 x Vergrößerung beurteilt. Die Bilder wurden mit Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) in verschiedener Vergrößerung (10-fach, 20-fach, 40-fach, 100-fach) fotografiert. Es wurden „Hotspots“ ausgewählt, wobei sich eine EML fand und sich die Infiltrate in der Endometrioseläsionsumgebung in einem Radius von 2 mm befanden, nach H&E gezählt und pro mm² ausgerechnet. Immunzellinfiltrate im Radius von 2 mm der Endometrioseläsion mit mehr als 10 Immunzellen wurden als Endometriose-assoziierte Immunzellinfiltrate definiert. EMaICI wurden hinsichtlich ihrer Anzahl pro mm², Zellart, Größe der EMaICI (>50 Zellen = groß, 20-50 Zellen = mittelgroß, <20 Zellen= klein) und Lokalisation in Bezug zur EML (läsionsnah und läsionsfern) untersucht. Für die statistische Analyse wurde das Programm SPSS 18 (SPSS Institute Chicago, IL, USA) verwendet. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney U Test als nichtparametrischer Test für zwei unabhängige Variablen verglichen. Der signifikante Unterschied wurde definiert mit $p < 0,01$ als sehr signifikant und $p < 0,05$ als signifikant. Die Daten wurden dargestellt als Anzahl der EMaICI pro mm² mit Standardabweichung (\pm SD).

2.2.2 Immunhistochemisches Färbungsprotokoll für Foxp3+ (Santa Cruz Biotechnology, INC) (1:200)

Die etablierte Färbung wurde in der Abteilung für Pathologie CBF der Charité durchgeführt. Die Färbung erfolgte für Foxp3+ Zellen bei 12 peritonealen EM-Paraffinschnitten (n=12). Zunächst erfolgte die Fixierung der Schnitte durch Wasserstoffperoxid (3% H₂O₂) zur Blockierung der endogenen Peroxidase und Rehydratierung mittels Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS pH 7,6). Der monoklonale AK Foxp3+ wurde in einer Verdünnung von 1:200 für 30 Minuten impliziert. Danach wurden Brückenantikörper der Kaninchen-Antiratte in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt, damit der APAAP-Komplex (Dako,

Materialien und Methoden

Hamburg, Deutschland) sich anschließend binden kann. Der Envision-PO der Kaninchen-Anti-Ratte wurde für 10 Minuten verwendet. Die Schnitte wurden mit Diaminobenzidine (3,3`Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)) für 10 Minuten gefärbt. Die Braunfärbung der Zelloberfläche zeigte, dass einzelne Zellen positiv auf Foxp3+ in peritonealer EM reagierten.

3 Testung verschiedener CD-Marker auf Lymphknoten durch IHC auf Paraffinschnitte

- Backen 60° C (4 Std.)
- Entparaffinieren
- Kochen im Dampfgarer im Zitratpuffer 95°C (*40')
- Blocken Avidin (10') Biotin (10')
- FCS (30')
- Primär Antikörper-anti CD Ab- /1h
- Kaninchen- Anti-Maus IgG -1:400 - 40'
- Streptavidin-1:400-40'
- Fuchsin Kernfärbung
- Eindecken
 - (*' Minuten)

3.1 CD3+ T-Zellen

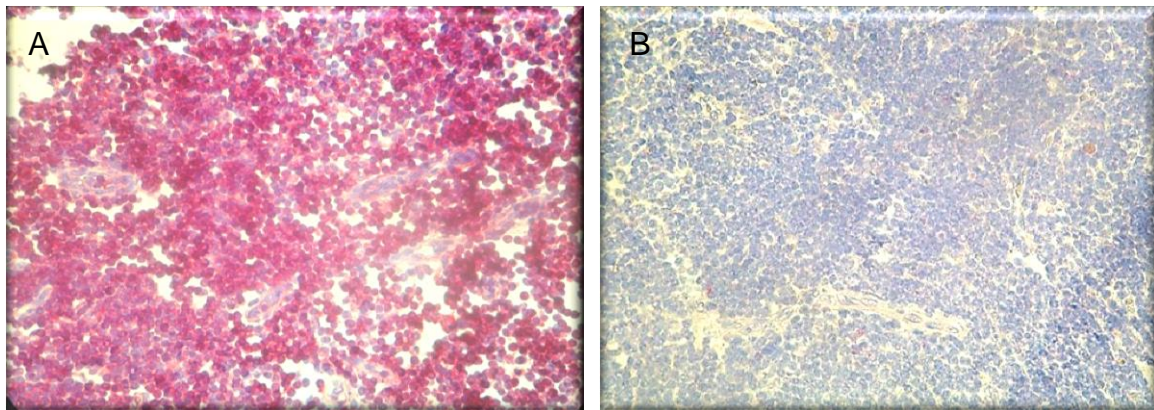


Abbildung 4:

A. Dickdarmresektat LK mit CD3+ Zellen

B. Dickdarmresektat LK-negativ Kontrolle
CD3- Zellen

Verdünnung 1:20

Vergrößerung 40-fach

3.2 CD4+ T-Helfer-Zellen

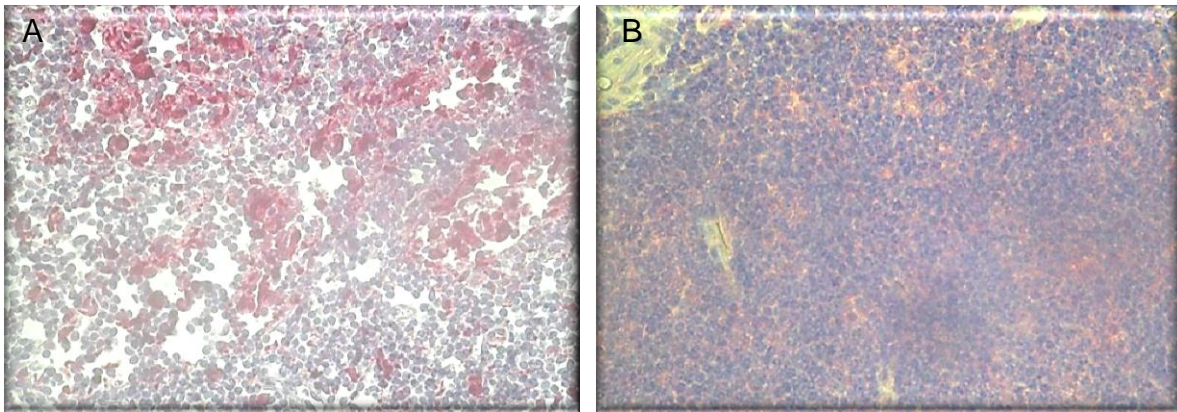


Abbildung 5:

A. Sigmaresektat LK mit CD4+ Zellen

B. Sigmaresektat LK-negativ Kontrolle
CD4- Zellen

Verdünnung 1:20

Vergrößerung 40-fach

3.3 CD8+ zytotoxische T-Zellen

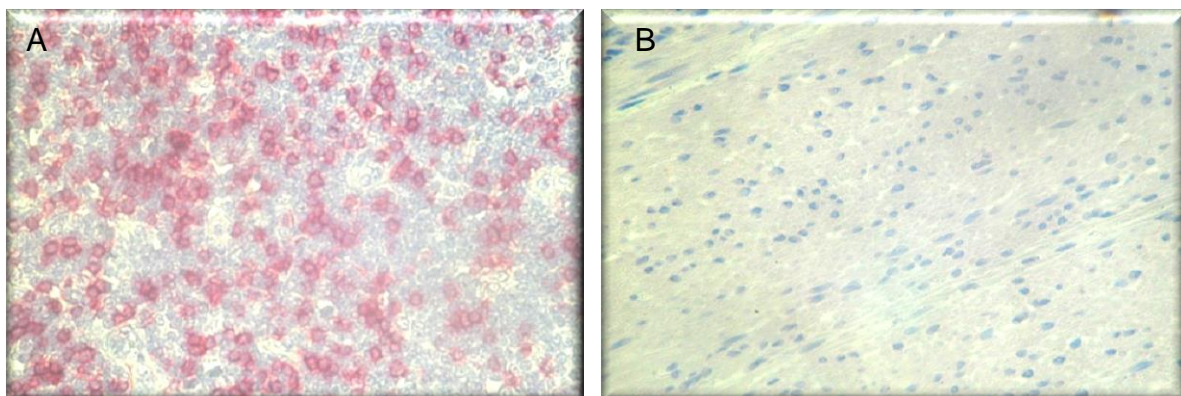


Abbildung 6:

A. Ileocecalresektat LK mit CD8+ Zellen

B. Ileocecalresektat LK-negativ Kontrolle
CD8- Zellen

Verdünnung 1:50

Vergrößerung 40-fach

3.4 CD20+ B-Zellen

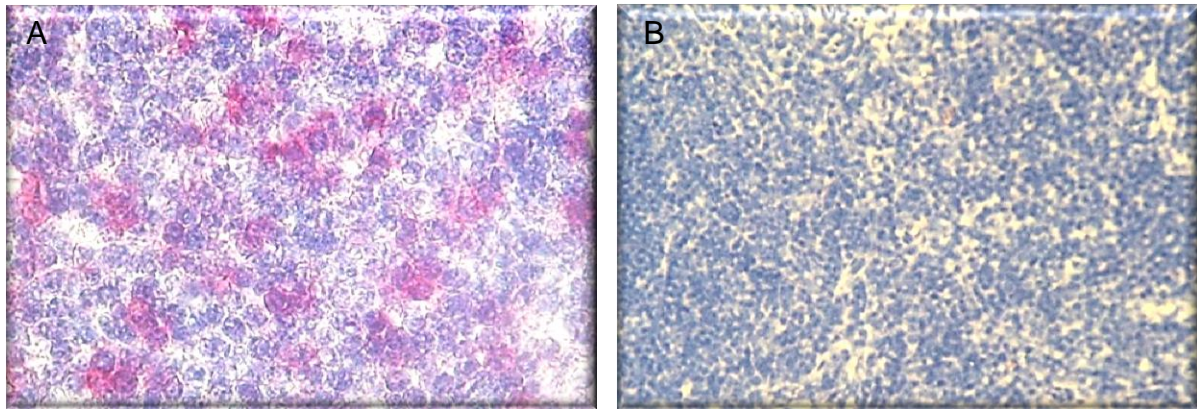


Abbildung 7:

A. Darm LK mit CD20+ Zellen

B. Darm LK-negativ Kontrolle
CD20- Zellen

Verdünnung 1:50

Vergrößerung 40-fach

3.5 CD68+ Makrophagen

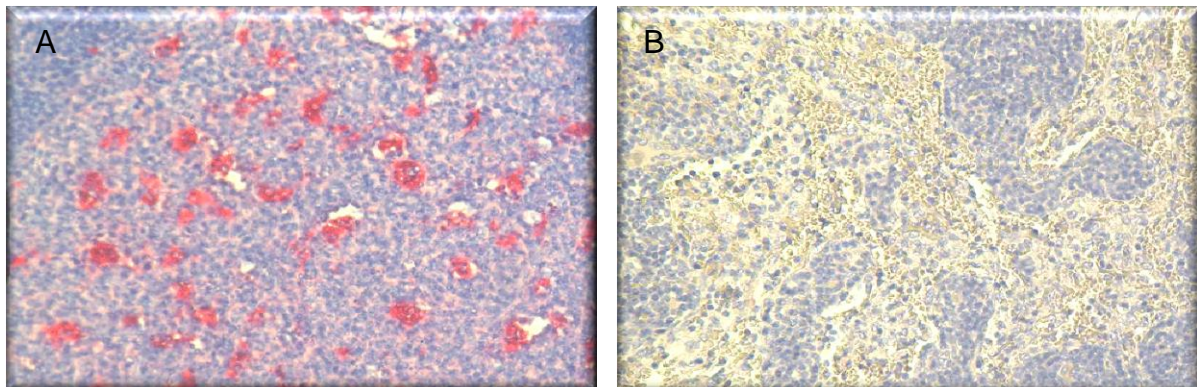


Abbildung 8:

A. Mesocolicaler LK mit CD68+ Zellen

B. Mesocolicaler LK-negativ Kontrolle
CD68- Zellen

Verdünnung 1:200

Vergrößerung 40-fach

3.6 CD56+ NK-Zellen

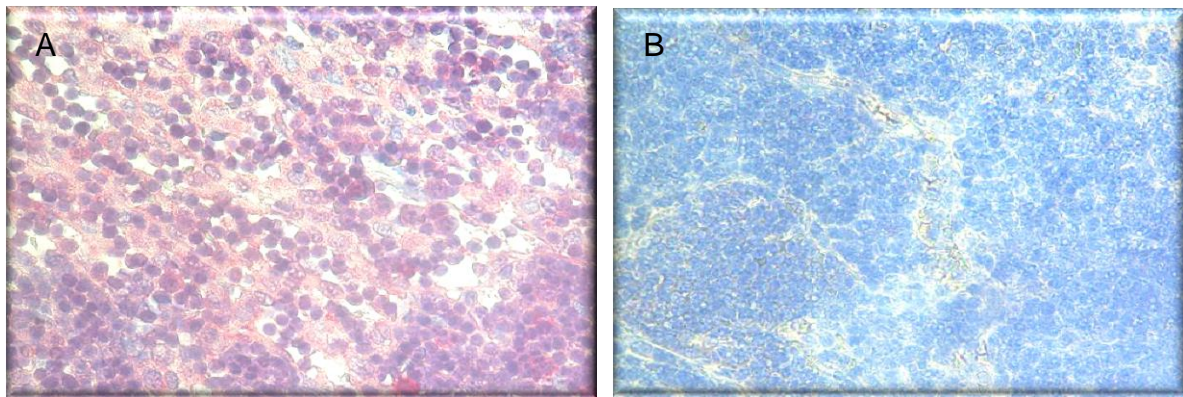


Abbildung 9:

A. Ileocoecalresektat LK mit CD56+ Zellen B. Ileocoecalresektat LK-negativ Kontrolle
CD56- Zellen

Verdünnung 1:20 über Nacht

Vergrößerung 40-fach

3.7 CD25+ regulatorische T-Zellen

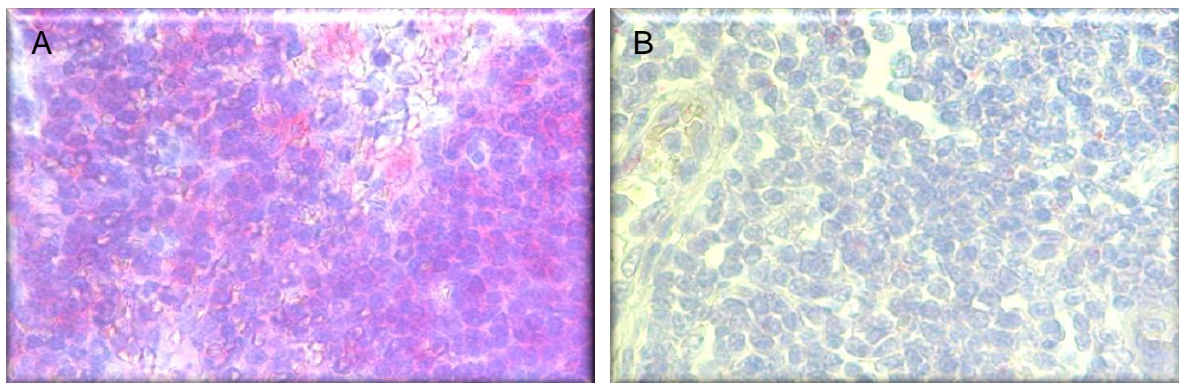


Abbildung 10:

A. Dickdarmresektat LK mit CD25+ Zellen B. Dickdarmresektat LK-negativ Kontrolle
CD25- Zellen

Verdünnung 1:50

Proteinase K

Vergrößerung 40-fach

3.8 CD45RO-Protokoll

LSAB-Methode:

- Backen 60° C (4 Std.)
- entparaffiniertes Kochen im Dampfgarer im Zitratpuffer 95°C (*40')
- Blocken Avidin (10') Biotin (10')
- FCS (30')
- Primär Antikörper-anti CD45RO Ready-to-use-1h
- LSAB+System
- AP Fuchsin
- Kernfärbung
- Eindecken
 - (*Minuten)

CD45RO+ T-Zellen

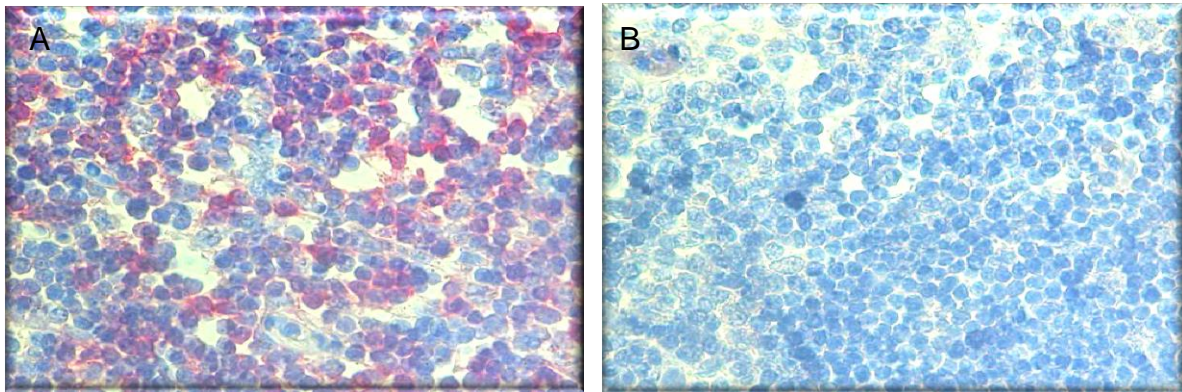


Abbildung 11:

A. LK+ mit CD45RO+ Zellen

B. LK-negativ Kontrolle CD45RO- Zellen

LSAB-Methode mit Ready-to-use AK

Vergrößerung 40-fach

3.9 Foxp3-Protokoll

APAAP- Methode

- AK-Verdünnung 1:200 (*10')
- H₂O₂-3% 30'
- AK (Foxp3)
- TBS 30' Kaninchen/ Ratte TBS 1h
- Envision-PO (Kaninchen/Ratte)
- TBS 10'
- DAB-Entwicklung
 - (*Minuten)

Foxp3

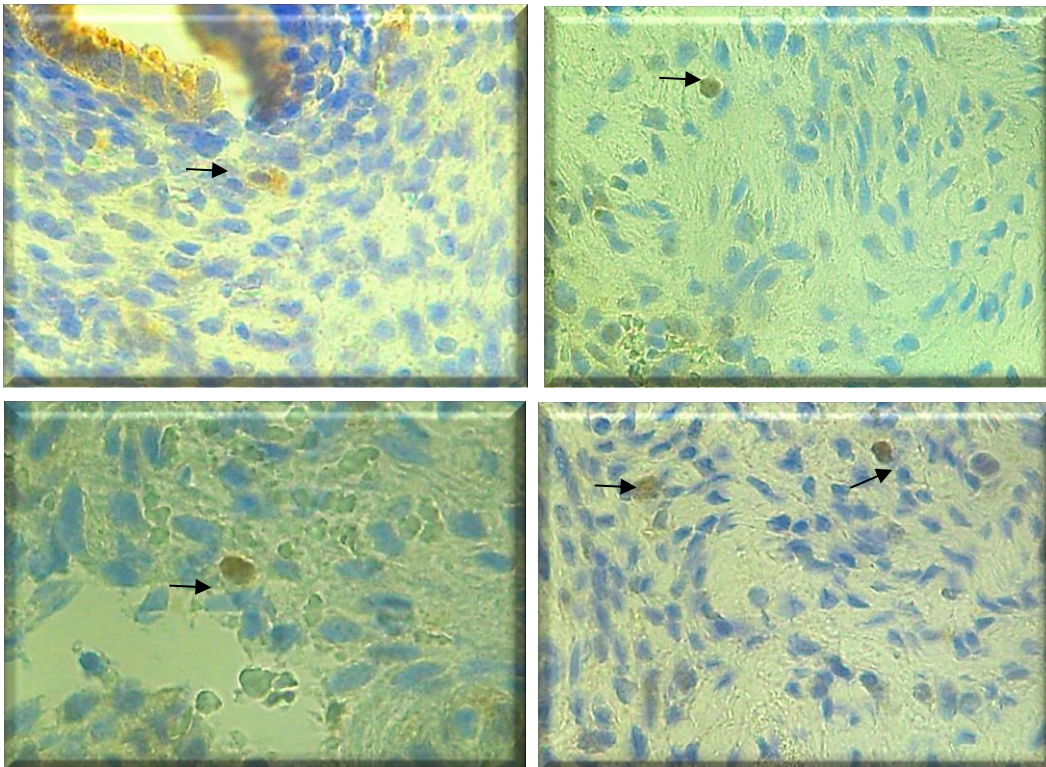


Abbildung 12:

Im Stroma der peritoneale EM wurden einzelne Foxp3+Zellen dokumentiert (braun, Pfeile) und keine EMaCI positiv für Foxp3 Zellen. Vergrößerung 100-fach.

4 Ergebnisse

Auffallend häufig finden sich Immuzellinfiltrate (ICI) in unmittelbarer Umgebung von Endometrioseläsionen, daher sollten diese in der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden. Dazu wurde zunächst die Anzahl und Lokalisation der ICI in den verschiedenen Endometrioseläsionen, sowie am eutopen Endometrium bestimmt. Wir definierten Endometriose-assoziierte Immuzellfiltrate (EMaICI) wenn diese innerhalb eines Radius von 2 mm um die eigentliche Endometrioseläsion (läsionsnah, läsionsfern) herum auftraten. Peripher gelegene ICI nennen wir Peripherie wenn die Endometrioseläsion mehr als 4 mm entfernt war. Die EMaICI enthielten mehr als 10 Zellen. In allen Endometrioseläsionen (peritoneale Endometriose, Adenomyose, rektovaginale Endometriose, ovarielle Endometriose) wurden nach Hämatoxylin-Eosin Färbung Immuzellinfiltrate beschrieben.

4.1 Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung

4.1.1 Ektopes Endometrium

4.1.1.1 Peritoneale Endometriose

In der peritonealen Endometriose (n=12) sind im Radius von 2 mm der EML $3,6 \pm 0,9$ EMaICI pro mm^2 darstellbar. Die Infiltrate sind nahe der EML zwischen Stromazellen und den Drüsen (in sogenannten ektopes), oder zwischen Stromazellen und dem entsprechenden beteiligten Gewebe (im peritonealen Fett- und Bindegewebe) (läsionsfern) angesiedelt (Abb.13).

Ergebnisse

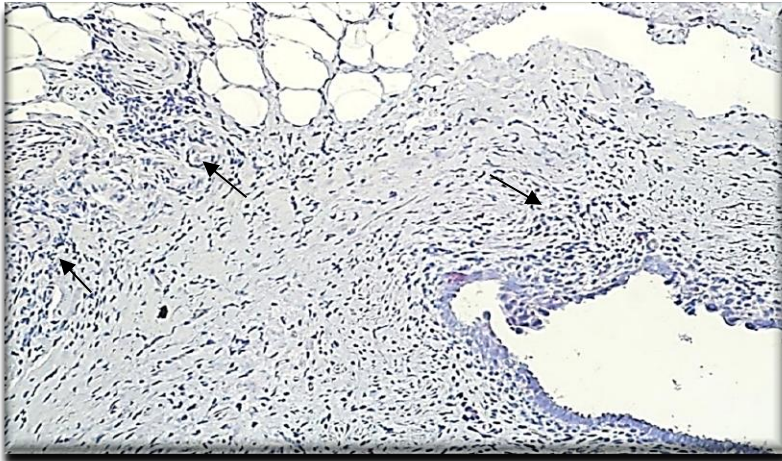


Abbildung 13:
EML Darstellung mit einem EMAI (läsionsnah) und zwei EMAI (läsionsfern)
(H&E, Vergrößerung 10-fach).

In der Peripherie sind gelegentlich auch Immunzellinfiltrate (ICI) zu sehen. In der peritonealen Endometriose (n=12) waren 0,7 ICI pro mm² in 3 Paraffinschnitten (n=3) nachweisbar (Abb.14).

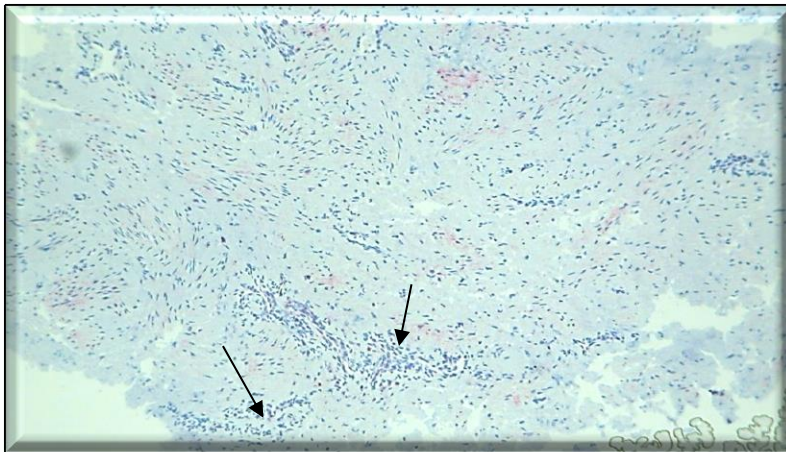


Abbildung 14:
Peripherie von peritonealer EM mit ICI (Pfeile) (H&E, Vergrößerung 10-fach).

4.1.1.2 Adenomyose

Die Paraffinschnitte von Patientinnen mit Adenomyose wurden nach histologischer Schichtung (Myometrium/Endometrium) mikroskopiert (n=24). Im Myometrium (n=12) waren $0,9\pm 0,4$ EMaCI pro mm^2 nachweisbar.

Die EMaCI befanden sich in der Nähe der Adenomyoseläsion (läsionsnah) oder im Myometrium (läsionsfern). In der Peripherie des Myometriums waren, mittels IHC-Färbung mit verschiedenen Markern für Immunzellen, Ansammlungen von 5-6 Zellen zu erkennen, aber keine Infiltrate zu sehen.

4.1.1.3 Rektovaginale Endometriose (DIE)

In den Paraffinschnitten (n=12) mit Colon- und Rektumbeteiligung infiltrierten die Endometrioseläsionen die Muscularis propria. Es gibt $2,2\pm 0,2$ EMaCI pro mm^2 in der Umgebung dieser EML im Radius von 2 mm (läsionsnah oder zwischen den Zellen der Muscularis propria (läsionsfern)). Wenn die EML an der Mucosa nahe der Darmwand lagen, waren EMaCI an der Muskulatur/Mukosarand, sowie tief in der Mucosa zu sehen, sie waren nicht mehr als 2 mm von EML entfernt. In der Vaginalwand, auch läsionsnah und läsionsfern in der Muscularis und entsprechend in der Mucosa, befanden sich EMaCI. In der Peripherie waren keine Infiltrate zu sehen.

4.1.1.4 Ovarielle Endometriose

Es sind $2,9\pm 0,5$ EMaCI pro mm^2 zwischen den interstitiellen Zellen oder im Cortex ovarii gut darstellbar. In der Peripherie waren keine Infiltrate zu sehen.

Die Kontrollgewebe entsprachen endometriosefreiem Gewebe: läsionsfreiem Peritoneum (NLP), Uterus myomatosus (Myometrium) (M/UM), läsionsfreien Darm (NLD) und läsionsfreien Ovar (NLO). Sie wiesen weniger als 0,5 pro mm^2 Infiltrate auf.

4.1.2 Eutopes Endometrium

Im Endometrium (EN1/pEM) der Patientinnen mit peritonealer Endometriose, durch Strichkürettage entnommen (n=12), waren ebenso Immunzellinfiltrate nachweisbar. Es zeigten sich $2,4\pm 0,3$ EMaCI pro mm^2 im Radius von 2 mm der EML.

Im Endometrium (EN2/AM) der Patientinnen mit Adenomyose waren $0,5\pm 0,02$ EMaCI pro mm^2 im Radius von 2 mm von der EML zu erkennen. Im Endometrium von

Ergebnisse

endometriosefreien Patientinnen (Uterus myomatosus) (EN3^k/UM) (Kontrollgruppe; n=12) finden sich im 0,04±0,001 pro mm² Infiltrate.

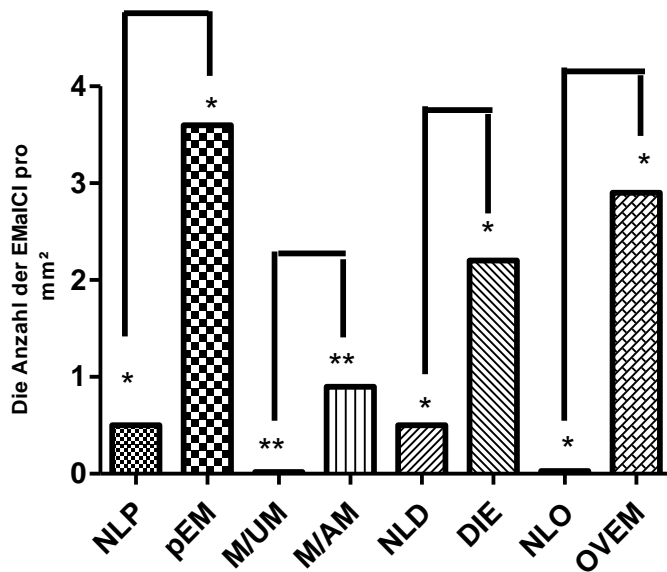
Der Vergleich der Anzahl der EMaICI in EML in verschiedenen Zyklusphasen und die Kontrolle dazu wurden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: EMaICI in EML in verschiedenen Zyklusphasen und in den Kontrollgruppen (H&E)

EM Formen	EMaICI/mm ²	großes Infiltrat	mittel großes Infiltrat	kleines Infiltrat	Kontrollgruppen	ICI / mm ² ± SD	kleines Infiltrat	p Wert* EMaICI/ICI/mm ²
pEM	3,6±0,9	66,6 %	16,7 %	16,7 %	NLP	0,5±0,02	91%	0,03
p s	1,8±0,3 1,8±0,3							
M/AM	0,9±0,4	50%	41,6%	8,4 %	M/UM	0,02±0,001	91%	0,008
DIE	2,2±0,2	41,6%	50%	8,4 %	NLD	0,2±0,01	91%	0,03
Ov EM	2,9±0,5	50%	41,6%	8,4 %	NLO	0,03±0,01	91%	0,02
EN1/pEM	2,4±0,3	100%	-	-	EN3^k/UM	0,04±0,01	100%	0,02
p s	1,2±0,2 1,2±0,2							
EN2/AM	0,5±0,02	-	-	100 %	EN3^k/UM	0,04±0,01	100%	0,004

In allen EML waren im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollgeweben deutlich mehr EMaICI nachweisbar. Es gab signifikante Unterschiede in der Anzahl der EMaICI zwischen den verschiedenen Formen der EM (pEM, DIE und OvEM) und den Kontrollgruppen (p<0,05). Im Man Whitney Test zeigte sich ein sehr signifikanter Unterschied in der Anzahl der EMaICI zwischen dem Myometrium der Adenomyose (M/AM) und dem Myometrium der Uterus myomatosus EN3^k /UM (p<0,01) (Graphik 1).

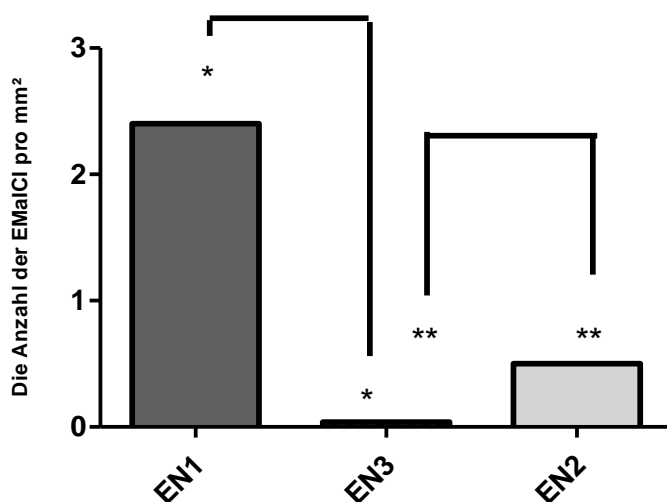
Ergebnisse



Grafik 1:

Verteilung der EMAI pro mm² innerhalb des Radius von 2 mm von EML in unterschiedlichen EM Formen (n=60) und in den Kontrollen (n=60); ** p<0,01, *p<0,05

Die Abradatmaterialien von Patientinnen mit peritonealer EM beinhalten eine signifikant erhöhte Anzahl der EMAI im Vergleich zur Anzahl der ICI der Endometriumproben von Patientinnen mit Adenomyose und den Endometriumkontrollproben (EN1 versus EN3 (2,4 ± 0,3 versus 0,04 ± 0,01), sowie eine sehr signifikant erhöhte Anzahl der EMAI (EN2 versus EN3 (0,5 ± 0,02 versus 0,04 ± 0,01)) (Graphik 2).



Grafik 2:

Verteilung der EMAI pro mm² im Endometrium von Patientinnen mit pEM (EN1), Endometrium von Adenomyose (EN2) und Endometrium von EM-freien Patientinnen (Uterus myomatosus) (EN3^K/UM) ** p<0,01, *p<0,05

Ergebnisse

Des Weiteren wurden bei den EMaICI die verschiedenen Größen dokumentiert. Zu besseren Unterscheidung und Charakterisierung wurden die EMaICI nach Größen aufgrund wissenschaftlicher Aspekte geordnet. Bei der pEM konnten 66,6% große, 16,7% mittelgroße und 16,7% kleine EMaICI ermittelt werden. Im Myometrium der Adenomyose konnten 50% große, 41,6% mittelgroße und 8,4% kleine EMaICI festgestellt werden. In der DIE Gruppe waren es 41,6% große, 50% mittelgroße und 8,4% kleine EMaICI. In der ovarielle EM befanden sich 50% große, 41,6% mittelgroße und 8,4% kleine EMaICI. In den Kontrollgruppen konnte 91% als kleine ICI beschrieben werden.

Die meisten und größten EMaICI fanden sich in den peritonealen EML. Im Myometrium der Adenomyose waren die EMaICI reduziert und kleiner im Vergleich zu anderen Endometrioseformen.

Die EMaICI im Endometrium von Patientinnen mit pEM (EN1/pEM) waren alle groß. Im Kontrast dazu zeigte das Endometrium von Adenomyose (EN2) lediglich 100 % kleine EMaICI. In den Kontrollgruppen waren auch kleine Infiltrate in allen Proben.

4.2 Immunhistochemische Charakterisierung von Immunzellen in Endometriose-assoziierten Infiltraten

4.2.1 Ektopes Endometrium

Mittels IHC-Färbung ließen sich die Immunzellen gut von Stromazellen differenzieren. So konnten folgende Immunzellen charakterisiert werden: T-Lymphozyten (CD3+, CD4+, CD8+, CD45RO+), B-Lymphozyten (CD20+) und Makrophagen (CD68+) (Tabelle 10).

4.2.1.1 T-Lymphozyten

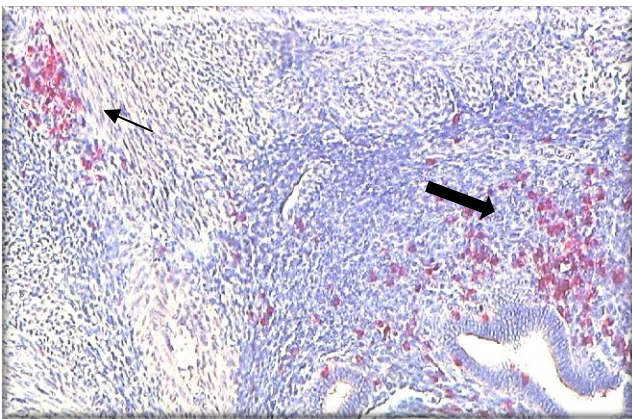


Abbildung 15:

Immunhistochemische Darstellung der läSIONSNah (rot, Blockpfeile)/läSIONSFern (rot, Pfeile) EMAIcI (T-Lymphozyten(CD3+)) in der peritonealen EML (Vergrößerung 40-fach).

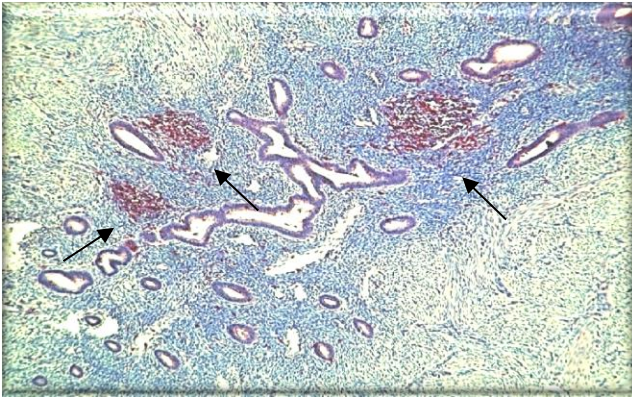


Abbildung 16:
Immunohistochemische Übersicht der EMAI (CD3+) in der Adenomyose (rot)
(Vergrößerung 10-fach).

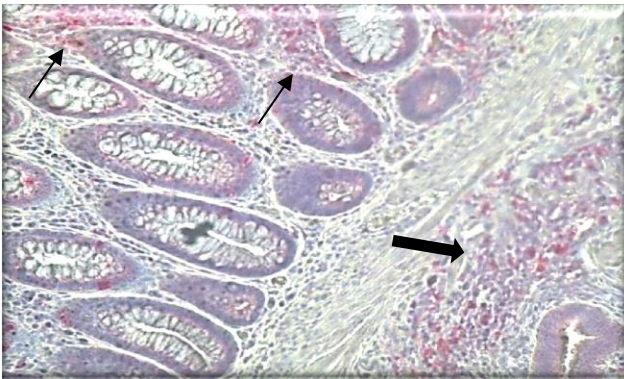


Abbildung 17:
Immunohistochemische Darstellung der EMA/CI (CD3+) in der rektovaginalen EM
(läsionsnah; rot). Zwei läsionsferne EMA/CI tief in der Mucosa der Darmwand (Pfeile).
(Vergrößerung 40-fach).

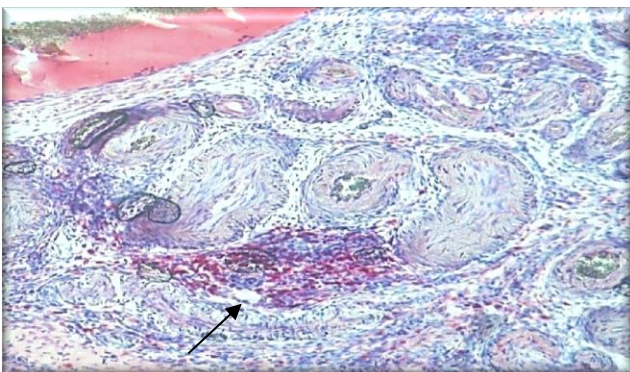


Abbildung 18:
Immunohistochemische Darstellung der EMA/CI (CD3+) in der Umgebung der ovariellen
EML (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

4.2.1.2 B-Lymphozyten

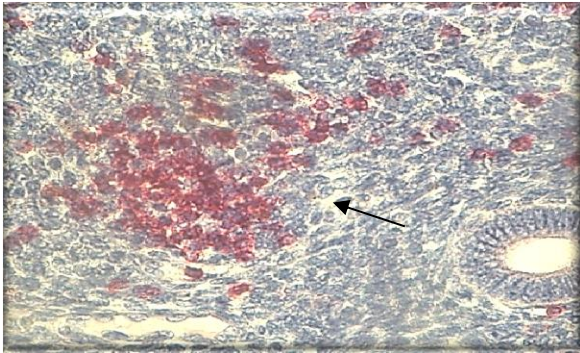


Abbildung 19:

Immunohistochemische Darstellung der CD20+(B-Lymphozyten) in EMalCI in einer pEML (läsionsnah) (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

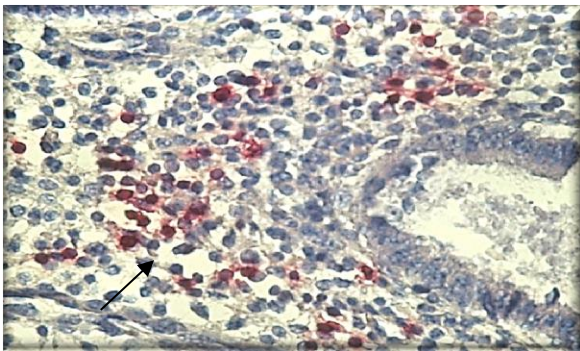


Abbildung 20:

Immunohistochemische Darstellung der CD20+(B-Lymphozyten) in EMalCI in der Adenomyose (läsionsnah) (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

4.2.1.3 Makrophagen

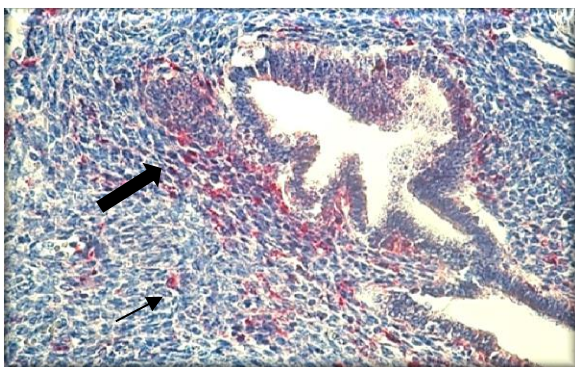


Abbildung 21:

Immunohistochemische Darstellung der CD68+ in EMalCI (läsionsnah)(Blockpfeile) und einzelne Zellen im Stroma der EML(Pfeile) in der pEML (Vergrößerung 40-fach).

Ergebnisse

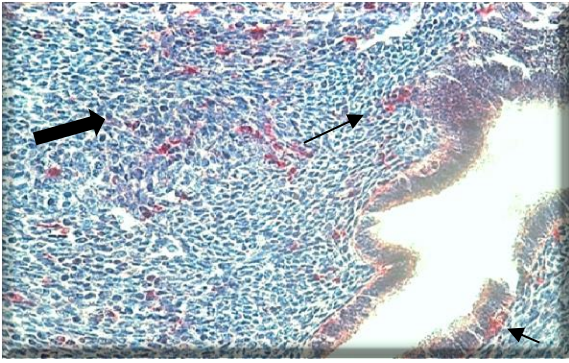


Abbildung 22:

Immunohistochemische Darstellung der CD68+ in EMalCI (läsionsfern)(Blockpfeile) und einzelne CD68+ Zellen im Stroma der EML in der pEML(Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

Eine wichtige Entdeckung war, dass auch nach mehrfachen Färbungen keine NK-Zellen (CD56+) und keine regulatorischen T-Zellen (IL-2 Rezeptor) (CD25+) in EMalCI nachweisbar waren. (Abbildung 23,24).

Die Abbildung 23 zeigt einen peritonealen EM-Herd mit einem EMalCI negativ für NK (CD56-). Es lassen sich zwei einzelne CD56+Zellen im Stroma der EML darstellen.

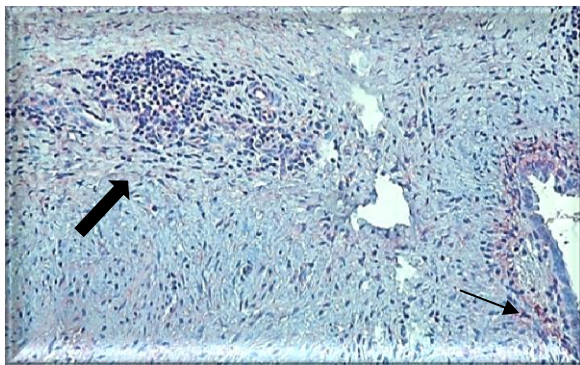


Abbildung 23:

Immunohistochemische Darstellung der EMalCI negativ für NK (CD56-) (Blockpfeile). Zwei CD56+ einzelne Zellen im Stroma der EML(Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

Ebenso waren keine regulatorischen T-Zellen (CD25+) in EMalCI zu erkennen. Es exprimierten lediglich einzelne disseminierte Zellen Foxp3+ und wurden so als T-reg Zellen charakterisiert (Abbildung 12).

Ergebnisse

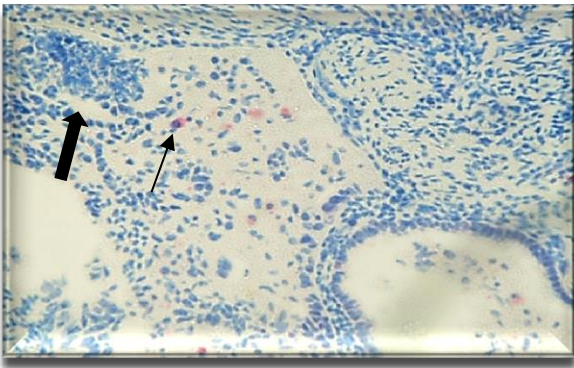


Abbildung 24:

Immunohistochemische Darstellung der EMAI CI negativ für IL-2 Rezeptor (T-regCD25-) (Blockpfeile). Einzelne CD25+ im Stroma der pEML (Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

Die Abbildung 25 A zeigt einen peritonealen EM-Herd mit einem EMAI CI, welcher negativ für B-Zellen war. Nach IHC Färbung zeigte das oben genannte EMAI CI eine positive Färbung für T-Zellen (rot).

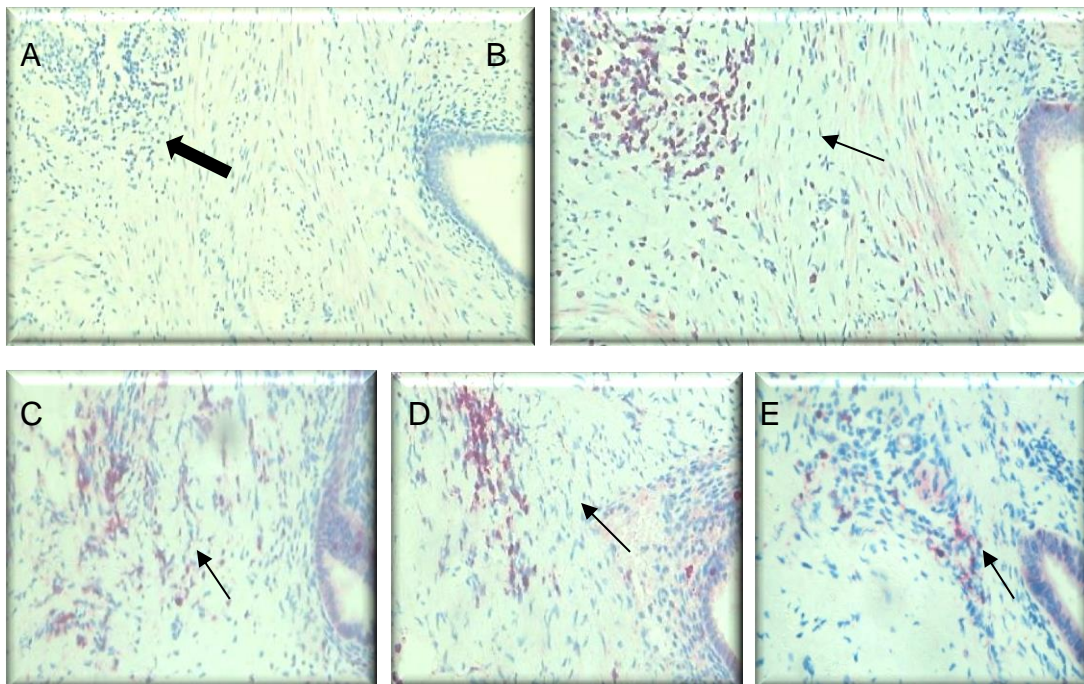


Abbildung 25:

In Serienschnitten Expression von Antikörpermarkern negativ für B-Zellen (CD20-) (Blockpfeile) (A) und positiv für T-Zellen (CD3+) (Pfeile) (B) in EMAI CI (rot, Pfeile); C. CD4+ (rot, Pfeile), D. CD8+ (rot, Pfeile), E. CD45RO+ (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

Ergebnisse

Auf der Abbildung 26 ist ein Ausschnitt aus der Peripherie einer pEM mit einem großen und einem kleinen CD3 positiv nach IHC Färbung ICI dargestellt.

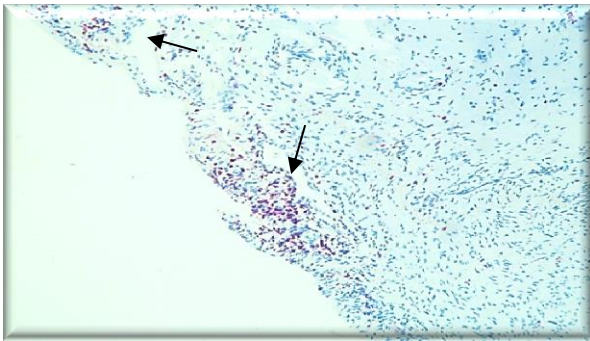


Abbildung 26:

Peripherie mit einem großen und einem kleinen ICI (CD3+) bei pEM (Vergrößerung 10-fach).

4.2.2 Eutopes Endometrium

Auf den Abbildungen sind CD3 + EMAICI (Abb. 27 A, B, C) im Endometrium von Patientinnen mit pEM (EN1), im Endometrium von Adenomyose (EN2) und im Endometrium von Uterus myomatosus (EN3^k) dargestellt.

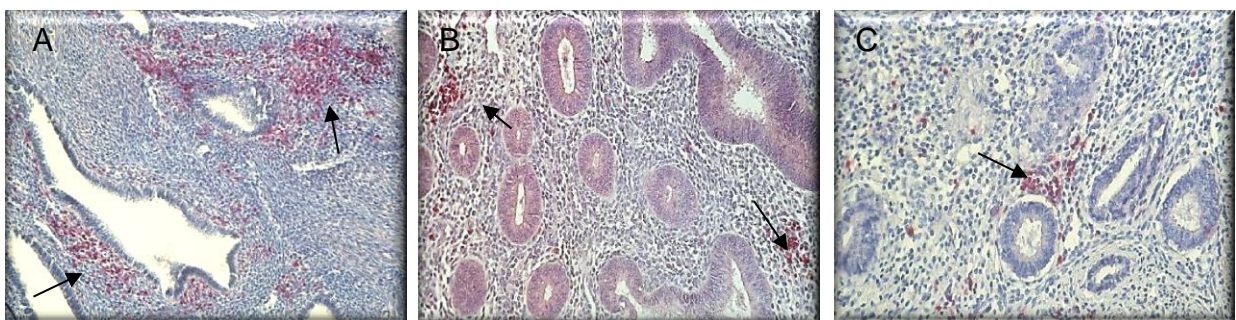


Abbildung 27:

Immunhistochemische Darstellung der CD3+ EMAICI in EN1 (Endometrium von Patientinnen mit pEM), EN2 (Endometrium von Adenomyose), EN3^k (Endometrium von EM-freien Patientinnen (Uterus myomatosus)) (rot, Pfeile) (Vergrößerung 20-fach).

Ergebnisse

Die verschiedenen Größen der EMaICI in immunhistochemischer Färbung sind in der Abbildung 28 dargestellt. Große EMaICI beinhalten mehr als 50 Immunzellen. Weniger als 50 Immunzellen bilden mittelgroße Infiltrate. Kleine EMaICI beinhalten weniger als 20 Immunzellen.

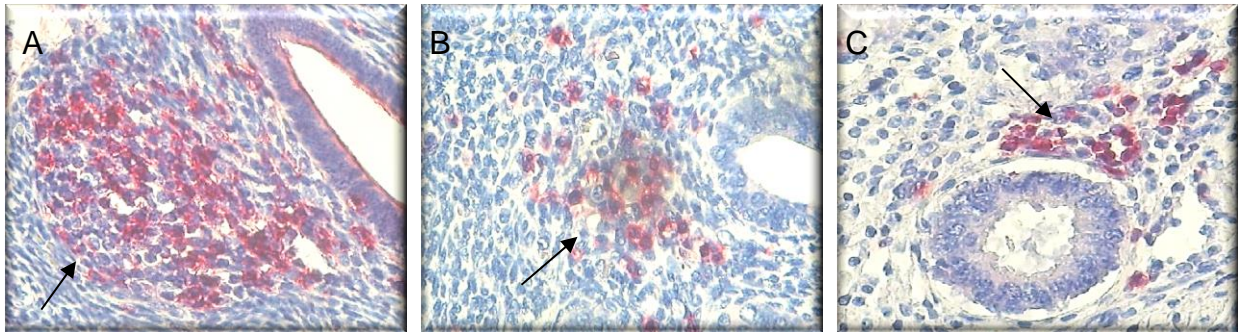


Abbildung 28:

Immunhistochemische Darstellung von EMaICI in verschiedenen Größen A. großes (> 50 Immunzellen) in der peritonealen EM, B. mittelgroßes ($50 <$ Immunzellen) Infiltrat in der peritonealen EM, C. kleines Infiltrat (< 20 Immunzellen) in Adenomyose, immunhistochemischer Marker CD3+ (T-Lymphozyten) (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).

Ergebnisse

Tabelle 10: Die immunhistochemische Verteilung der EMaCI pro mm² in unterschiedlichen EM-Formen und in verschiedenen Zyklusphasen und in den Kontrollen.

EM Formen EMaCI pro mm ²	p EM	NLP	p-Wert pEM/ NLP	M(AM)	M(UM)	p-Wert M(AM)/ M(UM)	DIE	NLD	Ov EM	NLO	p-Wert OvEM/ NLO	EN1 (pEM)	EN2 (AM)	EN3 ^k (UM)	p-Wert EN1/ EN3 ^k	p-Wert EN2/ EN3 ^k
CD3+ (p/s)	0,1 ±0,04 0,09/0,08	0,04 ±0,02	0,0045	0,04 ±0,02	0,004 ±0,003	0,0019	0,06 ±0,03	0,09 ±0,03	0,09 ±0,03	0,02 ±0,02	0,0075	0,09±0,03 0,09/0,06	0,02 ±0,01	0,004 ±0,004	0,005	0,0015
CD4+ (p/s)	0,09 ± 0,02 0,1/0,1	0,03 ±0,01	0,0035	0,03 ±0,01	0,003 ±0,002	0,0035	0,04 ±0,02	0,08 ±0,02	0,07 ±0,03	0,01 ±0,01	0,0015	0,08±0,02 0,06/0,09	0,01 ±0,001	0,003 ±0,003	0,005	0,0023
CD8+ (p/s)	0,08 ±0,02 0,08/0,09	0,02 ±0,01	0,0042	0,02 ±0,01	0,004 ±0,002	0,0032	0,03 ±0,02	0,08 ±0,02	0,06 ±0,03	0,01 ±0,01	0,008	0,08±0,02 0,09/0,07	0,01 ±0,001	0,004 ±0,004	0,005	0,0026
CD45RO+ (p/s)	0,003±0,001 0,003/0,003	0,004 ±0,004	0,0017	0,006 ±0,004	0,004 ±0,002	0,0035	0,004 ±0,002	0,03 ±0,01	0,04 ±0,02	0,006 ±0,003	0,0012	0,005±0,003 0,002/0,03	0,007 ±0,005	nd	nd	0,0035
CD68+ (p/s)	0,09 ±0,03 0,09/0,1	0,01 ±0,01	0,0032	0,05 ±0,03	0,004 ±0,002	0,005	0,06 ±0,03	0,03 ±0,01	0,08 ±0,04	0,002 ±0,002	0,004	0,04±0,03 0,03/0,029	0,01 ±0,01	0,002 ±0,002	0,004	0,0017
CD20+ (p/s)	0,08 ±0,06 0,09/0,1	0,004 ±0,02	0,0035	0,01 ±0,01	0,004 ±0,004	0,0015	0,009 ±0,004	0,05 ±0,03	0,06 ±0,03	0,001 ±0,001	0,0023	0,03±0,02 0,03/0,029	0,001 ±0,001	nd	nd	0,04

5 Diskussion

Die Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in das ektope Endometrium ist ein seit langem bekannter entzündlicher Prozess in der Pathogenese der Endometriose (35). Es finden sich neben den einzelnen Immunzellen aber auch Immunzellinfiltrate (ICI) in allen EM-Läsionen (EMaICI), die nochmals in läsionsnah und läsionsfern eingeteilt werden. Diese werden in dieser Arbeit erstmals beschrieben und charakterisiert.

Es finden sich vor allem vermehrt Lymphozyten und Makrophagen in den EMaICI. Die Lymphozyten scheinen allerdings das ektope Endometrium nicht zu attackieren oder beseitigen zu können. Im Gegenteil sie scheinen sogar eher ein weiteres proliferatives Wachstum zu fördern und unterstützen so möglicherweise die Persistenz des ektopen Gewebes (51).

Unsere Resultate zeigen, dass sich spezifische Untergruppen von EMaICI wie CD3+, CD4+, CD8+ Phenotypen in großer Anzahl besonders in peritonealen Endometriseläsionen, im Vergleich zu anderen Untergruppen der Immunzellen und anderen Lokalisationen der Endometriose, befinden. Die Frage, warum T-Lymphozyten Cluster bilden, bleibt noch unklar. Es gibt signifikante Unterschiede bezüglich der EMaICI in den Abradatmaterialien von Patientinnen mit peritonealer EM (eutopes Endometrium), wenn man diese mit Endometriumproben von Patientinnen mit Adenomyose und mit den Endometrium-Kontrollproben vergleicht. Viele Forscher berichten über Unterschiede zwischen dem eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose und dem Endometrium von endometriosefreien Frauen (29). Die große Anzahl von T-Zellen (CD3+, CD4+, CD8+) in den Endometrioseproben könnte theoretisch durch eine Störung des Immunsystems der Patientinnen erklärt werden, dass in der Regel die normale Anzahl der Zellen durch genetisch vorgegebene Limits aufweist. Die Verringerung der übrigen Endometriosezellen könnte ein innerer Kontrollmechanismus des menschlichen Körpers sein, um die spezifische Umgebung innerhalb des Cavum uteri zu erhalten. Der Umstand scheint auch aus der ektopischen Implantierung, der exorbitanten Anzahl von Endometriosezellen, und durch den Regurgitationsmechanismus des Menstruationsflusses vom Cavum uteri in Richtung Peritoneum zu resultieren (15).

Diskussion

In der Peripherie von peritonealen EML werden auch ICI nachgewiesen (Abbildung 14). Dies könnte erklären, warum die Patientinnen auch bei kleineren Herden schon diffus starke Schmerzen haben können. Man könnte die Frage stellen, ob die Immunzellen als Reaktion auf die ektopen Endometriumszellen aktiv werden, oder ob ein verändertes immunologisches Milieu die Voraussetzung für Endometrioseentstehung ist. Es bleibt unklar welche Kausalität hier zugrunde liegt, und eine Antwort darauf kann nicht gegeben werden.

Makrophagen gehören zur angeborenen Immunabwehr. Die Anzahl der Makrophagen ist in allen EML erhöht. Viele Forscher meinen, dass CD68+ Monozytes/Macrophages bei Endometriose-Patientinnen die Entwicklung der EML durch Aktivierung und Proliferation der Zytokin-stimulierten Zellen provozieren. Das könnte ein kompensatorischer Mechanismus aufgrund einer spezifischen Immunantwort sein (52, 53).

Die Subpopulationen von T-Lymphozyten, die IL-2R (CD25+Foxp3+) exprimieren, die sogenannten regulatorischen T-Zellen, konnten nicht in EMaICI nachgewiesen werden. Regulatorische T-Zellen (CD25+) Foxp3+ sind essentiell an der Homöostase des Immunsystems und an der Entstehung der Immunsuppression im Uterus beteiligt. CD25+Foxp3 Zellen sind im Stroma der pEML beschrieben worden, aber nicht in der Umgebung des Peritoneums (35). Immunologisch regulatorische T-Zellen hemmen durch IL-10 und TGF- β die T-Helfer (CD4+) und die zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+). Im normalen physiologischen Zustand können chronische T-Zell-Stimulationen schaden. Die fehlenden IL-2R können zu einer unkontrollierten Produktion von neuen T-Zellen führen. Außerdem scheinen es die fehlenden IL-2R nicht zu schaffen, die Proliferation von T-Zellen zu blockieren und erlauben das Überleben und die Implantation von Endometriosezellen.

Memory (CD45RO+) Zellen sind auch in EMaICI nachgewiesen worden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass T-Lymphozyten in ihrer Aktivität (54) unterschiedlich sind.

Weiterhin scheint die Anzahl an natürlichen Killerzellen (NK Zellen) (CD56+) in EMaICI stark reduziert zu sein. Metter et al. zeigten eine niedrige Anzahl von NK-Zellen im Endometrium von Patientinnen mit Endometriose (55). Das Fehlen der CD56+NK Zellen in EMaICI bedeutet, dass die NK Aktivität reduziert ist. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass sich NK-Zellen in niedriger Anzahl am Epithel und im Stroma mit

Diskussion

reduzierter Aktivität (4, 32, 55) befinden. Bei diesen Faktoren geht man davon aus, dass bei den NK die Fähigkeit fehlt, sich in Gruppen und zu Clustern zu formieren.

EMaICI, charakterisiert durch B-Lymphozyten (CD20+) sind groß und ihre Anzahl ist im Vergleich zum Kontrollendometrium erhöht. Die Anzahl von B-Lymphozyten bei Frauen mit EM könnte kausal für die erhöhte Anzahl von AK verantwortlich sein. Es wird immer wieder diskutiert, ob Endometriose auch durch Auto-AK moduliert wird und ursächlich dafür ist, dass das Immunsystem EM-Zellen nur ungenügend eliminiert (40). Die Produktion von unterschiedlichen Auto-AK kann eine Hauptursache für eine mögliche Sterilität der EM-Patientinnen sein (56).

In den AM ist sowohl die Anzahl der EMaICI signifikant reduziert als auch ihre Größe. In vielen vorausgehenden Studien wurde bewiesen, dass die AML mehr dem eutopen Endometrium ähneln als einem ektopen Endometrium.

Die Immuntheorie als mögliche Pathogenese der EM versucht die verschiedenen Arten der EM zu erklären. Es wird vermutet, dass die Immunzellen durch unbekannte Faktoren zur Ausbildung von Zellclustern mit unterschiedlichen Aktivitätsstadien stimuliert werden, wodurch eine stimulierte Invasion und ein zusätzliches Wachstumspotential vom EM-Gewebe außerhalb der Gebärmutter erfolgen.

Im Augenblick ist es noch unklar, welche spezifische Stimulation diese Immunreaktion hervorruft. Im Tierversuch wurde nachgewiesen, dass nach immunologischer Stimulation durch Komplementfaktoren und durch Zytokine im Uterusgewebe von Ratten, der chemotaktische Effekt daraus auf Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen induziert die Proliferation von Endometriumzellen (57) (58).

Bei der Endometriose existiert eine gestörte Homöostase im Sinne einer immunologischen Dysbalance oder Defekt. Es bleibt noch unklar ob die EMaICI durch Chemokine und Zytokine eine Entzündung provoziert, oder ob es eine Abwehrreaktion des Körpers darstellt (Abb. 29).

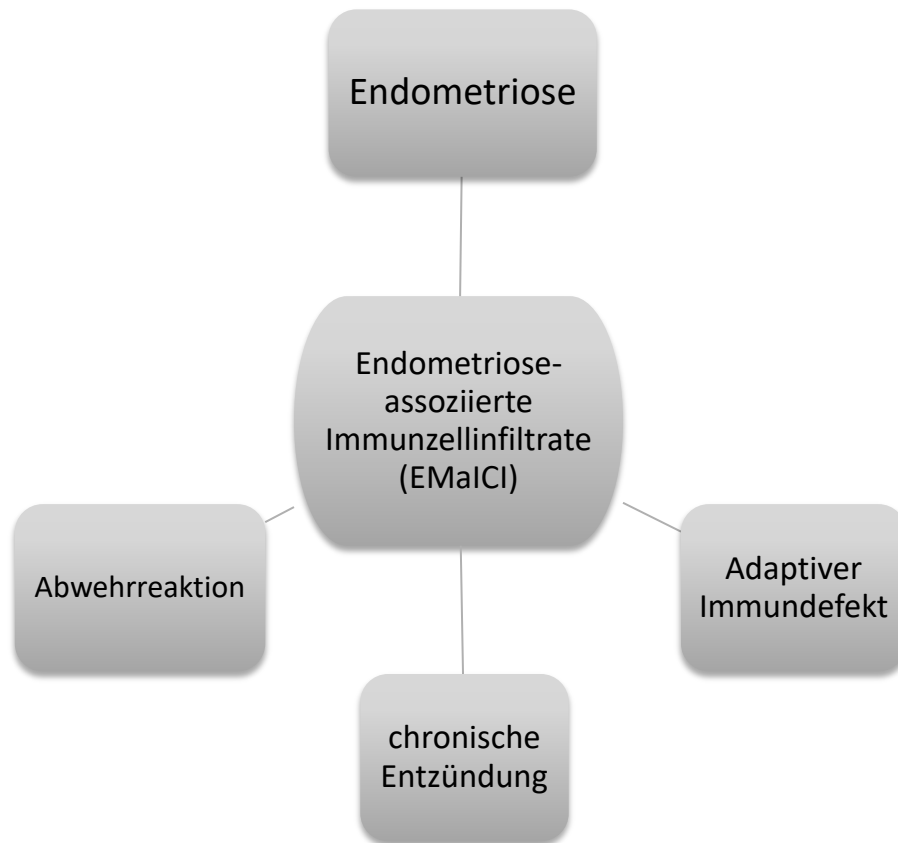


Abbildung 29:

Die immunologische Rolle der EMaCI in Endometriose

6 Zusammenfassung

Neben den bekannten T- und B- Lymphozyten und Makrophagen direkt am Epithel und den Stromazellen der EML fanden sich Endometriose-assoziierte Immunzellinfiltrate (EMaICI) in der Umgebung der EML (Radius 2 mm). Diese EMaICI konnten in allen EM-Formen (peritoneale Endometriose, Adenomyose, rektovaginale Endometriose (DIE) und ovarielle Endometriose) nachgewiesen werden.

Mittels IHC Färbung konnten die Immunzellen: T- Lymphozyten (CD3+, CD4+, CD8+, CD45RO+), B-Lymphozyten (CD20+) und Makrophagen (CD68+) charakterisiert werden. In allen EML waren im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollgeweben deutlich mehr EMaICI nachweisbar. Die meisten und größten EMaICI fanden sich in den peritonealen EML. In der Adenomyose waren die EMaICI reduziert und kleiner im Vergleich zu anderen Endometrioseformen. Nach mehrfachen Färbungen waren keine NK-Zellen (CD56-) und keine regulatorischen T-Zellen (CD25-, Foxp3-) in EMaICI nachweisbar.

Erstmals wurden Endometriose-assoziierte Immunzellinfiltrate (EMaICI) in verschiedenen Endometrioseläsionen immunhistochemisch charakterisiert (Abb.30). Es konnte erstmals systematisch gezeigt werden, dass neben bekannten singulären Immunzellen die Endometrioseläsionen von diesen ICI umgeben sind, die eine Umgebungsreaktion zeigen.

Neuen Theorien zufolge, spielt eine immunologische Komponente in der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle (4). Auffällig häufig findet man in unmittelbarer Umgebung von Endometrioseläsionen Immunzellinfiltrate, deren Rolle in der Pathogenese der Endometriose völlig ungeklärt ist. Fraglich ist, ob das Immunsystem ursächlich für die Pathogenese der Endometriose verantwortlich ist, oder ob übermäßig aktivierte retrograd menstruierende Zellen zu Endometriose führen.

Unbekannt ist auch, ob das Vorhandensein von Immuninfiltraten als inflammatorische Reaktion die Läsionen erweitert, oder ob vielleicht auch die Immunzellinfiltrate einfach eine Abwehrreaktion des Körpers repräsentieren.

Zusammenfassung

Die Lymphozyten sind die Waffen des Immunsystems. Ihre Aufgabe ist es, offensiv zu agieren und zu eliminieren, was fremd für sie ist oder sich nicht an der richtigen Stelle befindet. In diesem Fall schaffen es die Immunzellen nicht, das ektope Endometrium zu beseitigen. Je mehr ektopes Endometrium vorhanden ist, desto mehr Lymphozyten sind an diesen Stellen zu beobachten.

Endometriose ist ein komplexer Prozess und betrifft unterschiedliche Immunzellen, Zytokine und andere Immunmodulatoren. Eine weitere Analyse wäre erforderlich, um zu klären, ob in der Tiefe eine Zell-Zell-Interaktion bei der Endometriose stattfindet. Ein Nachweis dieser Interaktion könnte die Pathogenese der Endometriose in einem neuen Licht erscheinen lassen.

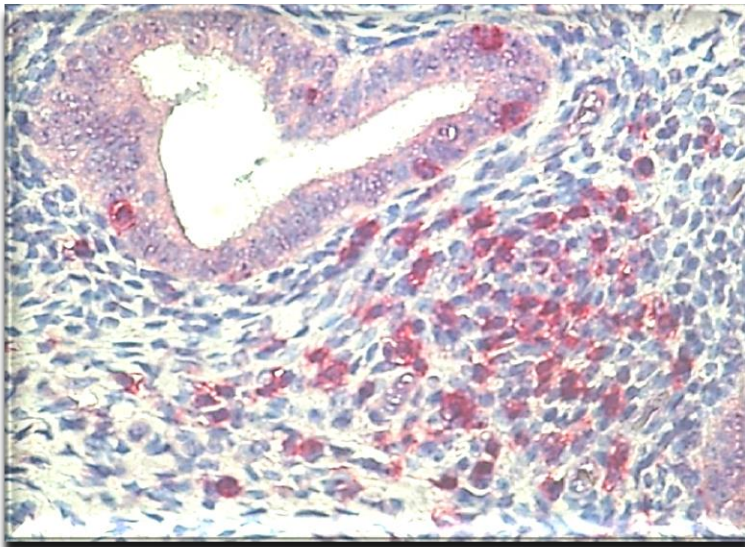


Abbildung 30:

CD8+ EMA1C1 (läsionsnah) in der peritonealen Endometriose. (Vergrößerung 40-fach).

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Veränderungen der Immunzellpräsenz in peripherem Blut (PB), peritonealer Flüssigkeit (PF), endometrialem Gewebe (ET) bei Patientinnen mit Endometriose.	7
Tabelle 2:	„Cluster of differentiation“ Antigene	11
Tabelle 3:	Klinische Daten I	13
Tabelle 4:	Klinische Daten II	15
Tabelle 5:	Gewebeproben.....	16
Tabelle 6:	Monoklonale Antikörper.....	18
Tabelle 7:	Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 8:	Geräte	22
Tabelle 9:	EMaICI in EML in verschiedenen Zyklusphasen und den Kontrollgruppen (H&E)	36
Tabelle 10:	Die immunhistochemische Verteilung der EMaICI pro mm ² in unterschiedlichen EM-Formen und in verschiedenen Zyklusphasen und in den Kontrollen	46

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	T-Lymphozyten (CD3+) am Epithel (A) und am Stroma (B) (rot, Pfeile) einer EML (Vergrößerung 40-fach).	6
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Marker auf der Oberfläche der T-Zellen.	9
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Immunzellen A. T-Zelle B. Makrophage C. B-Zelle (aus Telekolleg Biologie)	10
Abbildung 4:	A. Dickdarmresektat LK mit CD3+ Zellen B. Dickdarmresektat LK-negativ Kontrolle CD3- Zellen Verdünnung 1:20 Vergrößerung 40-fach.....	27
Abbildung 5:	A. Sigmaresektat LK mit CD4+ Zellen B. Sigmaresektat LK-negativ Kontrolle CD4- Zellen Verdünnung 1:20 Vergrößerung 40-fach	28
Abbildung 6:	A. Ileocoecalresektat LK mit CD8+ Zellen B. Ileocoecalresektat LK-negativ Kontrolle CD8- Zellen Verdünnung 1:50 Vergrößerung 40-fach	28
Abbildung 7:	A. Darm LK mit CD20+ Zellen B. Darm LK-negativ Kontrolle CD20-Zellen Verdünnung 1:50 Vergrößerung 40-fach	29
Abbildung 8:	A. Mesocoecaler LK mit CD68+ Zellen B. Mesocoecaler LK-negativ Kontrolle CD68- Zellen Verdünnung 1:200 Vergrößerung 40-fach.....	29
Abbildung 9:	A. Ileocoecalresektat LK mit CD56+ Zellen B. Ileocoecalresektat LK-negativ Kontrolle CD56- Zellen Verdünnung 1:20 über Nacht Vergrößerung 40-fach	30
Abbildung 10:	A. Dickdarmresektat LK mit CD25+ Zellen B. Dickdarmresektat LK-negativ Kontrolle CD25- Zellen Verdünnung 1:50 Proteinase K..... Vergrößerung 40-fach.....	30
Abbildung 11:	A. LK+ mit CD45RO+Zellen B. LK-negativ Kontrolle CD45RO-Zellen LSAB- Method Ready-to-use AK Vergrößerung 40-fach.....	31
Abbildung 12:	Im Stroma der peritoneale EM wurden einzelne Foxp3+Zellen dokumentiert (braun, Pfeile) und keine EMAICI positiv für Foxp3+ Zellen. Vergrößerung 100-fach..	32
Abbildung 13:	EML Darstellung mit einem EMAICI (läsionsnah) und zwei EMAICI (läsionsfern) (H&E, Vergrößerung 10-fach).....	34

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 14:	Peripherie von peritonealer EM mit ICI (Pfeile) (H&E, Vergrößerung 10-fach).	34
Abbildung 15:	Immunhistochemische Darstellung der läsionsnah (rot, Blockpfeile) /läsionsfern (rot, Pfeile) EMaICI (T-Lymphozyten(CD3+)) in der peritonealen EML (Vergrößerung 40-fach).....	39
Abbildung 16:	Immunhistochemische Übersicht der EMaICI (CD3+) in der Adenomyose (rot) (Vergrößerung 10-fach).	40
Abbildung 17:	Immunhistochemische Darstellung der EMaICI (CD3+) in der rektovaginalen EM (läsionsnah; rot). Zwei läsionsferne EMaICI tief in der Mucosa der Darmwand (Pfeile). (Vergrößerung 40-fach).	40
Abbildung 18:	Immunhistochemische Darstellung der EMaICI (CD3+) in der Umgebung der ovariellen EML (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach). ...	40
Abbildung 19:	Immunhistochemische Darstellung der CD20+(B-Lymphozyten) in EMaICI in einer pEML (läsionsnah) (rot, Pfeile) Vergrößerung 40-fach	41
Abbildung 20:	Immunhistochemische Darstellung der CD20+(B-Lymphozyten) in EMaICI in der Adenomyose (läsionsnah) (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).	41
Abbildung 21:	Immunhistochemische Darstellung der CD68+ in EMaICI (läsionsnah)(Blockpfeile) und einzelne Zellen im Stroma der EML(Pfeile) in der pEML (Vergrößerung 40-fach).....	41
Abbildung 22:	Immunhistochemische Darstellung der CD68+ in EMaICI (läsionsfern)(Blockpfeile) und einzelne CD68+ Zellen im Stroma der EML in der pEML(Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).....	42
Abbildung 23:	Immunhistochemische Darstellung der EMaICI negativ für NK (CD56-) (Blockpfeile). Zwei CD56 + einzelne Zellen im Stroma der EML(Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).....	42
Abbildung 24:	Immunhistochemische Darstellung der EMaICI negativ für IL-2 Rezeptor (T-regCD25-) (Blockpfeile). Einzelne CD25+ im Stroma der pEML (Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).	43
Abbildung 25:	In Serienschnitten Expression von Antikörpermarkern negativ für B-Zellen (CD20) (Blockpfeile) (A) und positiv für T-Zellen (CD3+) (Pfeile) (B) in EMaICI (rot, Pfeile); C. CD4+ (rot, Pfeile), D. CD8+ (rot, Pfeile), E. CD45RO+ (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).....	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26:	Peripherie mit einem großen und einem kleinen ICI (CD3+) bei pEM (Vergrößerung 10-fach).....	44
Abbildung 27:	Immunhistochemische Darstellung der CD3+EMaICI in EN1 (Endometrium von Patientinnen mit pEM), EN2 (Endometrium von Adenomyose), EN3 ^k (Endometrium von EM-freien Patientinnen (Uterus myomatosus)) (rot, Pfeile) (Vergrößerung 20-fach).....	44
Abbildung 28:	Immunhistochemische Darstellung von EMaICI in verschiedenen Größen A. großes (> 50 Immunzellen) in der peritonealen EM, B. mittelgroßes (50< Immunzellen) Infiltrat in der peritonealen EM, C. kleines Infiltrat (<20 Immunzellen) in Adenomyose, immunhistochemischer Marker CD3+ (T-Lymphozyten) (rot, Pfeile) (Vergrößerung 40-fach).....	45
Abbildung 29:	Die immunologische Rolle der EMaICI in Endometriose	50
Abbildung 30:	CD8+EMaICI (läsionsnah) in der peritonealen Endometriose (Vergrößerung 40-fach).....	52

9 Grafikverzeichnis

Grafik 1:	Verteilung der EMaICI pro mm ² innerhalb des Radius von 2 mm von EML in unterschiedlichen EM Formen (n=60) und in den Kontrollen (n=60); ** p<0,01, *p<0,05.....	37
Grafik 2:	Verteilung der EMaICI pro mm ² im Endometrium von Patientinnen mit pEM (EN1), Endometrium von Adenomyose (EN2) und Endometrium von EM-freien Patientinnen (Uterus myomatosus) (EN3/UM ^k) ** p<0,01, *p<0,05	37

10 Literaturverzeichnis

1. E. Ronald Batt M., Ph. D. A History of Endometriosis 2011.
2. Knapp VP, FaS J. How Old is Endometriosis? 1999.;72:pp10-4.
3. Schindler, AE. Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose. J. Fertil Reprod. 2007;17::22-7.
4. Dmowski, WP., Steele, RW., Baker, GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. Am J. Obstet Gynecol 1981;141:377-83.
5. Clement PB. Pathology of endometriosis. Pathol. Annu.1990;25 Pt 1:245-95.
6. Audebert A., Backstrom T., Barlow, DH, Benagiano, G., Brosens I., Buhler, K. et al. Endometriosis 1991: a discussion document. Hum Reprod 1992;7:432-5.
7. Rokitansky C. Über Uterusdrüsen-Neubildung im Uterus und Ovarialsarkomen. Gesellschaft der Ärzte in Wien 1860;16:577-81.
8. Cullen, T. Adeno-myoma of the round-ligament. Johns Hopkins Hospital Bulletin 1896;VII:112-14.
9. Pfannenstiel, J. Über die Adenomyoma, etc. Verhdlg der Deutschen Ges. f. Gynäkologie, Leipzig 1897:195.
10. Meyer, R. Über entzündliche neterope Epithelwucherungen im weiblichen Genitalgebiet und über eine bis in die Wurzeln des Mesocolon ausgedehnte benigne Wucherung des Darmepithels. Virch. Arch. Pathol. Anat. 1909:195-487.
11. Meyer, R. Über eine adenomatöse Wucherung der Serosa in einer Bauchnarbe Z. Geburtshilfe Gynäkol. 1903.
12. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1996;67:817-21.
13. Bd. IV. Verlag Urban und Schwarzenberg B., Innsbruck, München, Wien 1955:190–288.
14. Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Greb R, Kandolf O, Mangold R, Masetti W, Neis K, Rauter G, Reeka N, Richter O, Schindler AE, Sillem M, Terruhn V, Tinne- berg HR. [ENZIAN-score,

- a classification of deep infiltrating endometriosis]. Zentralbl Gynakol 2005; 127: 275–81.
15. Meyer R. Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im Allgemeinen und insbesondere über Adenomyosis Serosa Epithelialis und Endenomyometritis sarcomatosa. Zentralbl. Gynäkol.1919;43:745-50.
 16. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. Am J Pathol 1927;3:93-110 43.
 17. Keettel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. Am J Obstet Gynecol 1951;61:440-2.
 18. Ridley JH, Edwards IK. Experimental endometriosis in the human. Am J Obstet Gynecol 1958;76:783-9; discussion 9-90.
 19. Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Herbertz M, Mall G. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. Hum Reprod Update 1998;4:752-62.
 20. Koninckx PR, Ide P, Vandenbroucke W, Brosens IA. New aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. J Reprod Med 1980;24:257-60.
 21. Bulun SE. Endometriosis. N Engl J Med 2009;360:268-79.
 22. Ebert AD. Endometriose: Ein Wegweiser für die Praxis. Walter de Gruyter Verlag 2006.
 23. Starzinski-Powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, Baumann R. In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology. Curr Mol Med 2001;1:655-64.
 24. Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. Arch Gynecol Obstet 2009;280:529-38
 25. Netter FH. Netters Gynäkologie. Thieme 2005:252.
 26. Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. Am J Reprod Immunol;65:1-10.
 - 27 Morris H, Edwards J, Tiltman A, Emms M. Endometrial lymphoid tissue: an immunohistological study. J Clin Pathol 1985;38:644-52.

Literaturverzeichnis

28. Kamat BR, Isaacson PG. The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 1987;127:66-73.
29. Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996;2:371-84.
30. Witz CA, Montoya IA, Dey TD, Schenken RS. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:173-9.
31. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Koninckx PR. Immunohistochemical characterization of leucocyte subpopulations in endometriotic lesions. *Arch Gynecol Obstet* 1993;253:197-206.
32. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991;56:45-51.
33. Startseva NV. [Clinical immunological aspects of genital endometriosis]. *Akush Ginekol (Mosk)* 1980:23-6.
34. Jones RK, Bulmer JN, Searle RF. Immunohistochemical characterization of stromal leukocytes in ovarian endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal endometrium. *Fertil Steril* 1996;66:81-9.
35. Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, Tokushige N, Ganewatta S, Markham R et al. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod*;25:900-7.
36. Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 1980;23:885-93.
37. Isaacson KB, Coutifaris C, Garcia CR, Lyttle CR. Production and secretion of complement component 3 by endometriotic tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:1003-9.
38. Antsiferova YS, Sotnikova NY, Posiseeva LV, Shor AL. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84:1705-11.

39. Halme J, White C, Kauma S, Estes J, Haskill S. Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:1044-9.
40. Surrey ES, Halme J. Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation in vitro: a model for endometriosis? *Fertil Steril* 1991;56:672-9.
41. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75:1-10.
42. Szylo K, Tchorzewski H, Banasik M, Glowacka E, Lewkowicz P, Kamber-Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm* 2003;12:131-8.
43. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
44. Reiner SL, Seder RA. T helper cell differentiation in immune response. *Curr Opin Immunol* 1995;7:360-6.
45. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101:455-8.
46. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317-26.
47. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68-73.
48. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001;276:37672-9.
49. Beverley PC. CD45 isoform expression: implications for recirculation of naive and memory cells. *Immunol Res* 1991;10:196-8.

Literaturverzeichnis

50. Clement LT. Functional and phenotypic properties of 'naive' and 'memory' CD4+ T cells in the human. *Immunol Res* 1991;10:189-95.
51. Wang Y, Zhang L, Wang X. [Study on the distribution of lymphocyte subsets in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2001;36:85-8.
52. Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:139-47.
53. Braun DP, Muriana A, Gebel H, Rotman C, Rana N, Dmowski WP. Monocyte-mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61:78-84.
54. Mettler L, Volkov NI, Kulakov VI, Jurgensen A, Parwaresch MR. Lymphocyte subsets in the endometrium of patients with endometriosis throughout the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol* 1996;36:342-8.
55. Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* 1994;62:1086-8.
56. Gleicher, N., Eiel-Roeiy, A., Confino, E and Friberg, J. Reproductive failure because of autoantibodies, unexplained infertility and pregnancy wastage. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1989;160: 1376-1385.
57. Badawy SZ, Cuenca V, Stitzel A, Jacobs RD, Tomar RH. Autoimmune phenomena in infertile patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984;63:271-5.
58. Isaacson KB, Xu Q, Lyttle CR. The effect of estradiol on the production and secretion of complement component 3 by the rat uterus and surgically induced endometriotic tissue. *Fertil Steril* 1991;55:395-402.

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Petia Bauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung Endometriose-assoziiertes Immunzellinfiltrates (EMaICI) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 27.03.17

Unterschrift:

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13 Publikationsliste

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Petia Bauer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Scheerer C, **Bauer P**, Chiantera V, Sehouli J, Kaufmann A und Mechsner S
Characterization of endometriosis-associated immune cell infiltrates (EMaICI).

Gynecol Obstet. 2016 Sep; 294(3):657-64.

- Die praktische Arbeit und der immunhistochemischen Färbungen
- Die mikroskopische Auswertung der Präparate und die Resultate (insbesondere Bilder, Abbildungen, Graphiken und Tabellen, statistische Aufarbeitung)
- Interpretation und Diskussion der gewonnenen Daten und Mitarbeit bei der Erstellung der Publikation

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

14 Danksagung

Mein Dank richtet sich an erster Stelle an Frau Prof. Mechsner, die es mir ermöglichte in Ihrem Endometrioselabor diese Doktorarbeit durchzuführen und mich während dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützte.

Auch gilt mein Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann, der mir in den immunologischen Fragen zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen schon promovierten Doktoranten, die durch Ihre Hilfsbereitschaft mir die Arbeit sehr erleichtert haben.

Ich bedanke mich auch bei Fr. Evelyne Koch für die Textkorrektur und Herrn Özgür Bagdemir für die Unterstützung bei der grafischen Gestaltung und Formatierung dieser Arbeit.

Besonderen Dank gilt meinem Ehemann der mich in allen Phasen dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat.

Schlussendlich bedanke ich mich bei meinen Angehörigen, die mir den benötigten Freiraum schufen, um diese Arbeit zu vollenden.

Ohne die oben genannten Menschen würde diese Doktorarbeit nicht existieren.

Vielen, vielen Dank!

Petia Bauer