

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die funktionellen Mechanismen der Ausbreitung von Endometriose

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ada Leoni Terres-Wurtz  
aus Saarbrücken-Dudweiler

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

01. September 2023

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURDISKUSSION.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Das Krankheitsbild der Endometriose.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Definition.....	3
2.1.2	Epidemiologie.....	3
2.1.3	Histopathologie und Lokalisation.....	4
2.1.4	Klassifikation.....	5
2.1.5	Klinik, Diagnostik und Therapie.....	7
<b>2.2</b>	<b>Die Ätiopathogenese der Endometriose.....</b>	<b>11</b>
2.2.1	Theorien der Pathogenese.....	11
2.2.2	Bedeutung der Mikroumgebung.....	15
2.2.2.1	Peritonealflüssigkeit (PF).....	16
2.2.2.1.1	Follikelflüssigkeit (FF).....	17
<b>2.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>22</b>
3.1.1	Substanzen.....	22
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3	Gebrauchsmaterialien.....	23
3.1.4	Geräte.....	24
3.1.5	Puffer und Lösungen.....	25
3.1.6	Kits.....	25
3.1.7	Proteine.....	25
3.1.8	Antikörper.....	25
3.1.9	Zelllinie.....	25
3.1.10	Software.....	26
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Zellkultur.....	26
3.2.1.1	Steriles Arbeiten.....	26
3.2.1.2	Kultivierung der Zelllinie 12Z.....	26

3.2.1.3	Passagieren.....	27
3.2.1.4	Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen.....	27
3.2.1.5	Zellzahlbestimmung.....	28
3.2.2	Folikelflüssigkeit .....	28
3.2.3	Bestimmung des Kontrollmediums .....	29
3.2.4	Behandlung von 12Z für funktionelle Zellanalysen.....	29
3.2.5	Zellviabilität .....	30
3.2.6	Zellproliferation.....	30
3.2.7	Zellmigration.....	31
3.2.8	Immunzytochemische Färbung der Zellen .....	32
3.2.9	Durchflusszytometrie .....	33
3.2.10	Statistik.....	34
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
4.1	Quantifizierung von Komponenten aus FF1, FF2 und FF3.....	35
4.2	Bestimmung des Kontrollmediums .....	36
4.3	Bedeutung von FF für zelluläre Prozesse der Krankheitsentstehung.....	38
4.3.1	Einfluss von FF auf die Zellviabilität.....	38
4.3.2	Einfluss von FF auf die Zellproliferation .....	43
4.3.3	Einfluss von FF auf die chemotaktische Zellmigration .....	48
4.3.3.1	Chemotaktische Zellmigration nach FF-Behandlung.....	48
4.3.3.2	Chemotaktische Zellmigration in Richtung FF.....	50
4.3.4	Einfluss von FF auf die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin .....	52
4.4	Bedeutung der FF-Komponente IL-8 als Chemotaxin.....	54
4.4.1	Einfluss von FF auf die Expression von CXCR1 und CXCR2 .....	54
4.4.2	Chemotaktische Zellmigration unter CXCR1- und CXCR2-Inhibition .....	58
4.4.2.1	Migration mit IL-8 als Chemotaxin.....	58
4.4.2.2	Migration mit FF als Chemotaxin .....	59
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
5.1	Auswirkungen von FF auf die Zellviabilität .....	62
5.2	Auswirkungen von FF auf die Zellproliferation .....	64
5.3	Auswirkungen von FF auf die chemotaktische Zellmigration.....	65

---

5.4	Die Bedeutung der FF-Komponente IL-8 als Chemotaxin .....	68
5.5	Ausblick .....	72
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>86</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	86
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	88
8.3	Tabellenverzeichnis .....	89
8.4	Werte/Rohdaten.....	90
8.5	Tabellarischer Lebenslauf .....	104
8.6	Danksagung.....	106

## 1 Einleitung

Endometriose ist eine häufige gynäkologische Erkrankung von Frauen im gebärfähigen Alter, welche durch das Vorkommen von Endometriumgewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle gekennzeichnet ist (1). Zu den klinischen Erscheinungsformen gehören vor allem chronische Unterleibsschmerzen, Dysmenorrhoe und Unfruchtbarkeit, was erhebliche soziale sowie ökonomische Auswirkungen zur Folge hat (2, 3). Obwohl Endometriose als eine hormonabhängige und gutartig ausbreitende Erkrankung eingestuft wird, teilt sie einige typische Charakteristika mit bösartigen Tumoren. So kann es durch Zellmigration, -invasion, vermehrter Zellproliferation und Neoangiogenese sogar zu metastasenähnlichen Absiedlungen im Körper kommen. Derzeitige therapeutische Ansätze beruhen auf chirurgischen und hormonellen Eingriffen, welche häufig Nebenwirkungen hervorrufen und hohe Rezidivraten aufweisen (4). Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapien mit heilendem Ansatz ist das Verständnis der funktionellen Mechanismen, die an der Entstehung und Progression von Endometriose beteiligt sind.

Nach aktuellen Erkenntnissen zur Pathogenese handelt es sich bei Endometriose um eine multifaktorielle Erkrankung. Die am meisten akzeptierte Theorie über den Ursprung der ektopen Zellen ist die retrograde Menstruation. Da diese bei mehr als 90 % aller Frauen im gebärfähigen Alter auftritt, geht man davon aus, dass die Endometriose zusätzlich durch genetische und epigenetische Defekte ausgelöst wird (5). Für peritoneale Endometrioseherde impliziert dieser Vorgang, dass Faktoren aus der Mikroumgebung über die Dysregulation einiger Signalkaskaden die Entstehung und Ausbreitung der Erkrankung beeinflussen. Daher rückt die Peritonealflüssigkeit (**PF**) als Mikroumgebung innerhalb der Peritonealhöhle in den Fokus weiterer Forschung. Es konnten zahlreiche Hinweise zu immunologischen Veränderungen der PF gesammelt werden, welche zu einer Toleranz der ektopen Zellfragmente in der Peritonealhöhle führen und zur Stimulierung des weiteren Wachstums anregen (6).

Die Follikelflüssigkeit (**FF**) vermischt sich nach dem Eisprung mit der PF und stellt somit einen Teil der Mikroumgebung dar. Auch in der FF von Frauen mit Endometriose konnte ein verändertes immunologisches Profil festgestellt werden (7). Hierbei ist jedoch unklar, ob sich dieses als Folge der Erkrankung manifestiert oder als „Spiegelbild“ einer systemischen Entzündung und damit auch als Ursache der Erkrankung angesehen werden kann. In diesem Zusammenhang fehlen Kenntnisse des funktionellen Mechanismus verschiedener FF-Komponenten mit Auswirkungen auf Endometriumzellen. Bei Frauen mit Endometriose konnte neben einer gestörten Funktion der natürlichen Killerzellen eine veränderte Funktion von Makrophagen mit verstärkter Sekretion von Entzündungsmediatoren, hierunter vor allem

Interleukin 6, 8 und 12, festgestellt werden (8, 9). Die erhöhte Konzentration von Interleukinen fördert die Entwicklung einer entzündlichen Mikroumgebung in der Peritonealhöhle und könnte die Ansiedlung sowie das weitere Wachstum bestehender Endometrioseherde stimulieren. *In vitro*-Studien mit Untersuchung des Effekts von FF und einzelner Komponenten wurden überwiegend mit endometriotischen Stromazellen durchgeführt. Da jedoch neben den Stromazellen in erster Linie die hormonabhängigen epithelialen Endometriosezellen für das Krankheitsbild verantwortlich sind, sind diese Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von FF auf das funktionelle Verhalten von epithelialen Endometriosezellen untersucht. Um genauere Rückschlüsse auf den chemotaktischen Effekt der FF schließen zu können, wurde die Rolle der FF-Komponente Interleukin-8 bei der Ausbreitung der Erkrankung überprüft. Die vorliegende Studie soll zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Endometriose und zu neuen Methoden der Prävention und Therapie beitragen.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Das Krankheitsbild der Endometriose**

#### **2.1.1 Definition**

Endometriose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Frau (6). Histopathologisch wird das Krankheitsbild durch das Vorkommen endometriumähnlicher Zellverbände außerhalb ihrer physiologischen Lokalisation, der Gebärmutterhöhle, definiert. Die ektop wachsenden Zellverbände bestehen aus epithelialen Drüsen, Stromazellen sowie glatter Muskulatur und werden durch Nervenfasern, Lymphgefäße und Blutgefäße versorgt (1). Die Erkrankung wird durch ein hormonabhängig, gutartig proliferierendes Wachstum von Endometriosezellen bei Frauen im reproduktionsfähigem Alter beschrieben (10). Obwohl Endometriose als benigne Erkrankung eingestuft wird, lassen sich molekularbiologische Charakteristika eines bösartig wachsenden Tumors erkennen (11). So besitzen versprengte Endometriosezellen die Fähigkeit, an Strukturen im Bauchraum zu adhären und progressiv ins Gewebe einzuwandern (12, 13). Auch metastasenähnliche Absiedlungen in extraperitonealen Organen, wie zum Beispiel in der Lunge oder dem Gehirn, wurden in Tierversuchsmodellen sowie beim Menschen beschrieben (14, 15). Endometriose ist mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen assoziiert, und sehr selten können sich auf dem Boden der Erkrankung maligne Ovarialkarzinome des serösen klarzelligigen oder endometroiden, invasiven Subtyps entwickeln (10, 16). Endometriose gilt heute nicht mehr als rein gynäkologische Erkrankung im Becken, sondern als systemische Erkrankung, die den Stoffwechsel in Leber und Fettgewebe beeinträchtigt, zu systemischen Entzündungen führen und mit einer Schmerzsensibilisierung und Stimmungsstörungen einhergehen kann (17).

#### **2.1.2 Epidemiologie**

Nach dem Uterusmyom ist Endometriose die zweithäufigste benigne gynäkologische Erkrankung (18). Dies spiegelt sich in den hohen Ausgaben des Gesundheitssystems für Patientinnen mit Endometriose wider (19). Eine Studie in den USA schätzt die durch Endometriose verursachten Kosten im Jahr 2009 auf 69,4 Milliarden US-Dollar (20). Die hohe finanzielle Belastung entsteht unter anderem durch die langjährige Latenzzeit zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnose. So vergehen in Deutschland und Österreich durchschnittlich 10 Jahre bis zur endgültigen Diagnosesicherung (21). Des Weiteren stellt die kostspielige Behandlung der chronisch progressiv verlaufenden Erkrankung einen großen Teil der Kosten dar. Auch indirekte Kosten durch die psychische Belastung mit Einschränkung der Lebensqualität und der daraus folgenden Arbeitsunfähigkeit tragen zu den Gesamtkosten der Erkrankung bei (3, 22, 23). Genaue Angaben zur Prävalenz sowie Inzidenz der Erkrankung sind aufgrund des teils asymptomatischen Krankheitsverlaufs und der Notwendigkeit eines



operativen Eingriffes zur Diagnosesicherung nur bedingt möglich. Schätzungen zufolge sind ungefähr 1-10 % aller Frauen im fertilen Alter betroffen, mit einer Inzidenz von 2-7/1.000 Frauen pro Jahr (24, 25). Die Prävalenz bei Frauen mit Endometriose, welche unter chronischen Unterleibsschmerzen oder an Unfruchtbarkeit leiden, liegt etwa zwischen 35 und 50 % (26). Weltweit sind circa 176 Millionen Frauen betroffen, wobei in Deutschland jährlich ungefähr 40.000 Neuerkrankungen gezählt werden (27, 28).

### 2.1.3 Histopathologie und Lokalisation

Sowohl das mikroskopische als auch das makroskopische Erscheinungsbild der Endometriose zeigen sich sehr heterogen. Ein typisches histologisches Merkmal ist das Vorhandensein von glandulären Epithelzellen und Stromazellen. Die Endometrioseherde können jedoch auch fibrotisches Gewebe, hämosiderinbeladene Makrophagen, Blut oder Zysten enthalten. Morphologisch ähneln die ektopen Läsionen den eutopen Zellen innerhalb des Endometriums. Sie variieren von weniger differenzierten Zellen ohne Hormonrezeptoren zu hochdifferenzierten, teils proliferativ und sekretorisch aktiven Drüsen (29). Je nach Differenzierungsstatus wurden uneinheitliche Reaktionen der Herde auf die zyklischen Hormoneinflüsse beobachtet. Hochdifferenzierte Drüsen- und Stromazellen unterliegen denselben hormonabhängigen, zyklischen Veränderungen wie das uterine Endometrium mit der Folge einer chronischen lokalen Einblutung (30). Diese innere Blutung, welche den Körper nicht verlassen kann, führt mit der Zeit zu lokalen Entzündungsreaktionen mit der Bildung von Adhäsionen und Narbengewebe (31).

Die Endometrioseherde können an verschiedenen Stellen im Körper vorkommen. Je nach Ort ihres Auftretens unterteilt man diese in drei Gruppen (32).

Die *Endometriosis genitalis interna* beschreibt die Manifestation innerhalb des Myometriums der Gebärmutter. Hierbei kommt es zu einer Hyperplasie der Muskelschicht mit Bildung zystischer Hohlräume. Dies gilt als eine Sonderform der Erkrankung und wird auch als Adenomyosis uteri bezeichnet.

Zu der *Endometriosis genitalis externa* gehören Endometrioseläsionen an Strukturen innerhalb des kleinen Beckens. In abnehmender Häufigkeit kommt es zu Besiedlungen an Beckenperitoneum, Ovarien, Ligamentae sacrouterinae, dem Douglas-Raum und dem Septum rectovaginale (33). Entsprechend der aktuellen Leitlinie „Diagnostik und Therapie der Endometriose“ werden anhand der histopathologischen Morphologie vier verschiedene Entitäten beschrieben: die oberflächlich peritoneale, die ovarielle und die tief infiltrierende Endometriose sowie die Adenomyosis uteri (34, 35). Diese differenzieren sich zudem in der Lokalisation, dem Krankheitsverlauf und daraus folgend auch der Behandlungsstrategie (36).

Die **oberflächlich peritoneale Endometriose** präsentiert sich als polypöse, stecknadelkopfgroß erhabene Areale in unterschiedlicher Färbung. Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen der Farbe der Areale mit dem Alter der Läsionen (37). Rote, stark vaskularisierten Herde weisen eine vermehrt proliferative Aktivität im Vergleich zu schwarzen oder weißen Herden auf. Außerdem zeigen sich rote Endometrioseläsionen mit stärkster morphologischer Übereinstimmung zu eutopen Endometriumzellen, weshalb Donnez et al. diese als aktive Läsion im frühen Stadium der Erkrankung annehmen (38). Die gelbbraun bis schwarzen oder auch weißen Läsionen werden hingegen eher als eine Folge des chronischen Entzündungsprozesses mit nachfolgender Fibrosierung und Narbenbildung gesehen (35).

Das typische Bild der **ovariellen Endometriose** sind große Zysten, auch Endometriome genannt, mit zyklusabhängigen Einblutungen. Entsprechend der Optik des eingedickten Blutes werden diese auch als Teer- oder Schokoladenzysten beschrieben. Die Zysten liegen zunächst oberflächlich, jedoch kommt es mit der Zeit zum Einstülpen dieser ins Innere der Ovarien (39).

Die **tief infiltrierende Endometriose** (TIE) wurde in den 1990er Jahren auch als Adenomyosis externa bezeichnet, da die Läsionen ein subperitoneal invasives Tiefenwachstum von >5 mm in fibromuskuläres Gewebe, bevorzugt im Douglas Raum, aufweisen (40). Morphologisch kennzeichnend sind knotige Veränderung unterhalb der Peritonealoberfläche mit Ausdehnung in umliegendes Bindegewebe (41). Durch ein fortschreitend invasives Wachstum kann es auch zu Infiltrationen in benachbarte, extraperitoneal liegende Organe, wie der Harnblase oder dem Darm, kommen.

In sehr seltenen Fällen wurden metastasenähnliche Ausbreitungen entlang von Nervenfasern oder der Blutbahn an weiter entfernt gelegene Organe, wie die Nieren, Milz, Lunge, Gehirn oder Skelett beschrieben (13, 42-44). Zusätzlich konnten Lymphgefäße innerhalb tief infiltrierter Herde nachgewiesen werden, weshalb das Lymphgefäßsystem als ein möglicher Verbreitungsweg der Endometriosezellen an Strukturen außerhalb der Bauchhöhle vermutet wird (45). Alle uterusfernen, außerhalb des kleinen Beckens liegenden Läsionen werden in der Gruppe *Endometriosis extragenitalis* zusammengefasst.

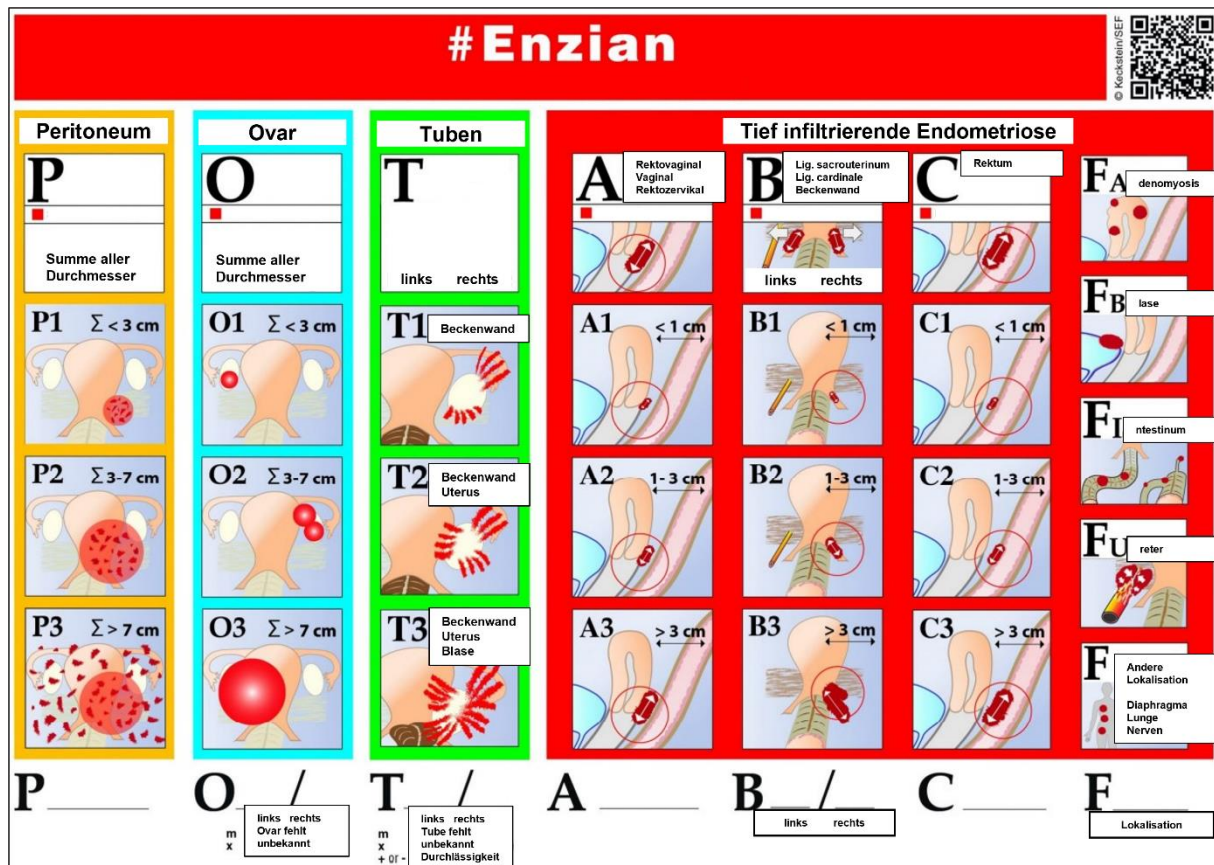
#### 2.1.4 Klassifikation

Es wurden mehrere Klassifikationssysteme entwickelt, um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Endometriosebefunde zu ermöglichen. Anhand der Lokalisation, der Ausdehnung bzw. Größe des Herdes und der endometriosebedingten Folgeschäden wird die Erkrankung in verschiedene Stadien eingeteilt.

Eine mögliche Kategorisierung der Endometriose kann anhand des Endometriosis Fertility Index (EFI) erfolgen, welche makroskopische Veränderungen der Adnexe erfasst und eine Einschätzung darüber erlaubt, wie wahrscheinlich eine Schwangerschaft ist (46).

Die am weitesten verbreitete Klassifikation stellt die revidierte Fassung der American Society for Reproductive Medicine (rASRM) Classification of Endometriosis dar (47). Diese Klassifikation basiert auf dem erstmals 1979 veröffentlichten Klassifikationsschema AFS-Score der American Fertility Society, das in den 1990er Jahren mehrfach überarbeitet wurde (48). Das Schema wurde entwickelt, um das Ausmaß der Endometriose und die Funktion der Geschlechtsorgane während eines chirurgischen Eingriffs zu beurteilen. Läsionen werden bei der rASRM-Klassifikation als Hauptkriterium für den Schweregrad der Erkrankung herangezogen. Anhand eines Punktesystems werden so vier Schweregrade von gering, übermäßig, zu schwer und letztlich ausgedehnt unterschieden. Zusätzlich gilt als weiteres Kriterium eine intraoperative makroskopische Beurteilung der Läsion. Da hierbei ausschließlich das makroskopische Erscheinungsbild klassifiziert wird, liegt mit bis zu 40 % eine hohe Interobserver-Variabilität vor. Zudem zeigt die rASRM eine geringe Korrelation mit den Kardinalsymptomen des chronischen Unterbauchschmerzes und der Infertilität. Die makroskopisch schwer beurteilbaren tief infiltrativen oder extraperitoneal gelegenen Wachstumsherde werden in diesem Schema nicht berücksichtigt.

Als Antwort auf die fehlende Beschreibung der Tiefenausdehnung der Endometrioseherde wurde im Jahr 2005 durch das Konsens der Stiftung Endometrioseforschung das ergänzende Klassifikationssystem ENZIAN veröffentlicht (*Abbildung 1*) (49). Mit dem Ziel einer allgemein akzeptierten, das gesamte Krankheitsbild reflektierenden Klassifikation wurde nach mehreren Überarbeitungen letztlich 2021 eine aktualisierte Version publiziert (50). Die #ENZIAN-Klassifikation beruht auf dem TNM (TNM) -System maligner Tumoren und ermöglicht die Beurteilung aller Lokalisationen sowie Wachstumsformen. Mit einer umfangreichen Erfassung der Endometriose, einschließlich anatomischer Lage, Größe der Läsionen, Adhäsionen und Grad der Beteiligung der angrenzenden Organe, können diese sowohl mittels nicht-invasiver als auch invasiver Methoden erfasst werden.



**Abbildung 1 #ENZIAN-Klassifikation nach Keckstein et al., 2021 (modifiziert)**

Die Abbildung zeigt die überarbeitete #ENZIAN-Klassifikation: die Herde werden je nach anatomischer Lage in die verschiedenen Kompartimente Peritoneum (P), Ovar (li/re) (O), Tube (li/re) (T) eingeteilt. Tiefe Infiltrationen werden in Septum rektovaginale/retrozervikaler Bereich/Vagina (A), (li/re) Parametrium/ Ligamentum sacrouterinum (B) und Rektosigmoid (C) unterteilt. Extragenitale Formen (F) der Erkrankung werden separat als FA = Adenomyosis, FB = Blase, FI = Darm, FU = Ureter (li/re) und F(...) = Invasionen jenseits des kleinen Beckens, aufgeführt. Die Abgrenzung von drei Schweregraden (1-3) ergibt sich aus der Ausdehnung der Erkrankung bezogen auf die Größe und Tiefe der Läsion. (<https://www.endometriose-sef.de/aktivitaeten/klassifikation-enzian/>) (50).

Die Einteilung der Endometriose in International Classification of Diseases (ICD)-Codes erfolgt anhand der Lokalisation in N80.0 bis N80.09 und umfasst Endometriose des Uterus, des Ovars, der Tuba uterina, des Beckenperitoneums, des Septum rektovaginale und der Vagina, des Darmes, der Hautnarbe und sonstigen oder nicht näher bezeichneten Endometriose-Entitäten (34).

### 2.1.5 Klinik, Diagnostik und Therapie

Das Beschwerdebild der Endometriose ist sehr vielfältig. Es wird von asymptomatischen Verläufen bis hin zu besonders ausgeprägten Schmerzen berichtet (2). Das charakteristische Leitsymptom ist die schmerzhafte Regelblutung (=Dysmenorrhoe), welche häufig prämenstruell einsetzt und im Verlauf der Menstruation rückläufig ist. Während oft bei

Beschwerdebeginn die Schmerzen noch zyklusabhängig auftreten, entwickeln sich später häufig chronisch-rezidivierende, zyklusunabhängige Unterleibsschmerzen. Je nach Lokalisation und Tiefenwachstum der Endometrioseherde können weitere Beschwerden hinzukommen. Bei Befall des Douglas-Raumes oder der Vagina beklagen Betroffene häufig Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (=Dyspareunie). Die Beteiligung des harnableitenden Systems kann zu Schmerzen beim Wasserlassen (=Dysurie) führen. In darmnaher Lage können Defäkationsschmerzen (=Dyschezie) sowie Spasmen und Tenesmen auftreten. Des Weiteren gibt es eine Reihe unspezifischer Begleitsymptome wie Schmerzausstrahlung in den Rücken, Übelkeit/Erbrechen sowie Blutungsstörungen (1, 51, 52). Die Symptome können solitär oder in Kombination auftreten. Es konnte bisher keine Korrelation zwischen der Intensität der Schmerzen und dem Ausmaß der Erkrankung aufgezeigt werden (53). Bei Patientinnen mit starken Schmerzen wurde jedoch eine erhöhte Dichte sensibler Nervenfasern in unmittelbarer Umgebung der Endometrioseläsionen im Vergleich zu Patientinnen mit weniger oder keinen Schmerzen nachgewiesen (54). In einem Nervenwachstumsassay konnte gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit Endometriose die sensible Neuritenaussprossung durch die Peritonealflüssigkeit induziert werden kann. Man geht von neurogenen, inflammatorischen Prozessen aus, die durch die Interaktion von Endometrioseläsionen, Nervenfasern und der zytokinreisetzenden Immunzellen aus der Peritonealflüssigkeit aktiviert werden können (55, 56).

Ein weiteres schwerwiegendes Problem stellt die Endometriose-assoziierte Subfertilität dar. Bei bis zu 50 % der Kinderwunschpatientinnen gilt die Endometriose hierfür als Ursache (57). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Infertilität und Endometriose ist noch nicht sicher geklärt. Als mögliche Ursache werden mechanische Faktoren diskutiert. Häufig vorkommende Adhäsionen im kleinen Becken können die Freisetzung der Eizelle und ihre Aufnahme und den Transport bei eingeschränkter Tubenbeweglichkeit verhindern. Weiter kann eine bei Endometriose nachgewiesene verstärkte Hyperperistaltik von Uterus und Tuben, sowie ein zu hoher intrauteriner Druck zu Transportstörungen der Spermien oder Implantationsstörungen der Eizelle führen (58). Als weitere Ursache werden immunologische Fehlreaktionen angenommen. Im Vergleich zu gesunden Frauen konnten mehrere Studien bei Endometriosepatientinnen eine veränderte Zusammensetzung der Komponenten in der Peritonealflüssigkeit und der Follikelflüssigkeit nachweisen (59, 60). Dies kann zu Ovulations- oder Eizellreifungsstörungen führen (61, 62).

Bei der Diagnostik der Endometriose werden nicht-invasive und invasive Untersuchungsverfahren angewandt. Beginnend mit der nicht-invasiven Diagnostik werden in Form einer ausführlichen Anamnese mit anschließend gynäkologisch vaginaler und rektaler Untersuchung des Beckens erste Hinweise für die Erkrankung gesucht. Des Weiteren finden häufig bildgebende Verfahren Anwendung (63). So können mittels Ultraschalluntersuchung

Endometriome, Hinweise auf das Vorliegen einer Adenomyosis uteri, oder eine Darmbeteiligung festgestellt werden (64). Zur Klärung der Ausdehnung einer TIE im Bereich des Beckens kann eine Magnetresonanztomografie (MRT) beitragen (65). Es gibt bis heute nur wenige laborchemische Untersuchungsmethoden, welche Hinweise auf eine Endometrioseerkrankung liefern. Der Tumormarker CA-125 ist zwar in fortgeschrittenen Stadien der Endometriose im Blut erhöht, er ist jedoch nicht spezifisch für die Endometriose und besitzt in früheren Stadien der Erkrankung nur eine eingeschränkte Aussagekraft (66). Einige morphologische Marker, wie beispielsweise Vimentin, Mesothelin und Calretinin, erlauben eine Abgrenzung der Endometriose vom Ovarialkarzinom und einer Endozervikose (34). Konnten nicht-invasive Untersuchungsverfahren den Verdacht auf eine Endometriose erhärten, bleibt zur definitiven Diagnosesicherung die invasiv-laparoskopische Untersuchung (1). Die als Goldstandard der Diagnostik geltende Bauchspiegelung dient der Inspektion, der Beurteilung des Ausmaßes der Erkrankung mit Stadieneinteilung und einer histologischen Sicherung.

Zudem kann die Laparoskopie zeitgleich als therapeutisches Mittel genutzt werden, indem die Endometrioseherde exziiert und vorhandene Verwachsungen gelöst werden. Je nach Befund werden umfangreichere, interdisziplinäre Operationen erforderlich. Eine Resektion ist bei tiefinfiltrierender Endometriose und bei persistierenden Schmerzen indiziert (34). Durch den operativen Ansatz wird eine effektive Linderung der Symptome mit verbesserter Lebensqualität erreicht, allerdings gibt es nach aktuellem Stand keine kurative Behandlungsmöglichkeit (67). Nach isoliert operativer Therapieoption zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine zunehmende Rezidivrate mit Reoperationen (68). Um die schmerz- und rezidivfreien Intervalle zu verlängern, hat sich ein kombiniertes Therapiekonzept mit operativer Entfernung und nachfolgend medikamentöser Behandlung durchgesetzt (69, 70). Bei der medikamentösen Therapie ist grundsätzlich zwischen einer analgetischen Behandlung bei rezidivierenden Schmerzzuständen und einer hormonellen Therapie zu unterscheiden. Eingesetzte Analgetika sind z.B. nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAP). Sie hemmen die Produktion von Prostaglandinen, welche vermutlich an der Schmerzentstehung bei Endometriose beteiligt sind. Ihre Wirksamkeit in Bezug auf die Schmerzreduktion im Zusammenhang mit der Endometriose bleibt jedoch umstritten. Zudem ist eine langfristige Einnahme von NSAP mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden (71-73). Der Wirkmechanismus hormoneller Therapeutika zielt auf die Schaffung eines hypoöstrogenen Zustands ab. Da die Endometriose östrogenabhängig wächst, geht man bei Supprimierung der Östrogenproduktion von einer geringeren Proliferationsrate und Dezidualisierung des Endometriums sowie der Endometrioseherde aus. Entsprechend der Leitlinie „Diagnose und Therapie der Endometriose“ wird als Erstlinientherapie die Behandlung mit Gestagenen empfohlen, als Zweitlinientherapie eine Kombinationstherapie mit oralen Kontrazeptiva, Gonadotropin-releasing-Hormon-Analoga (GnRH) und anderen Gestagenen (34). Der

hormonelle Therapieansatz konnte in mehreren Studien eine Reduzierung der endometriose-assoziierten Schmerzen bei Menstruation aufzeigen (74, 75). Hierbei sind die GnRH-Analoga den reinen Gestagenen zwar gering im Vorteil, allerdings mit beträchtlichen Nebenwirkungen assoziiert. So kann es zu typischen klimakterischen Beschwerden kommen und bei Langzeitbehandlung eine deutliche Verringerung der Knochendichte auftreten. Mittels einer sogenannten Add-back-Behandlung durch begleitende Gabe milder hormoneller Substitutionstherapie können die Beschwerden und der Verlust der Knochenmasse ausgeglichen werden, ohne die Effektivität auf die Endometriosebehandlung messbar zu beeinflussen. Unter Add-back-Medikation ist in Deutschland eine Verlängerung der Therapie auf bis zu 12 Monate zugelassen. Nach Absetzen des GnRH-Analogons ist häufig mit einem Wiederkehren der zuvor beschriebenen Beschwerden zu rechnen (58). Alle hormonellen Therapeutika führen simultan zu einer Anovulation, sodass während der medikamentösen Therapie eine gleichzeitige Kinderwunschbehandlung nicht realisierbar ist (51, 76, 77). So muss abhängig vom individuellen Leidensdruck, der Familienplanung, dem Ausmaß und der Verteilung der Endometriose multidisziplinär zwischen den Risiken der operativen Radikalität bzw. der Nebenwirkungen und denen der Symptompersistenz abgewogen und eine individuelle Therapieentscheidung getroffen werden (70, 78).

## 2.2 Die Ätiopathogenese der Endometriose

### 2.2.1 Theorien der Pathogenese

Trotz vielfältiger Forschungsbemühungen gibt es bis heute keinen heilenden Behandlungsansatz für die Endometriose. Dies ist vor allem dem unvollständigen Verständnis der Pathogenese geschuldet. Es wurden verschiedene Hypothesen über die Herkunft ektoper Endometriumzellen aufgestellt, die sich teilweise überlappen, von denen allerdings keine bisher endgültig bewiesen oder widerlegt werden konnte.

So formulierte Meyer im Jahr 1919 die **Metaplasietheorie** (79). Diese geht davon aus, dass sich embryonales Zölomepithel (=pluripotente Stammzellen aus dem Peritoneum) in endometriumartige Zellen umdifferenzieren kann. Die Umwandlung geschieht vermutlich durch wiederholt eintretende Reize hormoneller oder immunologischer Art (80). Gestützt wird die Metaplasietheorie durch die Annahme der Entstehung einer ovariellen Endometriose nach Invagination des Ovar-Cortex oder der Entwicklung rektovaginaler Knoten nach Transformation von Überresten der embryonalen Müller'schen Gänge in endometriale Herde (35, 81, 82). Zudem könnte sich daraus das Vorkommen von Endometriose bei Frauen mit nur rudimentär angelegter Gebärmutter/Uterusaplasie und primärer Amenorrhoe beim Rokitansky-Küster-Meyer-Hauser-Syndrom oder bei Männern, welche bei der Diagnose des Prostatakarzinoms mit hohen Dosen an Östrogen behandelt wurden, erklären (83, 84). Auch das Auffinden von Herden außerhalb des Beckens könnte mithilfe dieser Theorie verstanden werden. Allerdings würde man ein gleichmäßigeres Auftreten der Herde in der gesamten Bauchhöhle erwarten, ohne Prädilektion für die Organe im kleinen Becken (85).

Es folgte im Jahr 1927 die **Transplantations- bzw. Implantationstheorie** nach Sampson (86). Als eine der bekanntesten Hypothesen erklärt sie die Herkunft vitaler Endometriumzellen durch retrograde Menstruation. Die eutopen Zellen werden so über die Eileiter in den Bauchraum verschleppt, wo sie sich absiedeln und schließlich Endometrioseläsionen bilden können. Untermauert wird diese Theorie durch das erhöhte Endometrioserisiko bei Frauen mit vermehrtem Menstruationsrückfluss durch starke und lange Menstruationsblutungen oder auch durch eine verstärkte Gebärmutterperistaltik mit Erhöhung des intrauterinen Drucks (87, 88). Die Theorie kann allerdings keine Erklärung für das Vorkommen von Endometriosezellen außerhalb der Bauchhöhle liefern. Sampson vermutet hierbei eine durch das invasive Wachstum resultierende lymphogene und hämatogene Streuung der Endometriumzellen zu weiter entfernten Lokalisationen (89). Erst Jahre später wurde durch Halme et al. nachgewiesen, dass die retrograde Menstruation bei bis zu 90 % aller geschlechtsreifen Frauen ein physiologisches Phänomen darstellt (87). Die Diskrepanz dieser Häufigkeit zu der Prävalenz von Endometriose legt nahe, dass weitere Faktoren bei der Entwicklung der Erkrankung von Bedeutung sind. Zudem deckt dieses Erklärungsmodell die seltenen



Krankheitsfälle bei Frauen ohne funktionelles eutopes Endometrium mit primärer Amenorrhoe nicht ab (90).

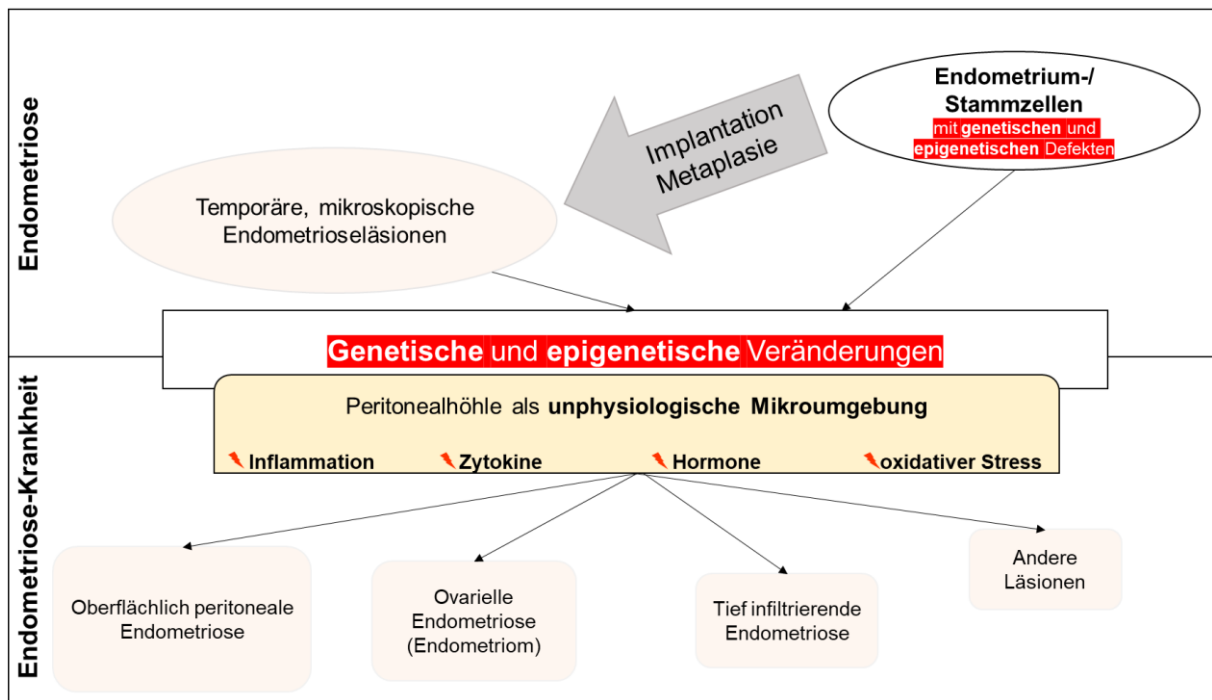
Aus diesem Grund entstand die **Induktionstheorie**, welche eine Kombination aus der Transplantations- und Metaplasietheorie darstellt (91). Diese postuliert die Entstehung der Endometriose über die Metaplasie des Zölomepithels aufgrund des zyklisch wiederkehrenden Stimulus des retrograden Menstruationsflusses.

Unterstützend zu Sampson`s Transplantationstheorie konnten Starzinski et al. 2001 nachweisen, dass es sich bei der retrograden Menstruation um ein Gemisch aus Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien handelt (92, 93). Anhand von bestimmten Markerproteinen wie Cadherinen (Zelladhäsionsproteine) und Zytokeratin (Intermediärfilamentproteine) lässt sich der Differenzierungsstatus von Zellen charakterisieren. Das Spektrum der retrograd ausgeschwemmten Endometriumzellen reicht demnach von terminal differenzierten bis hin zu Zellen mit Stammzellcharakter, wobei eine ganze Reihe von adulten Stammzellen detektiert wurde (94). Neben humanen Klonstammzellen (CFU) konnten auch Knochenmarkszellen unter den endometrialen Stamm-/Vorläuferzellen nachgewiesen werden (95, 96). Untermauert wird die Theorie einer **Stammzell-basierten Erkrankung** durch die Ergebnisse mehrerer Studien mit Genexpressionsanalysen. So konnten Unterschiede im Expressionsmuster verschiedener Transkriptionsfaktoren oder Proteine der extrazellulären Matrix von ektopen Endometriumzellen im Vergleich zu den eutopen Zellen festgestellt werden (97-99).

Eine plausible Erklärung über die Herkunft von Stammzellen mit nachfolgender Krankheitsentstehung liefert die neuere Tissue Injury and Repair (**TIAR**)-Theorie nach Leyendecker aus dem Jahr 2009. Diese geht primär von einer funktionellen Störung der Gebärmutter mit einer sekundären Absiedlung basaler Endometriumzellen über die Eileiter aus (100). Bei Frauen mit Endometriose wurde eine uterine Dysrrhythmie und Hyperperistaltik beobachtet (101, 102). Die starken Kontraktionen führen zu Mikroläsionen in der Epithel-Mesenchym-Muskel Übergangzone (Junctional Zone), was eine Dislokation von Zellen der Zona basalis mit postuliertem Stammzellcharakter ermöglicht. Die so ausgelöste Autotraumatisierung setzt eine Wundheilung in Gang, welche eine Hochregulierung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) mit konsekutiver Prostaglandin E2 (PGE2)-Biosynthese bewirkt. PGE2 wiederum verstärkt die Expression und Aktivierung der Aromatase, aus der dann eine vermehrt lokale Östrogenproduktion (ERalpha und ERbeta) hervorgeht. Der erhöhte Östrogenspiegel wiederum bedingt eine gesteigerte Uterusperistaltik, wodurch sich der Teufelskreis schließt. Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung einer verstärkten Expression des G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptors (GPER) sowie einer vermehrten Östrogenproduktion in Endometrioseläsionen im Vergleich zum eutopen Endometriumzellen überein (97, 103).

Zusammenfassend können die oben genannten Theorien die Herkunft und die Bildung temporär endometriotischer Läsionen erklären. Jedoch sind sie einzeln betrachtet unzureichend, um das Auftreten einer schweren progressiv und invasiv verlaufenden Endometrioseerkrankung mit Bildung der verschiedenen Entitäten zu beschreiben. Daraus folgt die allgemein gültige Annahme, dass sich Endometriose multifaktoriell entwickelt. Unter Zusammenführung mehrerer ätiologischer Erklärungsmodelle und durch den Einfluss aus Faktoren der neuen, lokalen Mikroumgebung wurde eine neue Theorie zur Pathogenese aufgestellt (25, 104). Unter diesem Aspekt fasst die s.g. **genetisch/epigenetische -Theorie** nach Koninckx aus dem Jahr 2019, als Update der **Endometriose-Krankheit-Theorie** von 1999, die genannten Hypothesen und weitere Beobachtungen des Krankheitsbildes zusammen (5, 105). Demnach wird postuliert, dass die Ursprungszellen (vitale Endometrium- oder Stamm-/Knochenmarkzellen) mit genetischen oder epigenetischen Defekten nach Implantation oder Metaplasie die Fähigkeit besitzen, an ektopen Stellen temporär, minimal-erscheinende Läsionen zu bilden (106-108).

Für eine hereditäre Prädisposition spricht eine familiäre Häufung mit 5-9 % erhöhtem Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades (109). In Zwillingsstudien wurde herausgefunden, dass die Wahrscheinlichkeit zu erkranken zu 51 % auf genetischen Faktoren beruht (110). Umfassende Untersuchungen, sogenannte Genome Wide Association Studies (GWAS), werden methodisch eingesetzt, um genetische Varianten bzw. Kandidatengene zu identifizieren (1, 111). Eine kürzlich durchgeführte Meta-Analyse über 11 GWAS konnte fünf in Sexualsteroidhormon-Signalwegen involvierte Loci nachweisen, die signifikant mit einem Endometrioserisiko assoziiert sind (112). Auch Umweltfaktoren, wie eine chronische Exposition gegenüber Dioxinen, können über DNA-Mutationen zur Krankheitsentstehung beitragen (113). Neben genetischen DNA-Mutationen spielen epigenetische Veränderungen, wie veränderte Methylierungsmuster, Histonmodifikationen und miRNA's eine Rolle (114, 115). So konnten in einem experimentellen Tierversuch vier veränderte Signalwege (Ubiquitin/Proteasome, NFκB, TGFβ und KRAS) aufgedeckt werden, welche maßgeblich an der Kommunikation zwischen den endometrialen Zellen und der Anheftungsstelle am Peritoneum beteiligt sind (116).



**Abbildung 2 Genetisch/epigenetische-Theorie nach Koninckx et al., 2019 (modifiziert)**

Bei der Ursprungszelle handelt es sich um vitale Endometrium- oder Stammzellen mit genetischen und/oder epigenetischen Defekten. Diese können nach Implantation bzw. Metaplasie den temporären Zustand der Endometriose hervorrufen. Kommt es durch den Einfluss der Mikroumgebung zu weiteren genetischen und/oder epigenetischen Veränderungen, wird die Entstehung der schwerwiegenderen Endometriose-Krankheit mit Bildung der typischen Läsionen gefördert (5).

Laut genetisch/epigenetischer Theorie tritt die durch temporäre Läsionen entstehende Endometriose intermittierend bei vielen Frauen innerhalb der Reproduktionsphasen auf und kann sich spontan wieder zurückbilden (117) (Abbildung 2). Einen Übergang in die heterogen ausgeprägte, chronisch-rezidivierende „Endometriose-Krankheit“ mit der Entstehung der verschiedenen Entitäten würde erst durch weitere zelluläre Modifikationen innerhalb der Läsionen initiiert. Unter der Voraussetzung, dass die ektopen Endometrioseläsionen eine Subpopulation an Zellen mit Plastizität besitzen, könnten Faktoren der **unphysiologischen, lokalen Mikroumgebung** zu pathophysiologischen Differenzierungen mit veränderter Genexpression führen. In der Konsequenz resultieren Veränderungen in der Zellmorphologie und in biochemischen Eigenschaften der ektopen Zellen. Diese können dadurch, ähnlich wie ein bösartiger Tumor, die Fähigkeit zur Migration, Invasion, Proliferation und Induktion der Angiogenese erwerben (36).

Unterstützt wird die Theorie durch die Ergebnisse zahlreicher Studien, welche eine Veränderung der Transkriptome von ektopen Endometriumzellen im Vergleich zu eutopen aufzeigen (118-120). Zu den erforschten dysregulierten Genen zählen solche des Zellzyklus, von Zell-Zell-Verbindungen und weiteren wichtigen Signalwegen (31). Kasvandik et al. deckten weitreichende metabolische Veränderungen bei stromalen ektopen Endometriosezellen auf

(121). So wurde ein reduziertes apoptotisches Potential, eine veränderte Immunfunktion sowie eine verstärkte zelluläre Adhäsion und Invasion der Endometriosezellen nachgewiesen. Eine gesteigerte Invasion wurde beispielsweise über die Aktivierung des kanonischen WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs nach verstärkter Expression des  $\beta$ -Catenins mit Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bei Endometriose aufgezeigt (31, 122, 123). Die EMT gilt als ein für die Invasion entscheidender Mechanismus (124). Es handelt sich hierbei um einen Prozess aus der Embryogenese, welcher über epigenetische Modifikationen für die Invasivität und Progredienz von malignen Erkrankungen mitverantwortlich ist (125). Dieser ist vermutlich auch an der Pathogenese der Endometriose beteiligt (126, 127). Epithelzellen sind durch Zellverbindungen miteinander verknüpft und exprimieren das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin. Mesenchymzellen hingegen verfügen über keine Zell-Zell-Kontakte und exprimieren überwiegend N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin. Bei der EMT verlieren die Epithelzellen ihre Zell-Zell-Kontakte und entwickeln anschließend migratorisch-invasive Fähigkeiten von Mesenchymzellen. Gaetje et al. demonstrierten die Herunterregulierung von E-Cadherin im Endometrium bei Frauen mit Endometriose (128). Zudem wurde ein Verlust von E-Cadherin in Endometrioseherden nachgewiesen. Studien mit epithelial-ähnlichen Endometriosezellen (unter anderem 12Z-Zelllinie) konnten eine erhöhte *in vitro*-Invasivität in einem Kollagen-Gel-Invasions-Assay und deren Vergleichbarkeit mit Karzinomzellen aufzeigen. Bei diesen Zellen könnte das Fehlen von E-Cadherin eine mögliche Erklärung für das invasive Verhalten darbieten (129, 130). Hingegen zeigten andere Studien keine Suppression der Expression von E-Cadherin in peritonealen Endometrioseherden (98, 131). Welche Faktoren aus der Mikroumgebung die Invasivität der Endometriosezellen beeinflussen könnten, ist noch weitestgehend unerforscht. Neueste Studien fanden einen Zusammenhang zwischen der EMT und zirkulierenden miRNAs im Blut von Endometriosepatientinnen (132-134). Diese miRNAs werden aufgrund ihrer geringen Komplexität, ihrer Gewebespezifität und ihrer Stabilität in Körperflüssigkeiten als neuartige Biomarker für Endometriose diskutiert.

### **2.2.2 Bedeutung der Mikroumgebung**

Als auslösende Faktoren einer epigenetischen Modulierung im Prozess der Krankheitsentstehung der Endometriose werden neben oxidativem Stress und Hormonen vor allem auch immunologische Komponenten diskutiert (38, 135, 136). Im Zusammenhang mit der genetisch/epigenetischen Theorie spielt also die für ektope Zellen unphysiologische, fremde Mikroumgebung eine entscheidende Rolle für das Voranschreiten der Erkrankung. Je nach anatomischer Lage einer temporär gebildeten Endometrioseläsion unterscheidet sich die direkte Mikroumgebung. Somit liefert die Hypothese auch einen Erklärungsansatz für die Entstehung der unterschiedlichen Entitäten. Während das Wachstum von tief infiltrierender oder ovarieller Endometriose über Faktoren umliegender Blutgefäße oder der Ovarien reguliert

wird, könnte die Entwicklung der oberflächlich peritonealen Endometriose durch Faktoren aus der Peritonealhöhle beeinflusst werden (137).

#### 2.2.2.1 Peritonealflüssigkeit (PF)

Die Peritonealhöhle wird von einem dünnen Flüssigkeitsfilm, der s.g. **Peritonealflüssigkeit** bedeckt. Diese stellt ein dynamisches Milieu dar, welches sich bei Frauen aus Plasmatranssudaten, Tubalflüssigkeit, retrograder Menstruation, Makrophagensekreten und aus Exsudaten des Ovars zusammensetzt (138-140). Das Volumen der PF schwankt in Abhängigkeit der Follikelaktivität und Hormonproduktion während des Menstruationszyklus und erreicht nach Ovulation mit einer Volumenzunahme von durchschnittlich ~5 ml auf ~20 ml ein Maximum (141).

*In vitro*-Untersuchungen mit endometrialen Stromazellen zeigten nach Behandlung mit PF von Endometriosepatientinnen eine gesteigerte Proliferation (142). Vergleichende Studien mit Untersuchung des Volumens der PF bei Endometriose-erkrankten Frauen und Gesunden ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Jedoch wurden einige funktionelle Veränderungen bei verschiedenen immunologischen Bestandteilen nachgewiesen (143). Dmowski et al. erkannten früh eine Beteiligung des Immunsystems bei der Pathogenese von Endometriose (144). So wiesen in einem Tierversuch Rhesusaffen mit spontan entwickelter Endometriose eine veränderte zelluläre Immunantwort gegenüber autologen Endometrium-Antigenen auf. Dadurch wurde die Hypothese aufgestellt, dass dislozierte Endometriumzellen erst unter den Umständen einer modifizierten Immunreaktion die Fähigkeit zum ektopen Überleben und Wachstum erlangen. Es ist jedoch unklar, ob die veränderte Aktivität der Immunzellen als primäre Ursache der Erkrankung angesehen werden kann oder die Entzündungszellen sowie deren Mediatoren als Reaktion auf die Erkrankung in die Peritonealhöhle gelockt werden (145). Folglich gewann die Rolle Endometriose-assoziiertes entzündlicher Veränderungen in der lokalen Peritonealumgebung zunehmend an Aufmerksamkeit.

Die PF enthält eine Vielzahl an Leukozyten (Makrophagen, Lymphozyten (NK-Zellen, zytotoxische T-Lymphozyten, B-Zellen, und Granulozyten). Oosterlynck et al. konnten bei Frauen mit Endometriose eine herabgesetzte Aktivität und Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber autologen Endometriumzellen nachweisen (146). Dies wäre ein Erklärungsansatz für das Überleben und die Implantation von ektopen Zellfragmenten. Studien, welche peritoneale Makrophagen unfruchtbarer, an Endometriose erkrankter Frauen mit denen fertiler Frauen verglichen, stellten eine gesteigerte Aktivierung fest (46 % versus 15 %) (87, 147, 148). Resultierend aus der vermehrten Aktivität konnte in weiteren Untersuchungen eine verstärkte Bildung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Makrophagen nachgewiesen werden (149, 150). Guo et al. identifizierten mittels Massenzytometrie mehr als 40 verschiedene

Immunzelltypen in der Peritonealhöhle (151). In der inflammatorischen Mikroumgebung der PF war der Anteil CD69+ T-Zelluntergruppen an der gesamten Immunzellpopulation bei Endometriose im Vergleich zu Kontrollproben besonders hoch. Diese CD69+-Zellen wiesen in der PF eine reduzierte Expression von Markern, die mit der T-Zellfunktion in Verbindung stehen, im Vergleich zu der Expression dieser Marker im Blut auf. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem entsprechend dem Schweregrad der Erkrankung reagiert.

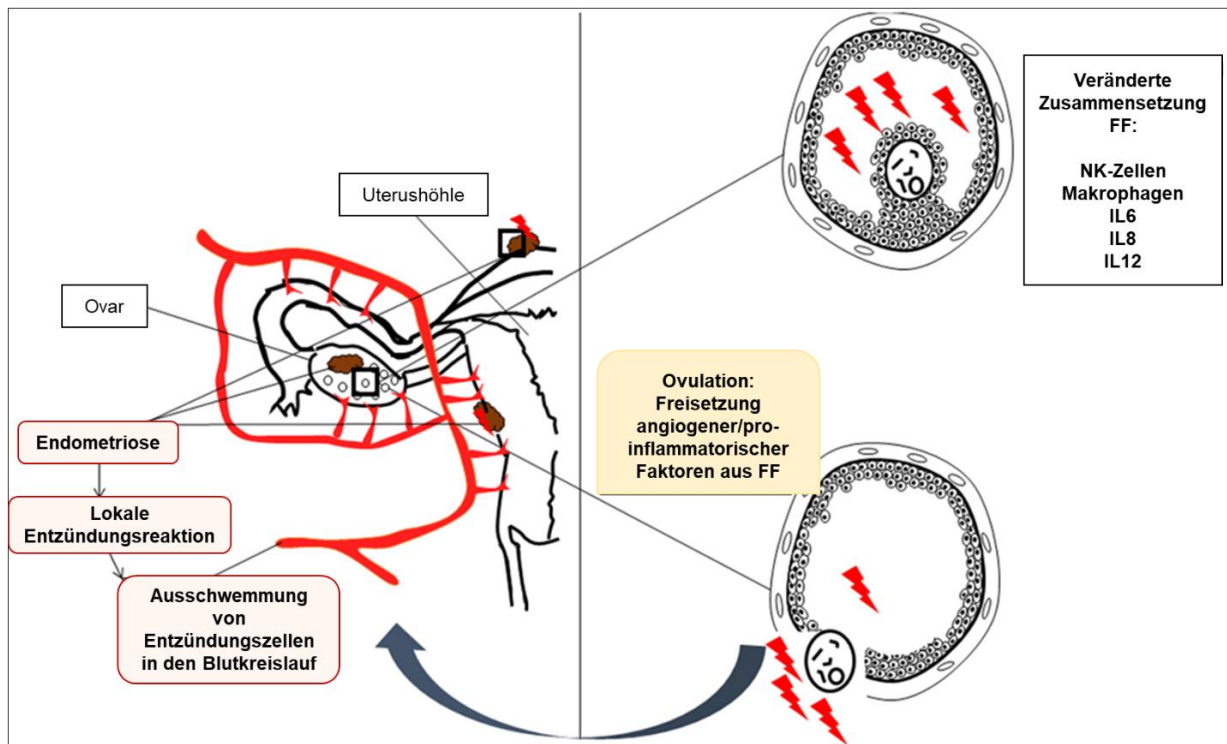
Zou et al. untersuchten die Immunzellarten in der PF im Vergleich zu Kontrollproben (152). Hierfür wurden Transkriptome aus der PF von Patientinnen mit Endometriose und aus Kontrollproben gewonnen und einer Einzelzell-RNA-Sequenzierung unterzogen. Dadurch wurde das gesamte Transkriptom in der PF dargestellt. Es zeigte sich eine heterogene Immunzellpopulation mit bisher nicht bekannten Zelltypen, insbesondere T-Zell-Rezeptor-positive, proliferierende Makrophagen und NK-Zellen. Die Makrophagen in der PF von Endometriosepatientinnen wiesen eine verminderte Phagozytose und reduzierte zytotoxische Aktivität auf, sowie verstärkte pro-inflammatorische und chemotaktische Effekte. Die dadurch entstehende intraperitoneal-inflammatorische Umgebung bei Frauen mit Endometriose könnte für ektipe Zellen ein wachstumsförderndes Milieu induzieren. So deuten die Ergebnisse einer Co-Kultur von Makrophagen zusammen mit endometriotischen Stromazellen auf eine verstärkte Klonalität und Invasion bei Endometriosepatientinnen hin (153).

#### 2.2.2.1.1 Follikelflüssigkeit (FF)

Die zyklusabhängige Volumenzunahme der PF unterstreicht die Bedeutung ovarieller Exsudate als Ursprung (139, 154). Hierzu zählt die s.g. **Follikelflüssigkeit**, welche im Follikel innerhalb eines Ovars einer geschlechtsreifen Frau entsteht. Bei der Follikelreifung entwickeln sich aus Primordialfollikeln über Primär- und Sekundärfollikel mehrere Tertiärfollikel. Ab dem Tertiärstadium besteht dieser aus einer äußeren Bindegewebsschicht mit Thekazellen (Theca folliculi interna und externa), einer Basalmembran und einer inneren epithelialen Granulosazellschicht (Stratum granulosum). Innerhalb des Follikels befindet sich die heranreifende Eizelle. Diese wird von einer Follikelhöhle (Antrum folliculi) umgeben, welche die FF beherbergt. Bis zur Ovulation setzt sich von den Tertiärfollikeln nur ein dominanter Graaf'scher Follikel durch, welcher zum Zeitpunkt des Eisprungs platzt. Die darin entwickelte Eizelle wird dann zur Befruchtung freigegeben und die enthaltene FF vermischt sich mit der PF (155).

Die FF entsteht aus den Sezernierungsprodukten der Granulosa- und Thekazellen sowie aus Serumbestandteilen der thekalen Blutgefäße (156-158). Sie enthält für die Entwicklung der Eizelle wichtige Nährstoffe und Wachstumsfaktoren. Neben Hormonen, Enzymen,

Antikoagulantien, Elektrolyten sind auch Immunzellen und deren Sekretionsprodukte nachgewiesen worden (159-161). Verschiedene Studien im Rahmen einer *in vitro*-Fertilisations (IVF)-Behandlung konnten bei Endometriosepatientinnen eine erhöhte Anzahl an Makrophagen und steigende Konzentrationen inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin (IL)-1B, IL-6, IL-8 und IL-12, in der FF nachweisen (7, 9, 162-164). Ein Review von Prins et al. beschäftigte sich mit der Frage nach dem Einfluss von FF auf die Krankheitsentstehung sowie -progression (8). Dieser wird in einem Teufelskreis vermutet, ohne genaue Kenntnis über den Startpunkt. Mit der Voraussetzung eines dysregulierten Immunabwehrsystems könnte es den retrograd menstruierten Zellfragmenten gelingen an der Peritonealoberfläche eine temporäre Läsion zu bilden. Durch eine lokale Entzündungsreaktion würden dadurch neue Immunzellen angelockt und in den Blutkreislauf ausgeschwemmt werden. Diese würden dann über die Blutversorgung des Ovars bei dem Prozess der Follikelreifung in die FF übergehen und durch Bildung weiterer Entzündungsmediatoren deren Zusammensetzung verändern. Nach Ovulation könnten die vermehrt vorhandenen Entzündungszellen durch die Entstehung einer inflammatorischen Mikroumgebung in der Peritonealhöhle das weitere Wachstum bestehender Endometriose-Läsionen anregen (*Abbildung 3*). *In vitro*-Studien mit stromalen Endometriosezellen bestärken diese Annahme mit dem Ergebnis einer gesteigerter Zellviabilität und Proliferation nach FF-Behandlung (165, 166).



**Abbildung 3 Hypothetische Rolle von FF bei der Entstehung von Endometriose nach Prins et al., 2020 (modifiziert)**

Temporäre Endometrioseherde verursachen lokale Entzündungen, wodurch Entzündungsfaktoren angeschwemmt werden und diese über den Blutkreislauf in den Eierstock gelangen. Von dort gelangen sie als Ultrafiltrat in die Follikelflüssigkeit und führen zu einer veränderten Zusammensetzung der Immunzellen sowie deren Entzündungsmediatoren. Beim Eisprung werden diese Faktoren in die Peritonealhöhle freigesetzt und stimulieren das Wachstum der bereits bestehenden Endometrioseherde (8). FF=Follikelflüssigkeit, IL=Interleukin, NK-Zellen=natürliche Killerzellen

In der FF von Endometriosepatientinnen konnte mehrfach eine erhöhte Konzentration von Interleukin-8 (IL-8, auch als CXCL8 bezeichnet) nachgewiesen werden. IL-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin und zählt zu der Gruppe der Chemokine. Neben Makrophagen und Mesothelzellen werden auch Endometriumzellen als potenzielle Quelle von IL-8 angesehen. Als Stimuli für die Expression der CXCL8-mRNA sind Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor (TNF) und IL-1, sowie Lipopolysaccharid (LPS) bekannt (167-169).

IL-8 soll sowohl in der Physiologie des Endometriums als auch bei Endometriose eine Rolle spielen (170, 171). Als Ligand der beiden Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 hat IL-8 chemotaktische Wirkungen auf andere Immunzellen, stimuliert zusätzlich die Angiogenese und übt einen direkten Einfluss auf wichtige zelluläre Prozesse aus (172-174). So werden dem Interleukin in Form eines autokrinen Wachstumsfaktors wichtige regulatorische Funktionen bei der Adhäsion und Proliferation von ektopen stromalen Endometriumzellen und der Einschränkung der Apoptose zugeschrieben (175, 176).

Chemotaxis ist eines der Kennzeichen der Chemokine. Demnach ist IL-8 in der Lage, das Migrationsverhalten von Immunzellen und damit die Immunreaktion zu beeinflussen (177). Im



Zusammenhang mit verschiedenen Karzinomtypen konnten Migrations- und Invasionsvermittlung über die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 bereits nachgewiesen werden (178, 179). Die chemotaktische Wirkung von IL-8 auf endometriotische Zellen ist bisher noch nicht hinreichend bekannt (180).

### **2.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die Ätiopathogenese der Endometriose wird als multifaktoriell beschrieben, welche durch genetische Defekte und epigenetische Phänomene entsteht. So erlangen ektope endometriale Fragmente zelluläre Verhaltensweisen, welche für die Etablierung, das Überleben und ein kontinuierliches Wachstum erforderlich sind. Mit der Fähigkeit sich am Peritoneum anzuheften, zu migrieren, invasiv zu wachsen und eine Blutversorgung zu generieren, nehmen sie charakteristische Eigenschaften von malignen Tumoren an.

Als auslösender Faktor für die veränderten Verhaltensweisen wird eine entzündlich veränderte Mikroumgebung diskutiert (181). Ein wichtiger Bestandteil der Mikroumgebung in der Bauchhöhle von Frauen im reproduktiven Alter ist die FF. Sie wird regelmäßig im heranreifenden Follikel gebildet und zum Zeitpunkt der Ovulation in die Bauchhöhle freigesetzt. Verschiedene Studien konnten belegen, dass sich die Zusammensetzung der FF bei Frauen mit Endometriose von Gesunden unterscheidet. Es konnte eine verstärkte Aktivierung von Immunzellen mit gesteigerten Konzentrationen von Entzündungsmediatoren, wie Interleukine, festgestellt werden. Jedoch ist der funktionelle Mechanismus von FF sowie einzelner Bestandteile der FF in Bezug auf endometriotische Zellen unzureichend aufgeklärt.

Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Dissertation über die Analyse des funktionellen Verhaltens endometriotischer Zellen den Einfluss von FF, insbesondere des darin enthaltenen IL-8 auf Endometriose zu beurteilen.

Hierfür wurde die epithelial-ähnliche endometriotischen Zelllinie 12Z verwendet. Betrachtet wurde die Auswirkung von FF auf die Zellviabilität, Zellproliferation und die chemotaktische Zellmigration. Um das morphologische Erscheinungsbild nach FF-Behandlung näher zu charakterisieren und gleichzeitig nach Hinweisen für eine EMT zu suchen, wurde die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin nach Behandlung mit FF untersucht.

Für IL-8 konnte in Bezug auf stromale Endometriosezellen bereits eine Rolle bei der Pathogenese zugeschrieben werden. Mit Hilfe der chemotaktischen Migration sollte ein chemotaktisches Potential von IL-8 auf die 12Z-Zellen überprüft werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Substanzen

(3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid, MTT 0,5 %	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Aqua dest, dH <sub>2</sub> O	Braun, Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Puffer nach der Weise)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, DMEM/ F-12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol 96 %	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolute, p.a.	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Rinse Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
Fetales Kälberserum, FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fibronektin Bovine Protein Plasma	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hemacolor Lösungen 2 und 3	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hico-Mic Mikroskopier-Einschlussmittel	Hico, Köln, Deutschland
Immersionsöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropylalkohol p.a.	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (Puffer nach der Weise)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nagellack Express Nailcare	Maybelline Jade, New York, USA
Natriumdodecylsulfat, SDS 20 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin P/S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rinderserumalbumin BSA	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Roti®-Histofix 4,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, HCl 1 N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Terg-a-Zyme	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Trypsin-EDTA 0,25 %	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Versene 0,02 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserstoffperoxid, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

BD Röhrchen Round-Bottom	BD Biosciences, San Jose, USA
Cellstar Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturplatten (6- und 96-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Einmalhandschuhe Nitril	Sempercare® Semperit AG, Wien, Österreich
Filtropur V50, 500 ml 0,2 µm	Sarstedt, Newton, USA
Kryoröhrchen Cryogenic Tubes Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LUNA™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten	VWR® International, Radnor, USA
Pierce Maleic Anhydride Activated Plates, Clear, 96-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen Filter Tips, TipOne® (0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)	StarLab, Hamburg, Deutschland
Polycarbonatmembranen 25x80 mm, Porengröße 8 µm	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Polypropylen Röhrchen, PP (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schülke Wipes 70 % Ethanol	Safe&Easy, Norderstedt, Deutschland
Serologische Pipetten Cellstar® (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

### 3.1.3 Gebrauchsmaterialien

Boyden-Migrationskammer	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Feuchtekkammer aus eigener Werkstatt	Mainz, Deutschland
Klammern	Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Mehrkanalpipette Transferpette® S-8 (10-100 µl und 20-200 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden, Deutschland

Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, Accu-jet pro	Brand Wertheim, Deutschland
Polystyrene Reagent Reservoir 25 ml	VWR International, Radnor, USA
Racksysteme für Immunhistochemie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Scheren	Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Teigschaber	Rösle, Marktoberdorf, Deutschland

### 3.1.4 Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcCell VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Computer	Dell, Round Rock, USA
Eismaschine	Ziegra, Hannover, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Rochester, New York, USA
ELISA Reader Glomax® Multi + Detection System	Promega, Walldorf, Deutschland
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Mikroskop Axioskop 2 (Objektive: Neofluan 10x/0,30; PlanNeofluor 20x/0,50; Plan-Neofluor 40x/1,3 Oil)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Leica DMIL LED	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sicherheitswerkbank HeraeusSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermoschüttler pro	Cellmedia, Zeitz, Deutschland
UV-Lampe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortex Reax 1D	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad AquaLine AL18	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Absaughilfe Vacuboy	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Heiz-/Magnetrührer	IKA Labortechnik, Stauffen, Deutschland
BD FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

Einfrier-Lösung	10 % DMSO in FCS
FACS-Puffer	1 % BSA in DPBS
Puffer nach der Weise	1 Puffertablette in 1 l dH <sub>2</sub> O gelöst
Solubilisierungspuffer	10 % SDS in 0,01 N HCl

### 3.1.6 Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako/AGILENT, Hamburg, Deutschland
RealTime Glo Cell Viability Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
Färbe-Kit-Systems Hemacolor	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.7 Proteine

Recombinant human CXCL8/IL-8	R&D Systems, Minnesota, USA
Reparixin (CXCR1 und -2 Inhibitor)	MCE, New Jersey, USA

### 3.1.8 Antikörper

Anti-E-Cadherin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-N-Cadherin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-human CXCR1/IL-8 RA PE-conjugated antibody	R&D Systems, Minnesota, USA
Anti-human CXCR2/IL-8 RB PE-conjugated antibody	R&D Systems, Minnesota, USA
Anti-mouse IgG2A Isotype Control, Phycoerythrin conjugated	R&D Systems, Minnesota, USA
Anti-rat IgG2A Isotype Control, Phycoerythrin conjugated	R&D Systems, Minnesota, USA

### 3.1.9 Zelllinie

Die humane, epithelial-endometriotische Zelllinie **12Z** wurde uns freundlicherweise von Frau Prof. Anna Starzinski-Powitz, Goethe-Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt. Diese stammt aus einer aktiven, roten oberflächlich-peritonealen Läsion und wurde mittels SV40-Transfektion immortalisiert (130).

### **3.1.10 Software**

BD CellQuest Pro (Version 5.2.1), BD Biosciences, Woking, UK

FlowJo (Version 10.2), BD Biosciences, Woking, UK

Leica Application Suite/LAS (Version 4.9), Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz

Microsoft Excel, Word, PowerPoint (Version 2016), Microsoft, Redmond, USA

## **3.2 Methoden**

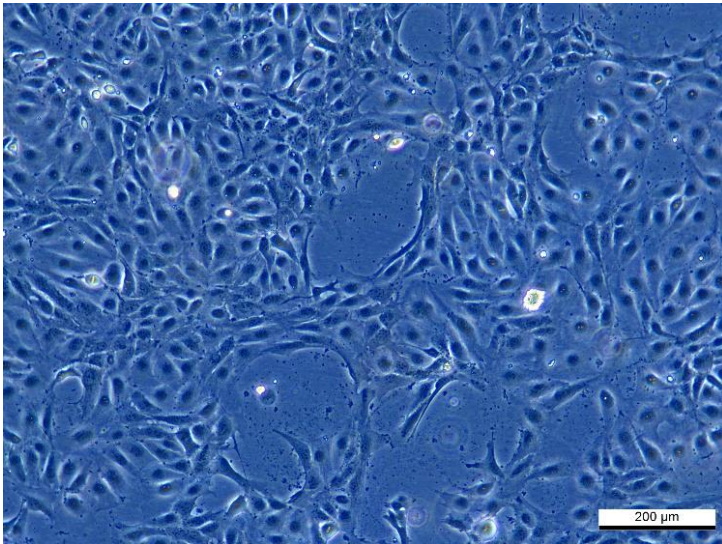
### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Steriles Arbeiten**

Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit Einmalhandschuhen an einer Werkbank durchgeführt. Gebrauchsmaterialien wurden zuvor mit 70 %igem Ethanol oder UV-Strahlung desinfiziert. Die benötigten Medien und Reagenzien wurden vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C erwärmt.

#### **3.2.1.2 Kultivierung der Zelllinie 12Z**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Für die epitheliale Zelllinie 12Z wurde das Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F-12) mit dem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (P/S-Lösung) verwendet. Abhängig vom Versuchsaufbau wurden die Zellen in verschieden großen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup>) herangezüchtet und regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach spätestens drei Tagen wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Hierfür erfolgte nach Entfernung des alten Mediums ein Waschschrift mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) zur Eliminierung bereits abgestorbener, gelöster Zellen. Frisches Kulturmedium wurde zugegeben.



**Abbildung 4 Repräsentative Darstellung der Zelllinie 12Z**

Das Bild wurde mit dem Mikroskop Leica DMIL LED mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt 200 µm.

#### 3.2.1.3 Passagieren

Bei konfluentem Wachstum (etwa 80 %) wurden die Zellen gesplittet. Nach Absaugen des alten Mediums aus der Kulturflasche wurde der Zellrasen ein- bis dreimal mit maximal 10 ml DPBS gewaschen. Um die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurde eine Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (500 µl für eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche, 1 ml für eine 75 cm<sup>2</sup>) auf die Zellen gegeben und durch Schwenken gut verteilt. Nach etwa 1 Minute (min) Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurde das Ablösen der Zellen durch Klopfen am Kulturflaschenrand zusätzlich unterstützt. Um im nächsten Schritt die Trypsin-Reaktion zu stoppen, wurden 9 ml Kulturmedium hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mehrfach resuspendiert und nach gewünschtem Verdünnungsverhältnis in eine neue Kulturflasche und/oder für geplante Versuche in ein Polypropylen (PP)-Röhrchen überführt.

#### 3.2.1.4 Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen zunächst, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, gewaschen und abgelöst. Nach Homogenisierung der Zellsuspension mit Kulturmedium wurde diese in ein PP-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1200 Umdrehungen pro min (rpm)/300 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium, bestehend aus 90 % FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Frostschutz gelöst. Im Anschluss wurde 1 ml der Zellsuspension in ein Kryogefäß pipettiert. Um eine kontrollierte Abkühlung von 1 °C pro min zu gewährleisten, wurden die befüllten Kryogefäße



zunächst in einem Isopropanol- Behälter über Nacht bei -80 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryogefäße in den Kryotank mit Flüssigstickstoff bei -196 °C überführt.

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden dem Kryotank entnommene Kryogefäße zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Zusammen mit 1 ml Kulturmedium wurden die Zellen in ein PP-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm/300 g und RT zentrifugiert. Um Reste des DMSO zu entfernen, wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausplattiert.

#### 3.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Für die durchgeführten Versuche wurden unterschiedliche Zellzahlen benötigt. Um pro Versuchsdurchlauf möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen, wurde jeweils die Zellzahl automatisch per LUNA™ Automated Cell Counter bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension auf ein LUNA™ Cell Counting Slide pipettiert und jeweils zwei Zählungen dokumentiert. Aus dem gebildeten Mittelwert wurde die benötigte Menge an Zellsuspension bestimmt.

### 3.2.2 Follikelflüssigkeit

Die gesammelte FF stammte von Frauen, die im IVF-Programm des Fertilitätszentrums der Universitätsmedizin Mainz behandelt wurden. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Landesärztekammer Rheinland-Pfalz, Mainz, Deutschland: 2020.15343). Einschlusskriterien waren das Alter der Frauen zwischen 18 und 40 Jahren, eine Anti-Müller-Hormon-Konzentration zwischen 1 und 7 ng/ml und eine männliche Unfruchtbarkeit als Grund für die Unfruchtbarkeitsbehandlung. Von allen Patientinnen wurde eine informierte Zustimmung zur wissenschaftlichen Verwendung von FF eingeholt. Die Behandlung wurde nach dem Standard-IVF-Protokoll durchgeführt, wie an anderer Stelle erläutert (182). Bei der Entnahme wurde zunächst der Oozyten-Kumulus-Komplex identifiziert und separiert. Es wurde darauf geachtet, nur FF ohne Spülmedium zu sammeln. Um FF von zellulären Bestandteilen zu trennen, wurden die Proben zunächst für 10 min und 2000 rpm/800 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend filtriert und bei -20 °C gelagert. Nach der Entnahme von insgesamt 18 Proben wurde eine zufällige Verteilung von jeweils 6 Proben auf insgesamt drei Pools (**FF1**; **FF2**; **FF3**) vorgenommen.

### 3.2.3 Bestimmung des Kontrollmediums

Um über einen längeren Behandlungszeitraum von bis zu 48 h eine Kontrolle mit ausreichend lebenden Zellen zu gewährleisten, wurde die Zellviabilität von 12Z-Zellen in Medienansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen an FCS zu unterschiedlichen Zeitpunkten getestet.

Die Zellen wurden nach Waschvorgang, Trypsin-Reaktion, Zentrifugation und Resuspension auf eine Zellkonzentration von  $3,5 \times 10^4$  Zellen/ml gebracht. Pro Well einer 96-Well-Platte wurden circa  $3,5 \times 10^3$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h wurde das alte Medium verworfen und gegen 100  $\mu$ l/Well frisches Medium ausgetauscht. Es wurden vier Medienansätze DMEM/F-12 mit unterschiedlichen Konzentrationen an FCS (0, 1, 2 und 10 %) eingesetzt. Die Messung der Zellviabilität wurde im zeitlichen Verlauf der Kultivierung nach 12 h, 24 h, 32 h, 48 h, 60 h und 72 h durchgeführt.

### 3.2.4 Behandlung von 12Z für funktionelle Zellanalysen

In dem unter 3.2.3 beschriebenen Vorversuch wurde ein serumreduziertes Medium DMEM/F-12 mit dem Zusatz von 2 % FCS (**SR-M**) als Kontrollmedium bestimmt.

Für die funktionellen Zellanalysen der Zellviabilität und -proliferation nach FF-Behandlung wurden die Zellen nach Waschvorgang, Trypsin-Reaktion, Zentrifugation und Resuspension analog zum Vorversuch mit circa  $3,5 \times 10^3$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h wurde das alte Medium gegen 100  $\mu$ l/Well SR-M ausgetauscht und für weitere 24 h inkubiert. Am Versuchstag wurden die Zellen mit FF der drei Pools (FF1, FF2, FF3) in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50 und 75 % in SR-M) behandelt. Als Kontrolle wurde das SR-M entsprechend den Mischungsverhältnissen von FF mit DPBS (10, 25, 50 und 75 % in SR-M) gemischt. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 100 % DPBS sowie 100 % SR-M einbezogen. Die Stoffwechselaktivität und die Zellproliferation wurden pro Pool nach 24 h und 48 h Behandlung bestimmt.

Für die chemotaktische Migrationsanalyse gab es insgesamt vier verschiedene Versuchsansätze. Die Zellen wurden mit Kulturmedium in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen herangezüchtet. Nach zwei Tagen Inkubation war eine Konfluenz der Zellen von ungefähr 50 % erreicht. Es folgte eine Umstellung der Zellen auf SR-M für weitere 24 h. Um den Einfluss von FF auf die Motilität von 12Z zu untersuchen, wurden für den ersten Versuchsansatz die Zellen für 24 h mit 50 % FF/SR-M (pro Pool eine Kulturflasche) vorbehandelt. Für die Analyse der chemotaktischen Wirkung von FF im zweiten Versuch wurden die Zellen einer Zellkulturflasche für 24 h auf 50 % DPBS/SR-M umgestellt. Um den chemotaktischen Effekt von IL-8 (direkt und als Komponente von FF) auf 12Z-Zellen zu prüfen, wurden diese im dritten und vierten Versuchsansatz für 48 h mit Reparixin, einem IL-8-Rezeptor-Inhibitor (CXCR1/-2 Inhibitor, IC<sub>50</sub>-Wert=0,1  $\mu$ mol/l verdünnt in 50 % DPBS/ SR-M), vorbehandelt. Für jeden der

vier Versuchsansätze wurden als Kontrolle unbehandelte Zellen, kultiviert in 50 % DPBS/SR-M, mitgeführt.

### 3.2.5 Zellviabilität

Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität der Zellen wurde der MTT-Test verwendet. Dieser beruht auf einer enzymatischen Reduktion durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in lebenden Zellen. Das lösliche, gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) wird zu blauem, unlöslichen Formazan reduziert. Die umgesetzten Farbstoffkristalle können durch Zugabe von Alkohol gelöst und anschließend spektrophotometrisch gemessen werden (183). Nach Ablauf der Inkubationszeit bzw. der Behandlungszeit (siehe Abschnitt 3.2.3) wurden 10 µl/Well des 0,5 %igen MTT zugegeben und für 4 h bei 37 °C im Inkubator inkubiert. 100 µl/Well des Solubilisierungspuffers wurden für weitere 4 h auf einem Schüttler bei 1000 rpm und 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl des Überstands in eine neue 96-Well-Platte überführt und schließlich die Extinktion im ELISA Reader bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) bestimmt.

### 3.2.6 Zellproliferation

Die Zellproliferation wurde mittels der BrdU-Inkorporation mit Antikörper-vermittelter Detektion beurteilt. Die Methode basiert auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in die DNA proliferierender Zellen. Die anstelle von Thymidin eingebaute Base BrdU wird durch die Bindung eines enzymgekoppelten Antikörpers markiert. Durch eine Substrat-Reaktion kommt es zum Farbumschlag, dessen Intensität photometrisch gemessen werden kann (184).

Nach der Zellbehandlung (siehe Abschnitt 3.2.3) wurden 10 µl/Well BrdU-Arbeitslösung (1:100 in DPBS verdünnt) zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit wurde das BrdU in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl/Well fixDenat™-Lösung für 30 min bei RT fixiert und denaturiert. Die Lösungen wurden nach der Inkubationszeit entfernt und der enzymgekoppelte Antikörper wurde für 60 min bei RT zu den Zellen gegeben. In der Anti-BrdU-Antikörperlösung wurde der Antikörper 1:100 in Dilution Solution verdünnt. Danach wurde die Lösung verworfen und überschüssige Antikörperlösung in der 96-Well-Platte dreimal mit je 200 µl/Well 1x Washing Solution ausgewaschen. Es folgte eine Färbung mit 100 µl Substratlösung pro Well für 15 min bei RT. Die Reaktion wurde mit 25 µl pro Well einer 1 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt, erkennbar an einem Farbumschlag von blau zu gelb. Zur Durchmischung wurden die Platten für 1 min auf einen Schüttler bei

300 rpm gestellt. Die Absorption wurde im ELISA Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen.

### 3.2.7 Zellmigration

In dem Versuch der Zellmigration mithilfe der Chemotaxis-Boyden-Kammer wurde die aktive Migration der 12Z-Zellen in Richtung eines Lockstoffs analysiert (185). In diesem Verfahren können Zellen aus der Oberplatte der Kammer durch chemotaktische Stoffe in der Unterkammer zum Wandern angeregt werden. Hierbei müssen sie durch eine poröse Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 8 µm) migrieren, an deren mit Gelatine beschichteten Unterseite sie haften bleiben. Durch Färbung können die haftenden Zellen visualisiert und letztlich mikroskopisch ausgezählt werden.

Nach der jeweiligen Vorbehandlung der Zellen (siehe Abschnitt 3.2.3) wurden diese am Versuchstag nach einem Waschschrift durch Trypsin-Reaktion über eine Zeit von 5 min gelöst, zentrifugiert und mit dem jeweiligen Behandlungsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurden auf eine Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Die Vertiefungen der unteren Migrationskammer wurden mit jeweils 29 µl des chemotaktischen Lockstoffs gefüllt. Abhängig von der Fragestellung wurden als Lockstoffe die Extrazellulär-Matrix (EZM)-Komponente Fibronectin (10 µg/ml in 50 % DPBS/SR-M), 50 % FF/SR-M (FF1, FF2, FF3) oder rekombinantes humanes IL-8 in drei verschiedenen Konzentrationen (200 pg/ml, 1000 pg/ml, 100 ng/ml in 50 % DPBS/SR-M) eingesetzt. In allen Durchgängen wurde eine Negativkontrolle mit dem Einsatz von 50 % DPBS/SR-M mitgeführt. Anschließend wurde die untere Kammer mit der Polycarbonatmembran, welche zuvor für 2 min in DPBS äquilibriert wurde, mit der glänzenden Seite nach unten abgedeckt. Nachdem ein Dichtungsring und der obere Teil der Migrationskammer aufgelegt wurden, wurde die Kammer mit sechs Schrauben fest verschlossen. Nun wurden von der bereits vorbereiteten Zellsuspensionen je 50 µl/Well in die Vertiefungen der oberen Kammer pipettiert. Die Migrationskammer wurde dann für 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension aus dem oberen Kammerteil verworfen und dieser im Anschluss vorsichtig von dem unteren Kammerteil abgeschraubt und entnommen. Im nächsten Schritt wurde die Membran zwischen zwei Klammern gespannt und auf der rauhen Membranseite abgelegt. Die raue, zuvor der Zellsuspension zugewandte Membranseite konnte nach zweimaligem Waschen mit Puffer nach Weise durch mechanisches Ziehen über einen Zellschaber von nicht migrierten Zellen befreit werden. Nachdem die Membran getrocknet war, wurden die migrierten Zellen auf der glänzenden Seite der Membran für 1 min in einem Ethanolbad fixiert. Nach erneuter Trocknung der Membran

wurden die Zellen mittels des Färbe-Kit-Systems Hemacolor gefärbt. Hierfür wurde die glänzende, mit den Zellen fixierte Membranseite zuerst dreimal durch die rötliche Lösung 2 und danach sechsmal durch die bläuliche Lösung 3 gezogen. Direkt im Anschluss wurde die Membran durch Waschen im Puffer nach Weise von überschüssigem Färbemittel befreit. Die gefärbte und getrocknete Membran wurde dann auf einem Objektträger mit Immersionsöl geglättet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Ränder wurden durch das Auftragen von Nagellack abgedichtet. Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung mit einem mikroskopischen Testrasterokular, welches ein Quadrat aus  $100\text{ mm}^2$  mit  $10 \times 10$  Kleinquadraten darstellt. In jedem Migrationsfeld wurden 10 Quadrate mit einer entsprechenden Membranfläche von insgesamt  $2,5\text{ mm}^2$  ausgezählt. Aus der Summe von 4 Migrationsfeldern pro Ansatz wurde der Mittelwert ermittelt und dieser als absoluter Zahlenwert für eine Fläche von  $1\text{ mm}^2$  dargestellt.

Die Reinigung der Migrations-Boydenkammer wurde mit einer 1 %igen Terg-a-Zyme-Lösung durchgeführt. Die benötigte Menge an Terg-a-Zyme wurde in destilliertem Wasser unter Rühren auf einer Heizplatte bei  $40\text{ }^\circ\text{C}$  gelöst. Die zuvor mit destilliertem Wasser abgespülten Kammern wurden über Nacht in der angesetzten Reinigungslösung belassen und am nächsten Tag nach erneutem Abspülen an der Luft trocknen gelassen.

### **3.2.8 Immunzytochemische Färbung der Zellen**

Für den Nachweis einer E- und N-Cadherin-Expression der 12Z-Zelllinie nach Behandlung mit FF erfolgte eine immunzytochemische Färbung mit dem Dako REAL™ EnVision™ Detection System-Kit.

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen auf einem 8 Kammer-Objektträger mit einer Konzentration von  $3,5 \times 10^3$  Zellen in  $200\text{ }\mu\text{l}$  Kulturmedium pro Kammer kultiviert. Nach einem Tag Inkubation folgte ein Mediumwechsel zu SR-M für weitere 24 h. Es folgte eine 24-stündige Behandlung mit 50 % FF/SR-M oder 50 % DPBS/SR-M als Kontrolle. Nach Ablauf der Behandlungszeit von 24 h wurde das Medium aus den Kammern verworfen und die Zellen mit je  $200\text{ }\mu\text{l}$  des 4 %igen Histofix für 1 h bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS gewaschen. Im nächsten Arbeitsschritt folgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen. Hierfür wurden die Zellen mit einer 3 %igen Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-Lösung für 10 min inkubiert. Danach wurden die Kammern mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern anti-E-Cadherin oder anti-N-Cadherin. Diese wurden mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  pro Kammer nach Hersteller-Empfehlung in einer Verdünnung von 1:50 mit dem Antibody Diluent hergestellt. Parallel zu jedem Antikörper wurde eine Negativkontrolle nur mit Antibody Diluent mitgeführt. Der 8-Kammer-Objektträger wurde über Nacht in einer Feuchtekammer bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Am nächsten Tag wurde zunächst die

Antikörperlösung in den Kammern entfernt und diese anschließend dreimal für je 2 min mit DPBS ausgewaschen. Danach folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit dem sekundären Antikörper Dako Realtime EnVision (rabbit/mouse). Nach dem Inkubationsschritt wurden die Kammern dreimal für je 2 min mit DPBS ausgewaschen. Danach wurde die erste Färbung mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB+Chromogen (1:50 in Substratpuffer verdünnt) bei RT durchgeführt. Die Farbreaktion wurde nach ungefähr 4 min, bis eine deutliche Färbung zu sehen war, durch die Zugabe von Leitungswasser gestoppt. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung mit Mayers-Hämalaun. Nach 5-minütiger Inkubation wurde das Färbemittel verworfen. Im Anschluss konnte das Kammersystem von dem Objektträger gelöst und dieser danach für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült werden, bis das Wasser klar war. Danach folgte die Entwässerung mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Objektträger wurden hierbei 2 min in 70 % EtOH, 2 min in 96 % EtOH, 2 x 2 min in 100 % Isopropylalkohol und zum Schluss 3 x 5 min in Xylol eingetaucht. Letztlich wurden die Objektträger mit Histo-Mic eingebettet und mikroskopisch ausgewertet.

### 3.2.9 Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der Wirkung von FF auf die Expression der beiden Interleukin-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 bei 12Z-Zellen wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Zellen wurden mit Kulturmedium in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach zwei Tagen erfolgte ein Medienwechsel zu SR-M und Inkubation für weitere 24 h. Bei einer Wachstumsdichte der Zellen von ungefähr 50 % wurde die Behandlung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen für 24 h in 50 % FF/SR-M (pro Pool eine Kulturflasche) oder als Kontrolle in 50 % DPBS/SR-M kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA für 5 min abgelöst, resuspendiert und anschließend für 5 min bei 1200 rpm/300 g und RT zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands folgte ein weiterer Waschschrift mit DPBS und die Zellsuspensionen wurden nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Überstands wurde das Pellet zur Fixierung der Zellen in 1 ml 4 %-igen Histofix inkubiert. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde das Zellpellet einmal mehr mit DPBS aufgefüllt, zentrifugiert und die Zellen nach Entfernung des Überstands in FACS-Puffer (DPBS+1 % BSA) resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf eine Zellkonzentration von 10x10<sup>6</sup> Zellen/ml FACS-Puffer eingestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte unter Verwendung der lichtempfindlichen Phycoerythrin-markierten Antikörpern fanden unter abgedunkelten Bedingungen statt. Pro Reaktionsgefäß für anti-CXCR1, anti-CXCR2 und die beiden jeweiligen Isotypenkontrollen IgG2A wurden 100 µl Antikörperlösung mit einer 1:10-Verdünnung in FACS-Puffer angesetzt. Von jeder Probe (3 Pools; 1 Kontrolle) wurden nun 100 µl Zellsuspension (10<sup>6</sup> Zellen) zu 100 µl der jeweiligen Antikörperlösungen

gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden nach kurzem Vortexen für 1 h bei 4 °C auf Eis gelagert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden alle Reaktionsgefäße erneut gevortext.

Nach Ablauf der 60-minütigen Antikörper-Inkubation wurden die Zellen wiederholt mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und schließlich in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Im letzten Arbeitsschritt vor der Messung wurde die Zellsuspension in Durchflusszytometergeeignete Rundbodenröhrchen aus Polypropylen überführt und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am FACS Calibur der Firma BD mit der Software CellQuest Pro und konnten mithilfe des Programms FlowJo v10.2 ausgewertet werden. Aus den detektierten Intensitäten, welche mit der Expression der IL-8-Rezeptoren einhergehen, wurde der Mittelwert (M; in der englischen Literatur „Mean“) gebildet und mithilfe von Microsoft Excel relativ zu unbehandelten Zellen grafisch dargestellt.

### **3.2.10 Statistik**

Alle Viabilitäts-, Proliferations- und Migrationsversuche wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchen mit vierfachen Ansätzen für jede Behandlung und jeden Zeitpunkt durchgeführt. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Die Standardabweichung wurde berechnet und als Fehlerbalken dargestellt. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein Student's t-Test durchgeführt, wobei statistische Signifikanz bei einem P-Wert  $p < 0,05$  angenommen wurde.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantifizierung von Komponenten aus FF1, FF2 und FF3

Um den Einfluss von FF auf die Krankheitsentstehung und -progression der Endometriose beurteilen zu können, wurden zunächst drei Pools von FF (FF1, FF2, FF3) erstellt. Insgesamt 18 gesammelte FF-Proben wurden hierfür mit den Proben von jeweils sechs Patientinnen zufällig auf drei Pools verteilt. Um eine Vergleichbarkeit der drei Pools gewährleisten zu können, wurden diese auf die Quantität verschiedener Komponenten untersucht. *Tabelle 1* zeigt das Ergebnis des laborchemischen Nachweises von 10 Komponenten durch das Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Zentrallabor) der Universitätsmedizin Mainz.

Die Pools der FF von Frauen, welche sich einer IVF-Behandlung unterzogen, zeigten erwartungsgemäß erhöhte Konzentrationen für die Hormone Estradiol, Progesteron und humanes Choriongonadotropin (hCG) im Vergleich zu den Serum-Referenzwerten. Beim Vergleich der drei Pools untereinander konnten Konzentrationsunterschiede für Estradiol, Progesteron und hCG festgestellt werden. Hierbei zeigte FF2 die höchste Konzentration an Estradiol (2790,0 pg/ml) sowie hCG (69,5 IU/l) und die niedrigste Progesteronkonzentration (60,24 ng/ml). Die Zytokine IL-6 und IL-8 waren innerhalb der FF-Pools deutlich höher konzentriert als im Blutserum. IL-6 zeigte große Schwankungen zwischen den drei Pools mit dem höchsten Wert von 736 pg/ml in FF2. Für IL-8 waren dagegen konstantere Werte erkennbar. Während die IL-8-Konzentration in den Pools FF1 und FF2 219,9 pg/ml und 219,1 pg/ml betrug, lag sie in Pool FF3 nur bei 178,3 pg/ml. Die übrigen Komponenten - Calcium, Magnesium, luteinisierendes Hormon (LH), follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Insulin-like Growth Faktor-1 (IGF-1)- wiesen nur minimale Abweichungen zwischen den drei Pools auf.



**Tabelle 1 Konzentration verschiedener Komponenten in den drei FF-Pools (FF1; FF2; FF3). Jeder Pool enthält die FF von sechs Patientinnen.**

Komponenten FF	Serum-Referenzwerte	FF1	FF2	FF3
Calcium (mM)	2,5-2,8	2,11	2,07	2,07
Magnesium (mM)	0,7-0,91	0,75	0,73	0,77
LH (IU/l)	0,6-89	0,71	0,65	0,75
FSH (IU/l)	1,4-17,0	3,4	4,4	4,0
Estradiol (pg/ml)	20-650	2494,0	2790,0	2681,0
Progesteron (ng/ml)	0,1-16	73,55	60,24	82,57
IGF-1 (ng/ml)	8-131	108	108	106
hCG (IU/l)	< 5	40,2	69,5	63,6
Interleukin-6 (pg/ml)	< 7	36	736	15
Interleukin-8 (pg/ml)	< 62	219,8	219,1	178,3

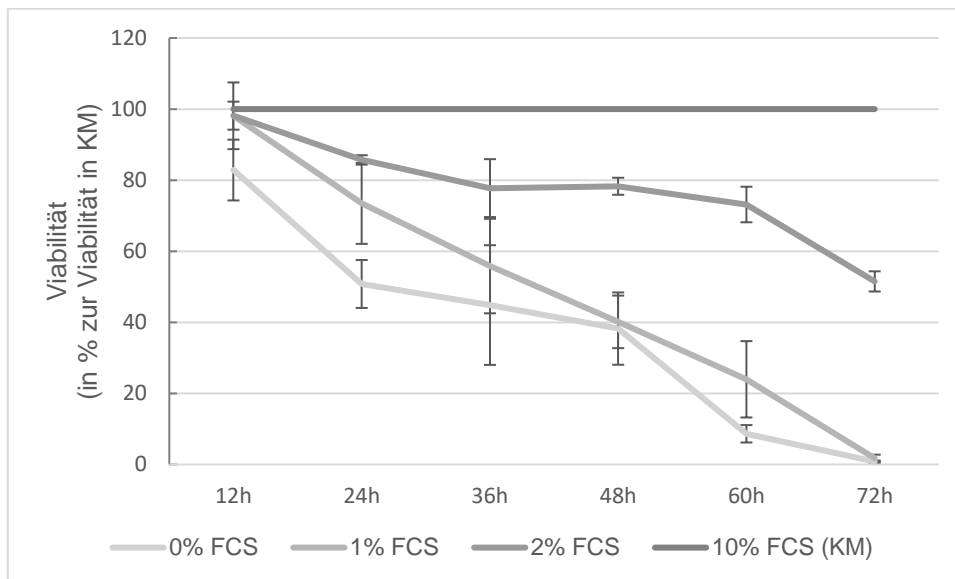
LH, Luteinisierendes Hormon; FSH, Follikelstimulierendes Hormon; IGF-1, Insulin-like Growth Faktor 1; hCG, Humanes Choriongonadotropin

## 4.2 Bestimmung des Kontrollmediums

Als Grundlage für die geplanten Versuche mit der epithelialähnlichen endometriotischen Zelllinie 12Z musste zu Beginn ein geeignetes Kontrollmedium bestimmt werden. Mittels des MTT-Assays wurde hierfür die Zellviabilität von 12Z-Zellen in vier Medienansätzen von DMEM/F-12 mit dem Zusatz von 0, 1, 2 und 10 % FCS über die Dauer der Kultivierung untersucht. Als Kriterium eines geeigneten Kontrollmediums wurde festgelegt, dass die Viabilität von 12Z im Kontrollmedium mindestens 50 % der Viabilität von 12Z im Medium mit dem Zusatz von 10 % FCS (=Kulturmedium) aufweisen soll.

Je geringer das FCS im Medium konzentriert war, desto stärker fiel die Reduktion der Stoffwechselaktivität von 12Z aus. Bereits ab einer Inkubationszeit von 24 h ließ sich ein deutlicher Unterschied der Zellvitalität in den Medien mit 0, 1 und 2 % FCS jeweils im Vergleich zu den Zellen im Kulturmedium feststellen. Die Stoffwechselaktivität der Zellen sank nach 24 h Kultivierung im Medium ohne Zusatz von FCS bereits auf 51 % und im Medium mit der Konzentration von 1 % FCS auf 73 %. Die 12Z-Zellen im Medium mit dem Zusatz von 2 % FCS wiesen nach 24 h noch eine Viabilität von 86 % auf. Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich

der Unterschied noch stärker. Während die Vitalität der Zellen nach 48 h im Medium mit 0 und 1 % FCS jeweils unter 50 % derer im Kulturmedium lag (40 %, 38 %), erreichten die Zellen im Medium mit dem Zusatz von 2 % FCS noch eine Viabilität von 78 %. Nach insgesamt 72 h Inkubation konnten nur die Zellen in dem Medium mit 2 % FCS überleben. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sie eine Stoffwechselaktivität von 52 % (Abbildung 5). Mithilfe dieses Ergebnisses wurde das Medium mit einem Zusatz von 2 % FCS (**SR-M**) als geeignetes Kontrollmedium für längere Inkubationszeiten von bis zu 72 h festgelegt.



**Abbildung 5 Zellviabilität von 12Z-Zellen in vier verschiedenen Medienansätzen von DMEM/F-12 mit dem Zusatz von 0, 1, 2 und 10 % FCS**

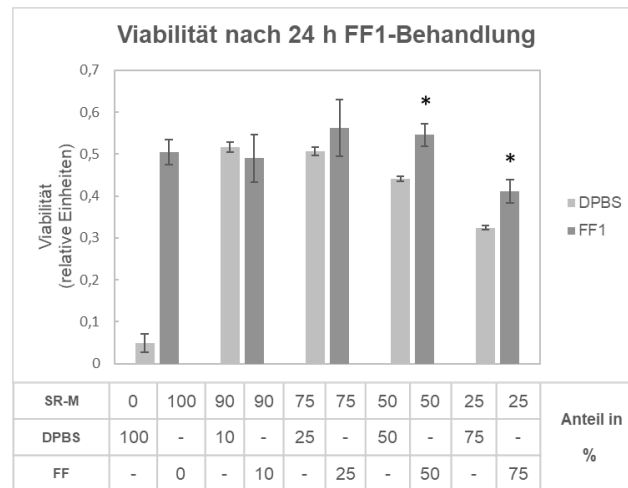
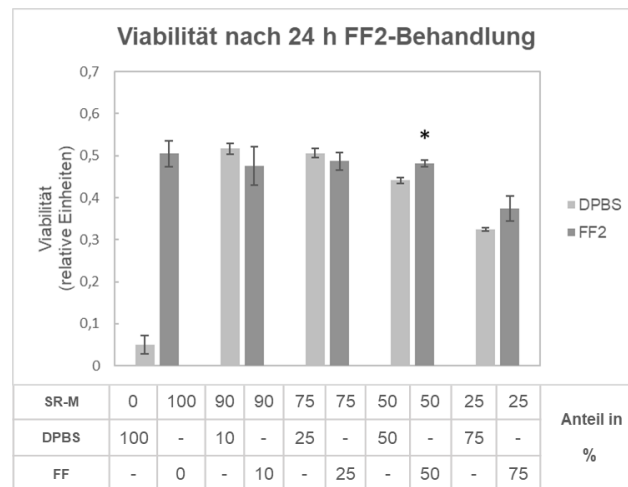
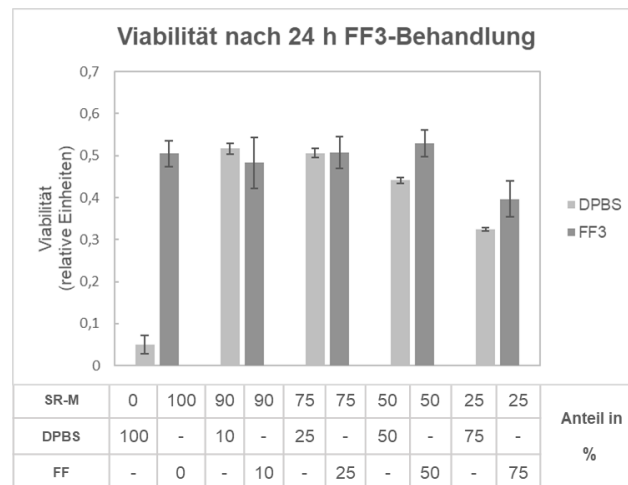
Die Vitalität unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an FCS wurde nach den Inkubationszeiten von 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h und 72 h mittels MTT-Assay ermittelt. Die Werte der Zellen im Medium mit 10 % FCS (Kulturmedium (KM)) wurden als 100 % definiert, alle anderen gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Grafisch dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen mit Standardabweichungen.

### 4.3 Bedeutung von FF für zelluläre Prozesse der Krankheitsentstehung

Durch die zyklisch wiederkehrende Freisetzung von FF in die Peritonealhöhle stellt diese einen wichtigen Faktor der Mikroumgebung für retrograd ausgeschwemmte Zellen dar. Um herauszufinden, welchen Einfluss die FF auf die Krankheitsentstehung und Progression von Endometriose nimmt, wurden verschiedene *in vitro*-Untersuchungen mit der endometriotischen Zelllinie 12Z durchgeführt. Die auf drei Pools aufgeteilte FF wurde hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Vitalität, die Proliferation und die Migration von 12Z-Zellen analysiert. Außerdem wurde die Auswirkung von FF auf die Ausbildung der interzellulären Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin und N-Cadherin untersucht.

#### 4.3.1 Einfluss von FF auf die Zellviabilität

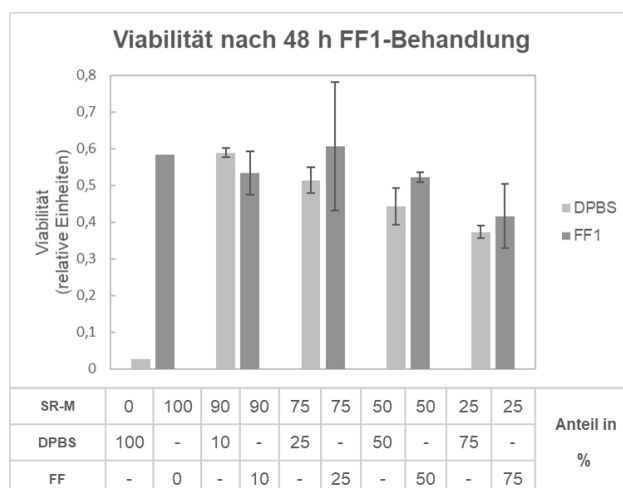
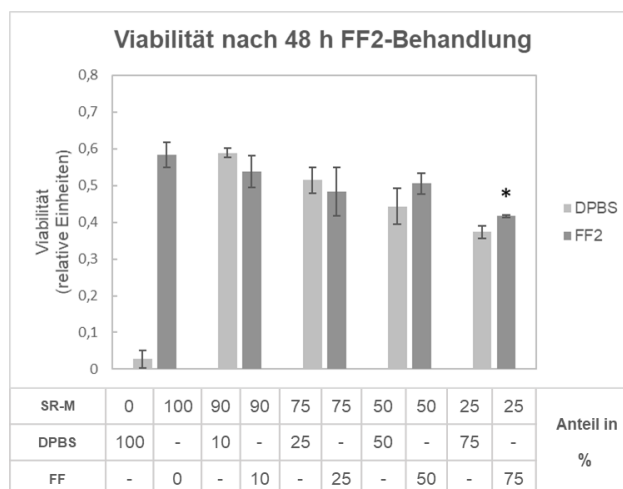
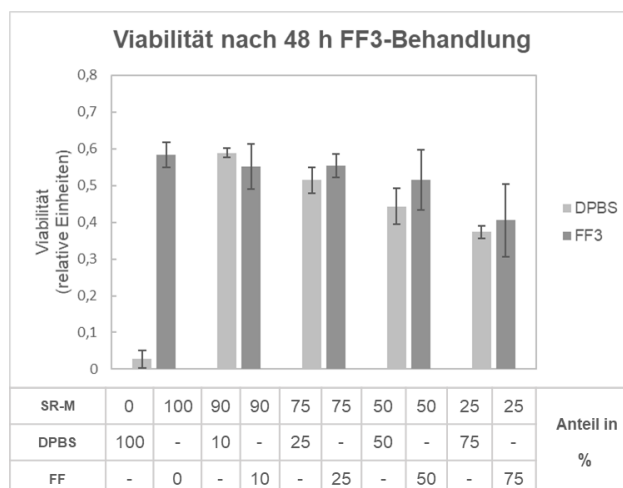
Die Überprüfung der Zellviabilität nach 24 h und 48 h Behandlung mit FF1, FF2 und FF3 in jeweils vier Konzentrationen (10, 25, 50, 75 % FF in SR-M) erfolgte mithilfe des MTT-Assays. Die unter diesen Bedingungen induzierte Stoffwechselaktivität wurde mit entsprechenden DPBS-Kontrollen zu den jeweiligen Mischungsverhältnissen von FF (10, 25, 50, 75 % DPBS in SR-M) verglichen. Zusätzlich dienten zwei Ansätze mit 100 % DPBS bzw. 100 % SR-M als Kontrollen. Zu dem Messzeitpunkt nach 24 h lag die Stoffwechselaktivität des Kontrollansatzes mit 100 % DPBS (0,05 relative Einheiten(RE)) um das 10-Fache unter der Viabilität der Zellen in 100 % SR-M (0,50 RE) (*Abbildung 6*). Die DPBS-Kontrollen zeigten mit zunehmender Konzentration von 10 bis 75 % eine stetige Reduktion der Viabilität. Im Gegensatz dazu bewirkte die FF aller drei Pools erst ab einer Konzentration von 75 % einen deutlichen Abfall der Zellaktivität. Nach Behandlung der Zellen mit FF und DPBS in den Konzentrationen von 10 und 25 % zeigten sich nur minimale Unterschiede mit Ausnahme von FF1. Hier wurde bereits bei 25 % FF-Zusatz die höchste Viabilität von 0,56 RE gemessen, welche leicht oberhalb des Wertes der entsprechenden DPBS-Kontrolle lag (0,51 RE). Mit steigenden Konzentrationen von 50 und 75 % FF1 nahm die Viabilität zwar ab, jedoch überstieg sie signifikant die Viabilität der jeweiligen Kontrollen um 24 bzw. 26 % ( $p = 0,023$ ;  $p = 0,037$ ). FF2 zeigte einen ähnlichen Verlauf. Die Konzentrationen von 50 und 75 % FF2 bewirkten eine leicht stärkere Viabilität im Vergleich zu den jeweiligen DPBS-Kontrollen, allerdings nur bei 50 % FF2 mit signifikantem Unterschied (9 %,  $p = 0,026$ ). Die Behandlung mit FF3 erreichte erst bei 50-prozentiger Konzentration den höchsten MTT-Wert von 0,53 RE. Die Zellen zeigten bei 50 und 75 % FF3 eine minimal gesteigerte Viabilität im Vergleich zu den jeweiligen DPBS-Kontrollen (*Abbildung 6*).

**A****B****C**

**Abbildung 6 Zellviabilität von 12Z-Zellen nach 24 h FF-Behandlung**

Die Viabilitätsbestimmung erfolgte mithilfe des MTT-Assays. Die Zellen wurden mit FF1 (A), FF2 (B) und FF3 (C) in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 75 % in SR-M) behandelt und mit entsprechenden DPBS-Kontrollen in den jeweiligen Mischungsverhältnissen von FF verglichen. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 100 % DPBS und 100 % SR-M mitgeführt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem T-Test ermittelt und bei einem  $p$ -Wert  $<0,05$  angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Zellen in entsprechender DPBS-Kontrolle wurden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Nach 48 h Kultivierung lag die Zellviabilität des Kontrollansatzes mit 100 % DPBS (0,03 RE) um circa das 20-Fache unter der Viabilität der Zellen in 100 % SR-M (0,58 RE) (*Abbildung 7*). Mit dem Zusatz von 10 % FF wurde für alle drei Pools eine geringere Viabilität im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle beobachtet. FF1 und FF3 zeigten nach 48 h Behandlung einen ähnlichen Verlauf. Ab der Konzentration von 25 bis 75 % FF induzierten beide Pools zwar eine höhere Viabilität im Vergleich zu den entsprechenden DPBS-Kontrollen, jedoch wurde eine stetige Abnahme der Viabilität mit zunehmender FF-Konzentration verzeichnet. Während FF1 und FF3 die stärkste Zellaktivität bei 25 % FF erzielten (0,61 RE; 0,55 RE), wurde nach der Behandlung mit FF2 der höchste MTT-Wert bei 50-prozentiger Konzentration gemessen (0,50 RE). Bei Kultivierung der Zellen in 75 % FF2 sanken auch hier die Vitalitätswerte, allerdings mit einem signifikanten Anstieg der Viabilität um 12 % gegenüber der Kontrolle ( $p = 0,044$ ) (*Abbildung 7*).

**A****B****C**

**Abbildung 7 Zellviabilität von 12Z-Zellen nach 48 h FF-Behandlung**

Die Viabilitätsbestimmung erfolgte mithilfe des MTT-Assays. Die Zellen wurden mit FF1 (**A**), FF2 (**B**) und FF3 (**C**) in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 75 % in SR-M) behandelt und mit entsprechenden DPBS-Kontrollen in den jeweiligen Mischungsverhältnissen von FF verglichen. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 100 % DPBS und 100 % SR-M mitgeführt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem T-Test ermittelt und bei einem  $p$ -Wert  $<0,05$  angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Zellen in entsprechender DPBS-Kontrolle wurden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Zusammenfassend schwankten die Viabilitätswerte der FF-behandelten Zellen in Abhängigkeit von der FF-Konzentration. Durch den Vergleich mit den entsprechenden DPBS-verdünnten Medien konnte ein Einfluss der FF auf die Viabilität von 12Z-Zellen verdeutlicht werden (*Tabelle 2*). Bei Vergleich der drei Pools bewirkte FF1 insgesamt die größte Wirkung. Für alle drei Pools war der stärkste Effekt jeweils bei einer Konzentration von 50 % FF zu erkennen. Auch die FF-Konzentration von 75 % induzierte in Relation zu der Kontrolle eine erhöhte Viabilität. Allerdings zeigte die Konzentration von 75 % FF eine deutliche Minderung der Stoffwechselaktivität im Vergleich zu geringer konzentrierten FF-Ansätzen. Nach 48 h Kultivierung konnte insgesamt ein geringerer Unterschied der Viabilität von FF-behandelten Zellen zu den jeweiligen DPBS-Kontrollen festgestellt werden. Zudem wurde - mit Ausnahme der 25 %igen FF1-Konzentration - das Niveau des 100 % SR-M-Kontrollansatzes nicht überschritten.

**Tabelle 2 Übersicht über die Effekte von FF1, FF2 und FF3 auf die Viabilität von 12Z-Zellen**

Konzentration	24 h			48 h		
	FF1	FF2	FF3	FF1	FF2	FF3
10 %	=	=	=	=	=	=
25 %	+	=	=	+	=	=
50 %	++	+	+	+	+	+
75 %	++	+	+	+	+	=

Die Veränderungen gegenüber den DPBS-Kontrollen sind semiquantitativ dargestellt (=, kein Unterschied; + oder -, 10 % Unterschied; ++ oder --, 20 % Unterschied und  $p < 0,05$ )

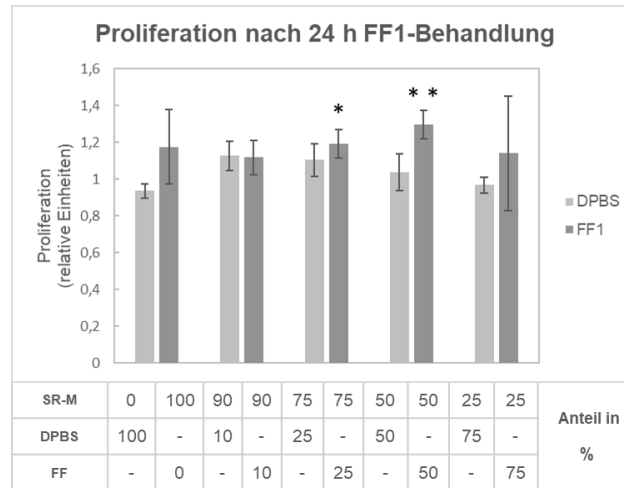
### 4.3.2 Einfluss von FF auf die Zellproliferation

Um die Auswirkungen steigender FF-Konzentrationen nach 24 h und 48 h auf die Zellteilungsrate zu untersuchen, wurden BrdU-Assays durchgeführt. Analog zu dem Versuchsaufbau des MTT-Tests, wurden die Zellen mit FF1, FF2 und FF3 in jeweils vier Konzentrationen (10, 25, 50, 75 % FF in SR-M) behandelt und entsprechenden DPBS-Kontrollen zu den jeweiligen Mischungsverhältnissen von FF (10, 25, 50, 75 % DPBS in SR-M) gegenübergestellt. Zusätzlich dienten zwei Ansätze - mit 100 % DPBS bzw. 100 % SR-M - als Kontrollen.

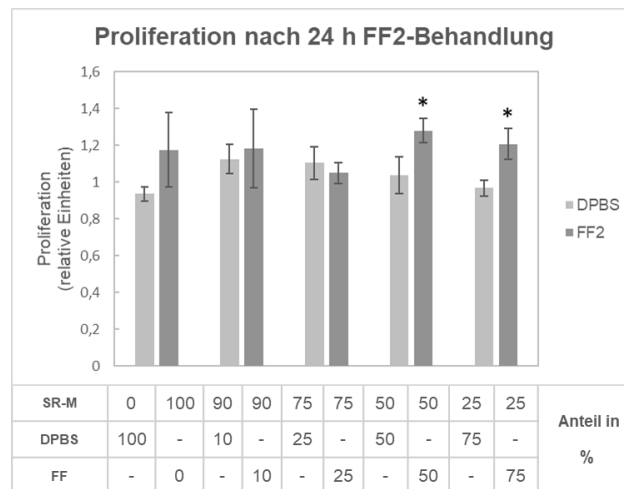
Ähnlich der Zellviabilität zeigten die Kontrollen mit zunehmenden Konzentrationen an DPBS eine kontinuierliche Minderung der Proliferationsfähigkeit. Die Proliferationsrate des Kontrollansatzes mit 100 % DPBS (0,93 RE) nach 24 h war nur um das circa 1,3-Fache im Vergleich zum Kontrollmedium mit 100 % SR-M (1,18 RE) verringert (*Abbildung 8*). Die Behandlung mit FF der drei Pools zeigte unterschiedliche Verläufe. FF1 führte mit steigender Konzentration zu einer stetigen Zunahme der Proliferation mit einem maximalen Wert bei 50 % FF (1,30 RE). Die Kultivierung in 25 und 50 % FF1 induzierte eine signifikant gesteigerte Wachstumsrate um 7 bzw. 25 % gegenüber der jeweiligen DPBS-Kontrolle ( $p = 0,041$ ;  $p = 0,002$ ). Für FF2 und FF3 wurde zunächst von 10 auf 25 % ein minimaler Rückgang der Zellproliferation unterhalb des Niveaus der DPBS-Kontrolle beobachtet. Mit der Konzentration von 50 % FF zeigte sich für beide Pools erneut ein steigender Effekt mit absoluten Werten von 1,28 RE bei FF2 und 1,20 RE bei FF3. Gegenüber der DPBS-Kontrolle erhöhte sich die Proliferation nach der 50 % FF2-Behandlung signifikant um 24 % ( $p = 0,043$ ). Die Zellen aller Pools reagierten auf die Konzentration von 75 % FF mit einer Reduktion der Teilungsrate, welche im Vergleich zu der DPBS-Kontrolle jedoch erhöht war. Für FF2 und FF3 konnte eine signifikant verstärkte Proliferationsrate um 25 bzw. 21 % beobachtet werden ( $p = 0,012$ ;  $p = 0,046$ ) (*Abbildung 8*).



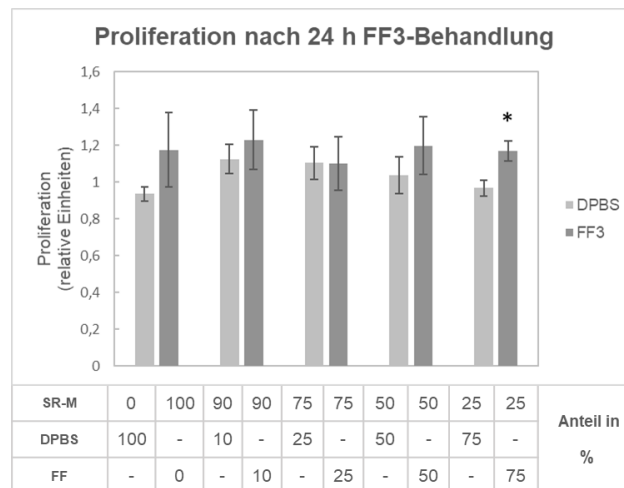
**A**



**B**



**C**

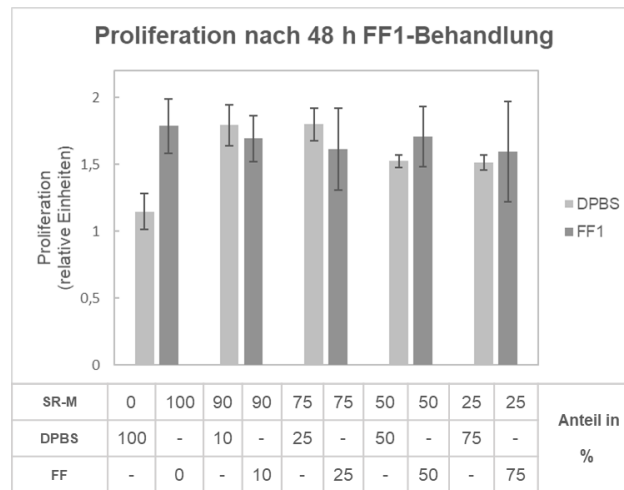


**Abbildung 8 Zellproliferation von 12Z-Zellen nach 24 h FF-Behandlung**

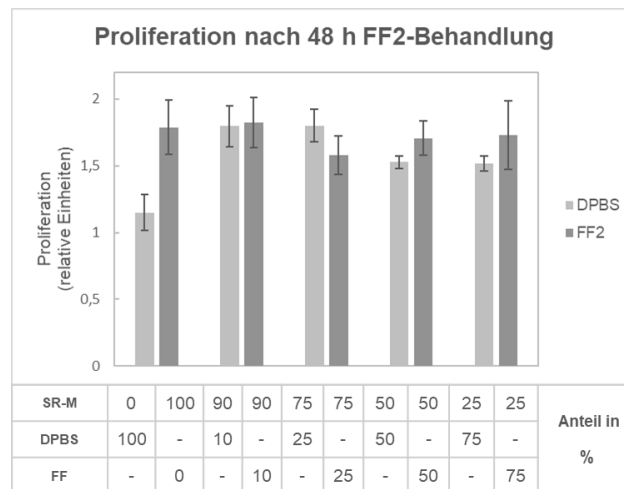
Die Bestimmung der Proliferation erfolgte mittels eines BrdU-basierten Assays. Die Zellen wurden mit FF1 (A), FF2 (B) und FF3 (C) in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 75 % in SR-M) behandelt und mit entsprechenden DPBS-Kontrollen in den jeweiligen Mischungsverhältnissen von FF verglichen. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 100 % DPBS und 100 % SR-M mitgeführt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem T-Test berechnet und bei einem p-Wert <0,05 angenommen, signifikante Unterschiede bezogen auf die Zellen in entsprechender DPBS-Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* = p <0,05, \*\* = p <0,01).

Die Wirkung von FF nach 48-stündiger Behandlung zeigte im Allgemeinen eine Zunahme der Zellproliferation im Vergleich zur Messung nach 24 h. Der Unterschied der Proliferationsrate des Kontrollansatzes mit 100 % DPBS (1,15 RE) vergrößerte sich nach 48 h um das circa 1,6-Fache im Vergleich zum Kontrollmedium mit 100 % SR-M (1,79 RE). Die Proliferationen nach Behandlung mit FF der drei Pools in den einzelnen Konzentrationen zeigten nach 48 h einen ähnlichen Verlauf (*Abbildung 9*). Der Zusatz von 10 % FF pro Pool ergab kaum einen Unterschied zur entsprechenden DPBS-Kontrolle. FF2 zeigte bei 10 %iger Konzentration mit einem Wert von 1,82 RE die höchste gemessene Proliferationsrate. Mit der Konzentration von 25 % FF sank die Proliferationsfähigkeit der FF-behandelten Zellen jedes Pools unter das Niveau der 25 % DPBS-Kontrolle. Erst durch den Zusatz von 50 % wurden minimal fördernde Effekte der FF gegenüber der DPBS-Kontrolle wahrgenommen. Mit steigender Konzentration auf 75 % FF relativierte sich der Effekt wieder durch eine erneute Reduktion der Proliferation. Eine Ausnahme bildete der Pool FF2, bei dem sich die Wachstumsrate von 1,71 RE bei 50 %iger Konzentration minimal auf 1,73 RE bei 75 % FF erhöhte (*Abbildung 9*).

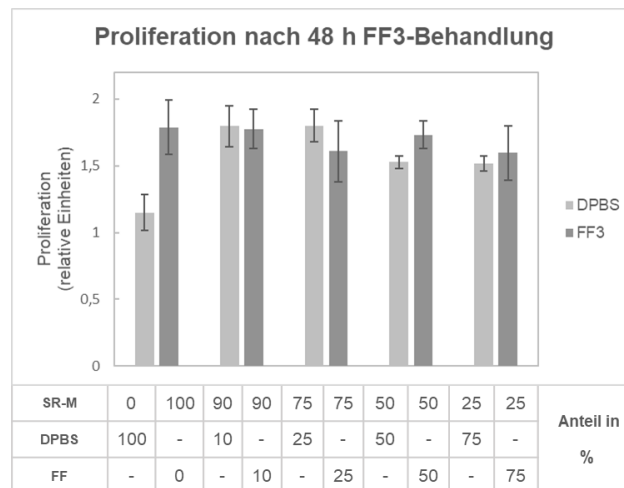
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 9 Zellproliferation von 12Z-Zellen nach 48 h FF-Behandlung.**

Die Bestimmung der Proliferation erfolgte mittels eines BrdU-basierten Assays. Die Zellen wurden mit FF1 (A), FF2 (B), FF3 (C) in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 75 % in SR-M) behandelt und mit entsprechenden DPBS-Kontrollen in den jeweiligen Mischungsverhältnissen von FF verglichen. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 100 % DPBS und 100 % SR-M mitgeführt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem T-Test ermittelt und bei einem p-Wert <0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Zellen in entsprechender DPBS-Kontrolle wurden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Die fördernden Effekte steigender Konzentrationen der FF auf die Proliferation der 12Z-Zelllinie fielen insgesamt nach 24 h stärker aus als nach 48 h (*Tabelle 3*). Die FF-Pools unterschieden sich in ihrer Wirkung auf die Proliferation, da FF1 und FF2 einen stärkeren Effekt hatte als FF3. In Relation zu den DPBS-Kontrollen konnten für die Konzentrationen von 50 und 75 % FF die größten Effekte beobachtet werden. Die Konzentration von 75 % FF wirkte sich insgesamt limitierend auf die Proliferation aus.

**Tabelle 3 Übersicht über die Effekte von FF1, FF2 und FF3 auf die Proliferation von 12Z-Zellen**

Konzentration	24 h			48 h		
	FF1	FF2	FF3	FF1	FF2	FF3
10 %	=	=	=	=	=	=
25 %	+	=	=	=	=	-
50 %	++	++	+	+	+	+
75 %	+	++	++	=	+	=

Die Veränderungen gegenüber den DPBS-Kontrollen sind semiquantitativ dargestellt (=, kein Unterschied; + oder -, 10 % Unterschied; ++ oder --, 20 % Unterschied und  $p < 0,05$ )

Basierend auf den Untersuchungen zur Zellviabilität und -proliferation wurden für die folgenden Versuche eine Konzentration von 50 % FF und ein Behandlungszeitraum von 24 h gewählt.

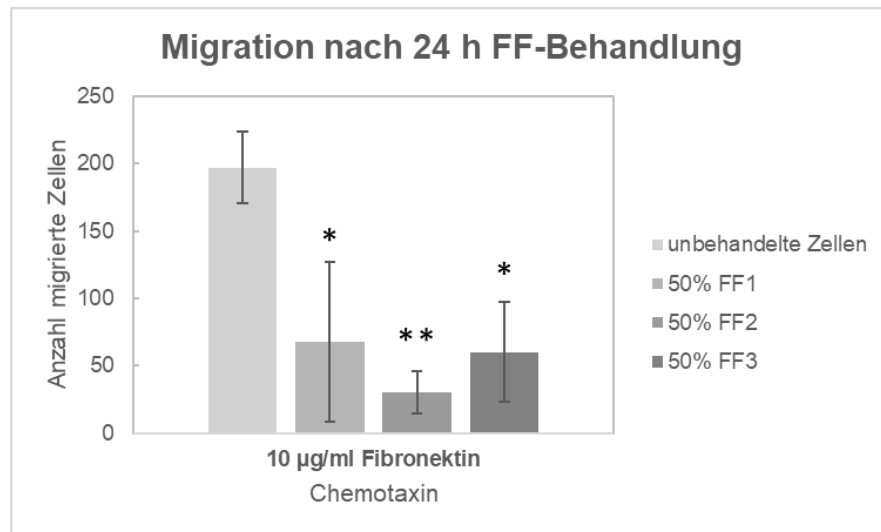
### 4.3.3 Einfluss von FF auf die chemotaktische Zellmigration

Migrationsprozesse können durch die Dissemination von Zellen mit der Entwicklung metastatischer Absiedlungen das Voranschreiten maligner Erkrankungen fördern. Für die epithelialähnliche endometriotische Zelllinie 12Z konnte ein *in vitro*-motiler und invasiver Phänotyp, ähnlich einem Karzinom, festgestellt werden (130). Um den Einfluss der FF auf das chemotaktische Migrationspotenzial der 12Z-Zellen zu untersuchen, wurden Analysen in der Boyden-Migrationskammer durchgeführt. Hierbei wurden die Motilitätsfähigkeit der Zellen nach FF-Behandlung sowie das chemotaktische Potenzial von FF als Lockstoff überprüft. Die in beiden Versuchsansätzen mitgeführte Negativkontrolle mit dem Einsatz von 50 % DPBS/SR-M als Lockstoff ergab durchschnittlich eine Zellwanderung von etwa 25 Zellen/mm<sup>2</sup>.

#### 4.3.3.1 Chemotaktische Zellmigration nach FF-Behandlung

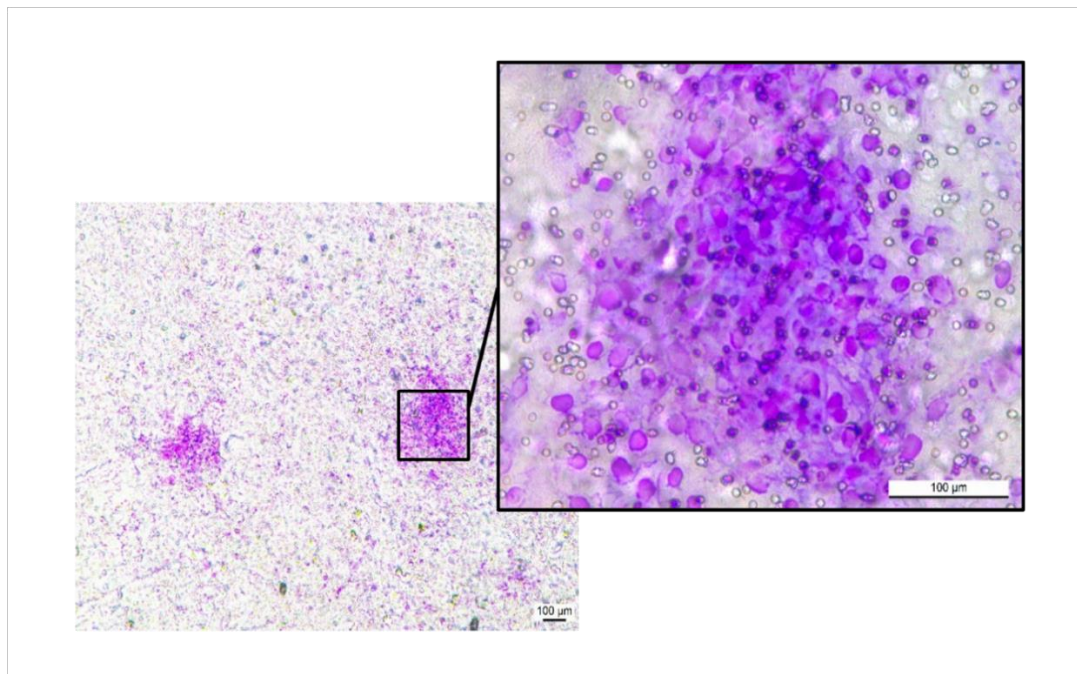
Die Motilität der 12Z-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 50 % FF/SR-M pro Pool (FF1, FF2, FF3) wurde unter Verwendung des Lockstoffs Fibronectin (10 µg/ml in 50 % DPBS/SR-M) durchgeführt und mit unbehandelten Zellen verglichen. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Migration der FF1-, FF2- und FF3-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,026$ ;  $p = 0,004$ ;  $p = 0,012$ ). Während die unbehandelten Zellen mit knapp 200 Zellen/mm<sup>2</sup> zu dem Lockstoff migrierten, konnten bei den FF1- und FF3-behandelten Zellen nur 67 bzw. 60 Zellen/mm<sup>2</sup> ausgezählt werden. Die FF2-behandelten Zellen wanderten sogar mit nur 30 Zellen/mm<sup>2</sup>, was sich dem durchschnittlichen Ergebnis der Negativkontrolle annäherte (*Abbildung 10*).

Die FF-behandelten Zellen entwickelten nach Durchwanderung der porösen Membran die Tendenz, sich in vereinzelt Zellverbänden zusammenzufinden (*Abbildung 11*). Dieses Phänomen wurde nach Behandlung mit FF1, FF2 und FF3 beobachtet, jedoch nicht bei unbehandelten Zellen. Die entstandenen Zellklumpen erschwerten das mikroskopische Auszählen der gewanderten Zellen und führten folglich zu höheren Standardabweichungen.



**Abbildung 10 Chemotaktische Zellmigration von 12Z-Zellen nach FF-Behandlung in Richtung Fibronectin**

Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Die Zellen wurden für 24 h mit 50 % FF/SR-M (FF1; FF2; FF3) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (in 50 % DPBS/SR-M) verglichen. Als Chemotaxin wurde 10 µg/ml Fibronectin in 50 % DPBS/SR-M verwendet. Dargestellt sind die gemittelten Werte (Anzahl an migrierten Zellen pro mm<sup>2</sup>) aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ).



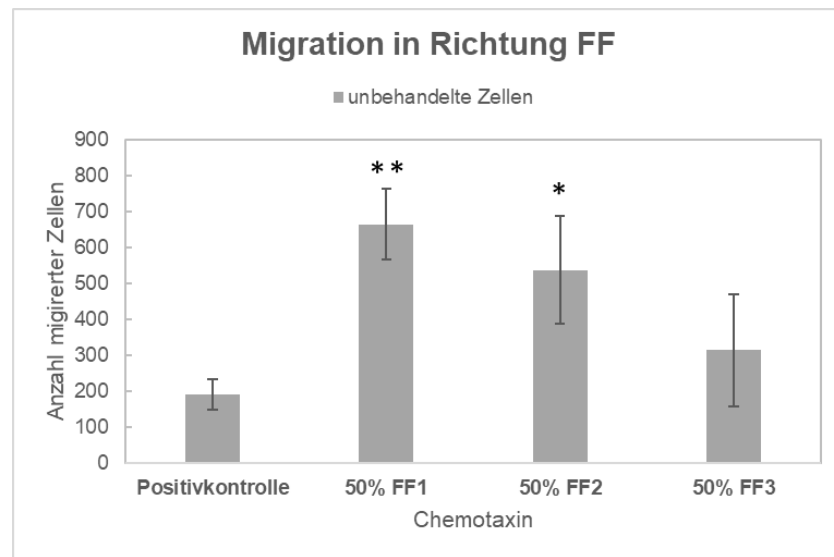
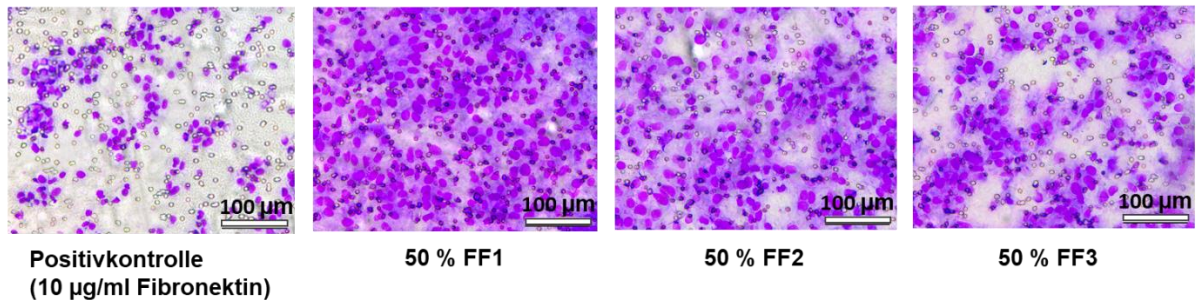
**Abbildung 11 Repräsentative Darstellung der geformten Zellklumpen nach chemotaktischer Migration von FF-behandelten 12Z-Zellen**

Die mikroskopischen Bilder wurden mit dem Mikroskop Leica DMIL LED in 10-facher (linkes Bild) bzw. 20-facher (rechtes Bild) Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt jeweils 100 µm. Das rechte Bild verdeutlicht (als vergrößerte Darstellung des markierten Membranabschnitts aus dem linken Bild) die Tendenz der Zellen, nach FF-Behandlung Zellzusammenlagerungen zu bilden.

#### 4.3.3.2 Chemotaktische Zellmigration in Richtung FF

Für die Analyse der chemotaktischen Wirkung von FF auf die 12Z-Zellen wurde die Migrationsfähigkeit unbehandelter, in 50 % DPBS/SR-M kultivierter Zellen in Richtung 50 % FF/SR-M (FF1, FF2, FF3) überprüft. Wie mit dem Migrationsversuch (Abschnitt 4.3.3.1) zuvor bestätigt wurde, eignet sich die Migration unbehandelter Zellen zu Fibronectin (10 µg/ml in 50 % DPBS/SR-M) als Positivkontrolle.

Die chemotaktische Migrationsfähigkeit von 12Z-Zellen zu FF überstieg deutlich die der Kontrollzellen (*Abbildung 12*). Am stärksten zeigte sich das chemotaktische Potenzial bei FF1. Im Vergleich zu der Fibronectin-Kontrolle mit durchschnittlich 192 Zellen/mm<sup>2</sup> wanderten zu FF1 mit 666 Zellen/mm<sup>2</sup> fast 3,5-mal so viele, was einen signifikanten Unterschied ausmachte ( $p = 0,009$ ). Auch FF2 erwies sich als ein starker Lockstoff: Mit 538 Zellen/mm<sup>2</sup> bewirkte FF2 eine 2,8-fache und damit signifikante Erhöhung der Chemotaxis gegenüber der Fibronectin-Kontrolle ( $p = 0,039$ ). In Richtung FF3 migrierten 315 Zellen/mm<sup>2</sup>, was zwar im Vergleich zur Fibronectin-Kontrolle mehr war, jedoch gegenüber den beiden anderen Pools ein deutlich geringeres chemotaktisches Potenzial aufzeigte.

**A****B**

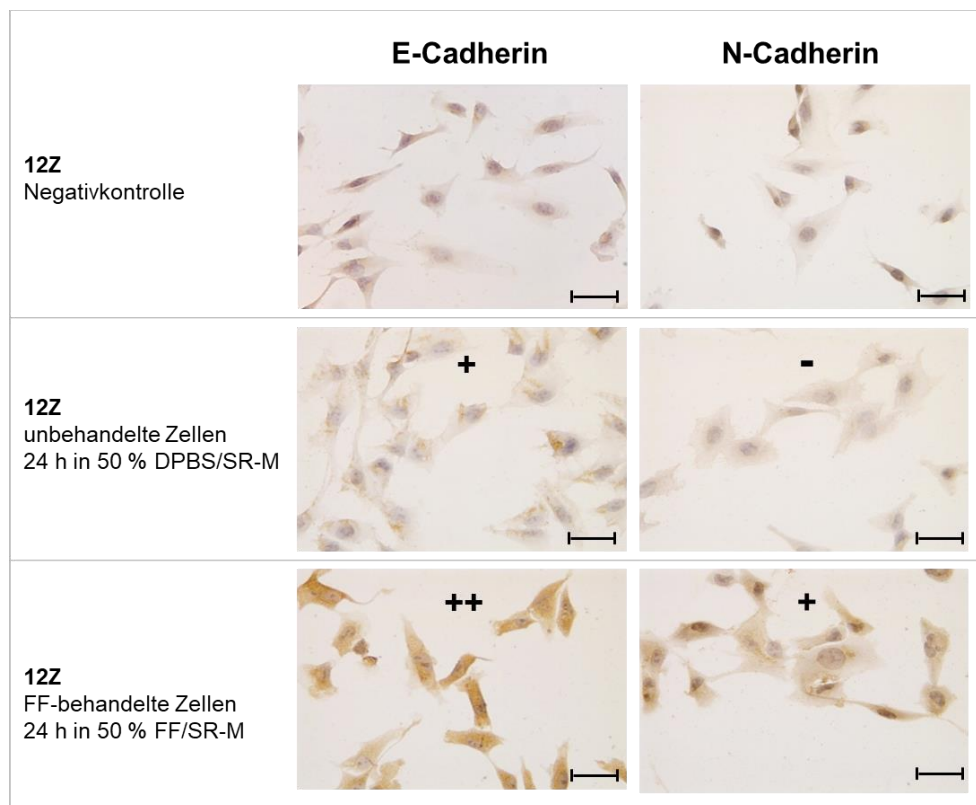
**Abbildung 12 Chemotaktische Zellmigration von 12Z-Zellen in Richtung FF**

Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Die Zellen wurden in 50 % DPBS/SR-M kultiviert. Als Chemotaxin wurde 50 % FF/SR-M (FF1; FF2; FF3) verwendet. Der Einsatz von 10 µg/ml Fibronectin in 50 % DPBS/SR-M diente als Positivkontrolle. In Abbildung (A) sind die gemittelten Werte (Anzahl an migrierten Zellen pro mm<sup>2</sup>) aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen dargestellt. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Positivkontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ). Abbildung (B) zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der migrierten Zellen zu den verschiedenen Lockstoffen (von links nach rechts): Positivkontrolle (10 µg/ml Fibronectin in 50 % DPBS/SR-M), 50 % FF1/SR-M, 50 % FF2/SR-M, 50 % FF3/SR-M. Die Bilder wurden mit dem Mikroskop Leica DMIL LED in 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Der Maßstab beträgt jeweils 100 µm.



#### 4.3.4 Einfluss von FF auf die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin

Eine Voraussetzung für die Migration epithelialer Zellen ist die Unterbrechung der Zell-Zell-Kontakte. Die EMT beschreibt einen zellulären Mechanismus, bei dem Epithelzellen ihre Zellpolarität sowie ihre Zellverbindungen verlieren und invasiv migratorische Eigenschaften von mesenchymalen Zellen annehmen. Dieser Prozess korreliert mit einer Herunterregulation des interzellulären Adhäsionsmoleküls E-Cadherin und einer vermehrten Expression des typisch mesenchymalen Adhäsionsmoleküls bzw. Markers N-Cadherin. Die Ergebnisse der chemotaktischen Migration von 12Z-Zellen zeigten einerseits nach FF-Behandlung eine verringerte Motilität mit einem morphologisch veränderten Erscheinungsbild in Form von Zellzusammenlagerungen. Zum anderen wurde jedoch deutlich, dass FF als Lockstoff eine starke chemotaktische Wirkung auf die 12Z-Zellen ausübte. Um Kenntnisse über die Reaktion der 12Z-Zellen durch den Einfluss von FF zu erlangen, wurde die phänotypische Ausprägung der Adhäsionsproteine E-Cadherin und N-Cadherin nach 24 h FF-Behandlung (50 % FF/SR-M) mittels immunzytochemischer Färbung analysiert.



**Abbildung 13 Repräsentative Darstellung der immunzytochemischen Färbung von E-Cadherin und N-Cadherin bei 12Z-Zellen vor und nach FF-Behandlung**

Die mikroskopischen Bilder wurden mit dem Mikroskop Leica DMIL LED in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt jeweils 100 µm. Die Bilder der obersten Reihe stellen die Negativkontrollen (Färbung ohne den primären Antikörper) dar. Die Aufnahmen der mittleren Reihe zeigen die immunzytochemischen Färbungen von E-Cadherin und N-Cadherin bei unbehandelten 12Z-Zellen, die Aufnahmen der untersten Reihe bei FF-behandelten 12Z-Zellen (50 % FF/ SR-M für 24 h).  
- = keine Expression, + = Expression vorhanden, ++ = Expression verstärkt.

Das Expressionsmuster der beiden Adhäsionsmoleküle E- und N-Cadherin variierte zwischen den unbehandelten und FF-behandelten 12Z-Zellen (*Abbildung 13*). Im Vergleich zur bläulich-grau erscheinenden Negativkontrolle wiesen vereinzelte Braunfärbungen entlang der Zellmembranen in der unbehandelten Zellprobe auf eine leichte Expression von E-Cadherin hin. Nach 24-stündiger FF-Behandlung zeigte sich eine deutlich stärkere Anfärbung, was auf eine Zunahme der E-Cadherin-Expression hindeutete. Bei der Färbung von N-Cadherin in der unbehandelten Zellprobe war im Vergleich zur Negativkontrolle kein Unterschied erkennbar - es lag keine Expression von N-Cadherin vor. Im Gegensatz dazu entwickelte sich nach der Behandlung mit FF eine moderate Braunfärbung, wodurch eine leichte Expression festgestellt werden konnte.

#### **4.4 Bedeutung der FF-Komponente IL-8 als Chemotaxin**

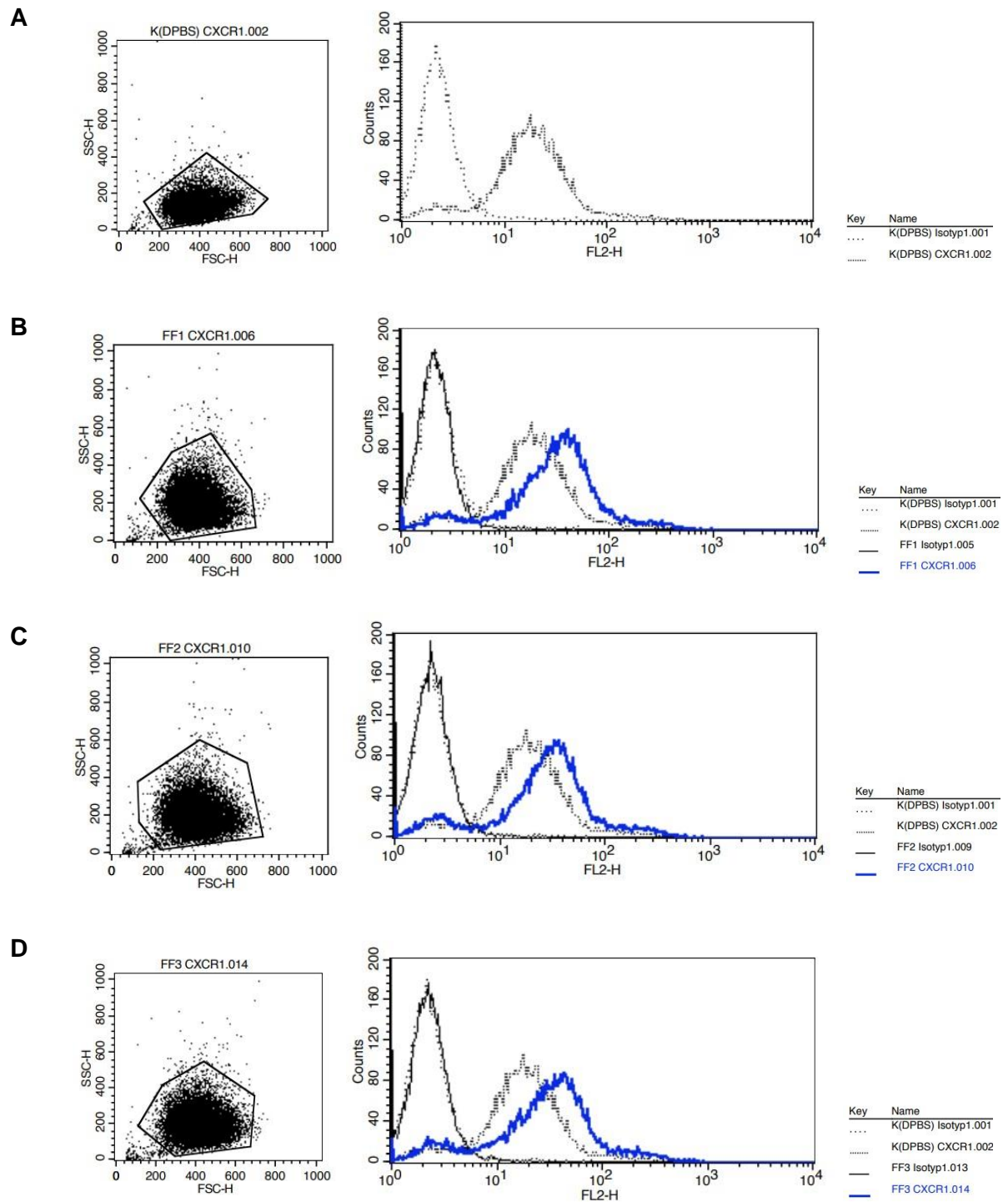
Das Ergebnis der Migrationsanalyse mit FF als Chemotaxin verdeutlichte ein unterschiedlich stark ausgeprägtes chemotaktisches Potenzial der drei Pools. Während der Einsatz von FF1 als Lockstoff die Migrationsfähigkeit der 12Z-Zellen am stärksten förderte, konnte bei FF3 eine im Vergleich dazu deutlich verminderte Migration beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass in den Pools enthaltene chemotaktisch wirkende Komponenten unterschiedlich stark konzentriert vorlagen. In Anbetracht der Ergebnisse aus der Quantifizierung von Komponenten aus FF1, FF2 und FF3 (Abschnitt 4.1) rückte IL-8 in den Fokus. Es konnten höhere Konzentrationen von IL-8 in FF1 und FF2 gegenüber FF3 nachgewiesen werden. Zudem wurde, wie einleitend beschrieben, in mehreren Studien belegt, dass Frauen mit Endometriose gegenüber gesunden Probandinnen eine erhöhte IL-8-Konzentration in der PF aufweisen.

IL-8 gehört zu der Gruppe der Chemokine und besitzt damit die Fähigkeit, Zellen anzulocken. Im Zusammenhang mit neutrophilen Granulozyten und Karzinomzellen sind bereits Migrations- und Invasionsvermittlung beschrieben worden (178, 179, 186). Für die Weiterleitung migratorischer IL-8-Stimuli wird die Bindung an zwei G-Protein-gekoppelte Zelloberflächenrezeptoren, CXCR1 und CXCR2, verantwortlich gemacht. Als Voraussetzung für Analysen des chemotaktischen Potenzials von IL-8 auf die 12Z-Zellen sollte daher zunächst eine quantitative Bestimmung der beiden Rezeptoren vor und nach Behandlung mit FF durchgeführt werden.

##### **4.4.1 Einfluss von FF auf die Expression von CXCR1 und CXCR2**

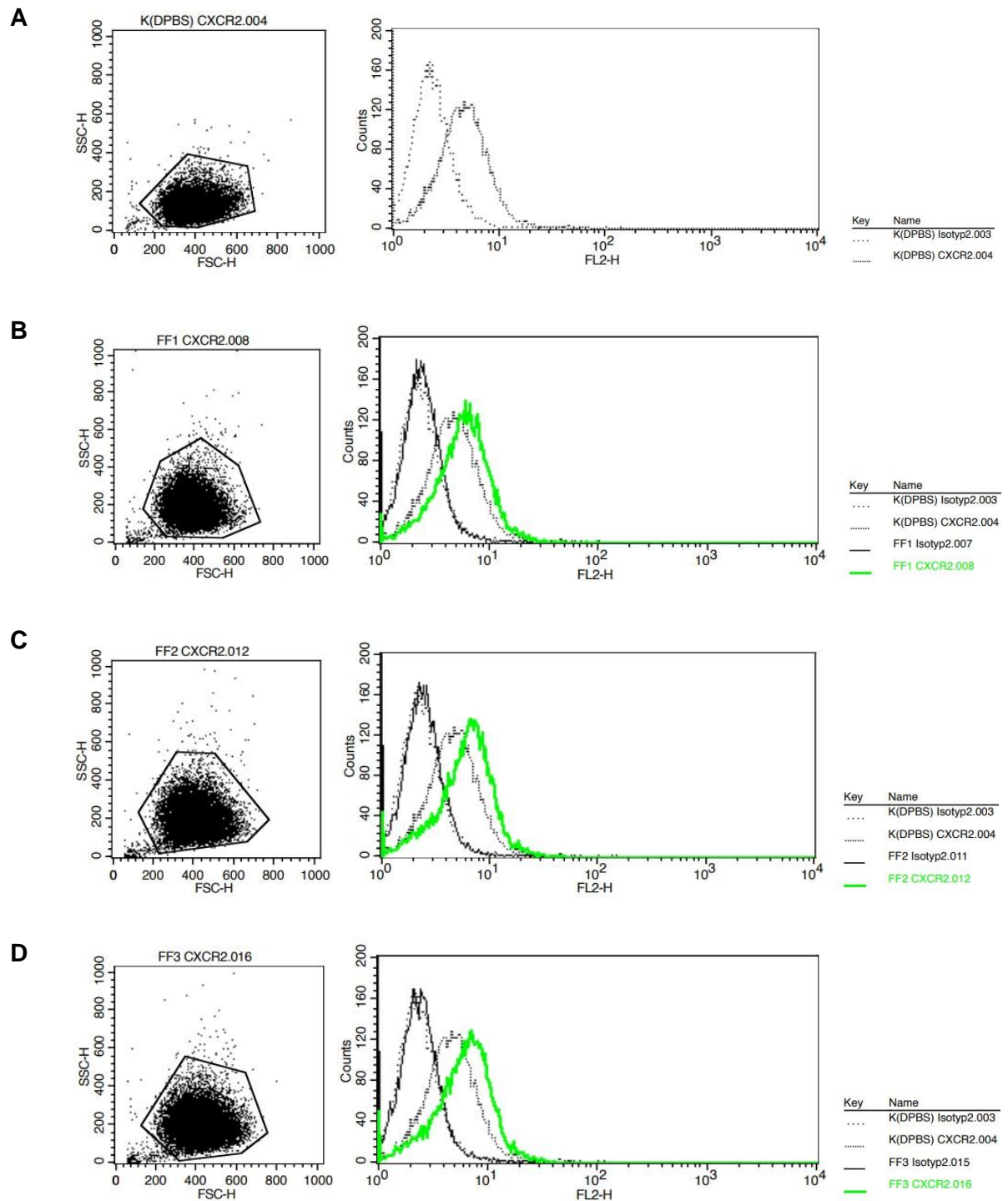
Um den Einfluss von FF und dem darin enthaltenen IL-8 auf die beiden IL-8-Rezeptoren zu untersuchen, wurde im Durchflusszytometer die Expression von CXCR1 und CXCR2 bei unbehandelten (50 % DPBS/SR-M) sowie mit 50 % FF/SR-M behandelten (FF1, FF2, FF3) 12Z-Zellen analysiert.

Die Expressionen wurden jeweils durch Verwendung eines PE-gekoppelten Antikörpers detektiert (*Abbildungen 14–16*). Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle isotypenspezifische Antikörper verwendet. Pro Messung wurden 15.000 Events analysiert. Zellen ohne FF-Behandlung dienten als Kontrolle und relativen Bezugspunkt für die anschließende Auswertung.



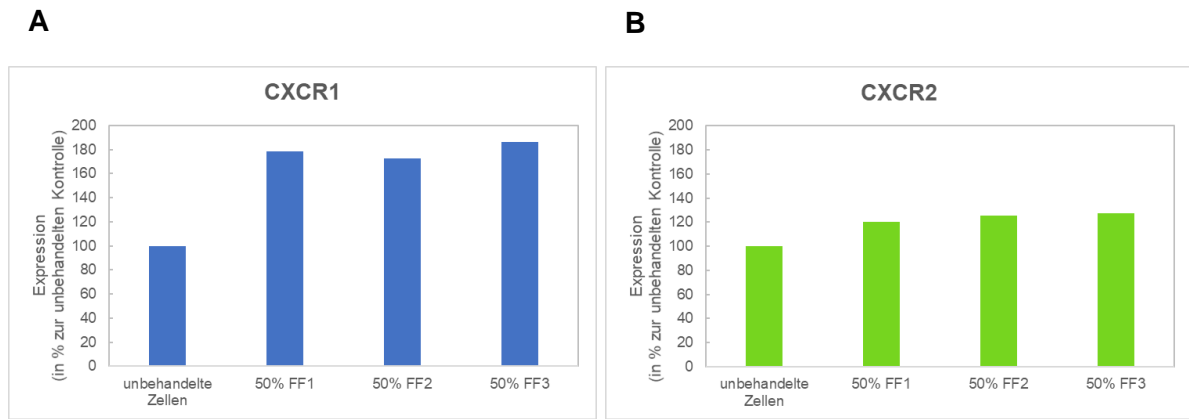
**Abbildung 14 Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von CXCR1 bei 12Z-Zellen nach FF-Behandlung**

Die Zellen wurden für 24 h mit 50 % FF/SR-M (FF1; FF2; FF3) vorbehandelt bzw. in 50 % DPBD/SR-M (unbehandelte Kontrolle) kultiviert. Als Antikörper dienen ein Phycoerythrin-konjugierter humaner CXCR1/IL-8-Antikörper sowie eine Phycoerythrin-konjugierte IgG2A-Isotypenkontrolle. Es wurden jeweils 15.000 Zellen detektiert. Die Abbildungen zeigen die Messungen für CXCR1 sowie die Isotypenkontrolle in der unbehandelten Zellkontrolle (A), der FF1 (B), der FF2 (C) und FF3-behandelten Zellprobe (D). Die Ergebnisse für CXCR1 sind in Form eines Dotplots dargestellt. In den Histogrammen sind die Isotypenkontrollen, CXCR1 der unbehandelten Zellkontrolle in schwarz und das CXCR1 nach FF-Behandlung in blau abgebildet.



**Abbildung 15 Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von CXCR2 bei 12Z-Zellen nach FF-Behandlung**

Die Zellen wurden für 24 h mit 50 % FF/SR-M (FF1; FF2; FF3) vorbehandelt bzw in 50 % DPBD/SR-M (unbehandelte Kontrolle) kultiviert. Als Antikörper dienten ein Phycoerythrin-konjugierter humane CXCR2/IL-8-Antikörper sowie eine Phycoerythrin-konjugierte IgG2A-Isotypenkontrolle. Es wurden jeweils 15.000 Zellen detektiert. Die Abbildungen zeigen die Messungen für CXCR2 sowie die Isotypenkontrolle in der unbehandelten Zellkontrolle (**A**), der FF1 (**B**), der FF2 (**C**) und FF3-behandelten Zellprobe (**D**). Die Ergebnisse für CXCR2 sind in Form eines Dotplots dargestellt. In den Histogrammen sind die Isotypenkontrollen, CXCR2 der unbehandelten Zellkontrolle in schwarz und das CXCR2 nach FF-Behandlung in grün abgebildet.



**Abbildung 16 Expression von CXCR1 und CXCR2 bei 12Z-Zellen nach FF-Behandlung**

Die Expression der beiden IL-8-Rezeptoren wurde mithilfe durchflusszytometrischer Analysen ermittelt. Die Zellen wurden für 24 h mit 50 % FF/SR-M (FF1; FF2; FF3) vorbehandelt bzw. in 50 % DPBD/SR-M (unbehandelte Kontrolle) kultiviert. Die Abbildung zeigt die Veränderungen der Expression von CXCR1 und CXCR2 nach 24 h Behandlung mit 50 % FF/SR-M (FF1; FF2; FF3) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind für beide Rezeptoren die prozentualen Mittelwerte der FF1, FF2 und FF3-behandelten Zellen bezogen auf die unbehandelten Zellen.

Für die konjugierten Antikörper CXCR1 sowie CXCR2 zeigte sich im Vergleich zu den jeweiligen isotypenspezifischen Antikörpern ein Shift nach rechts, wobei dieser bei CXCR1 deutlicher ausgeprägt war. Somit exprimierten die 12Z-Zellen sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in den FF-behandelten Proben die IL-8-Rezeptoren in ihrer Zellmembran.

Unter dem Einfluss von 50 % FF pro Pool ließ sich für beide Rezeptoren eine Erhöhung der Expression beobachten. Für CXCR1 zeigten sich deutlichere Unterschiede im Ausmaß der Expression nach FF-Behandlung, was mit einem stärkeren Shift nach rechts veranschaulicht wird (Abbildung 14). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen induzierte FF eine Erhöhung der Expression von CXCR1 auf 179 % bei FF1, auf 173 % bei FF2 und auf 186 % nach Behandlung mit FF3 (Abbildung 16, A). Dagegen waren geringere Expressionsunterschiede für CXCR2 nach Behandlung mit FF der drei Pools zu beobachten (Abbildung 15). Während FF1 die Expression des Rezeptors um 20 % erhöhte, konnte für FF2 und FF3 eine Steigerung um 26 % bzw. 27 % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 16, B).

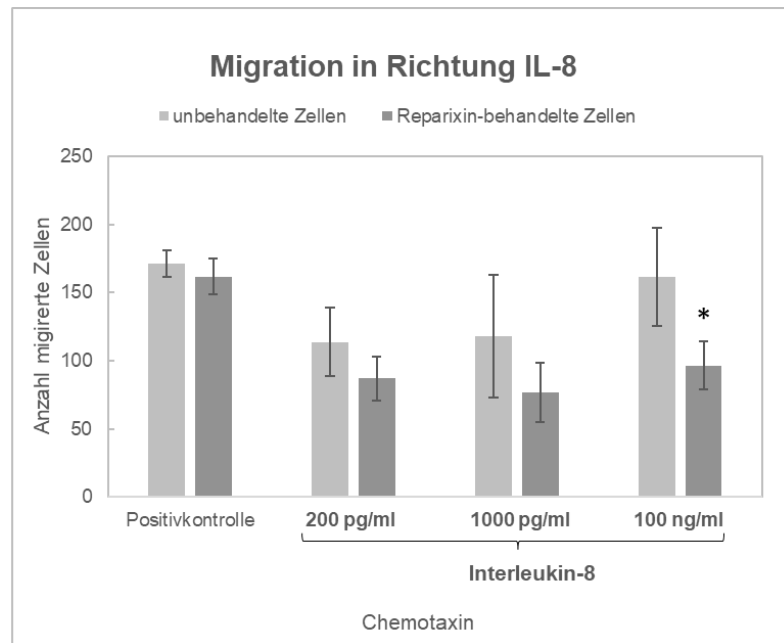
#### 4.4.2 Chemotaktische Zellmigration unter CXCR1- und CXCR2-Inhibition

Zelluläre Migrationsprozesse werden vor allem über Transmembranrezeptoren vermittelt. Durch die Bindung von extrazellulären Liganden an deren Rezeptoren können intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden, welche die Expression von beteiligten Genen modulieren und somit Einfluss auf den zellulären Prozess nehmen. Um herauszufinden, ob IL-8 auf die 12Z-Zellen eine chemotaktische Wirkung über die IL-8-Rezeptoren ausübt, wurden nach Inhibition von CXCR1 und CXCR2 Migrationsanalysen in Richtung IL-8 sowie in Richtung FF der drei Pools durchgeführt. Die in beiden Versuchsansätzen mitgeführte Negativkontrolle mit dem Einsatz von 50 % DPBS/SR-M als Lockstoff ergab durchschnittlich eine Zellwanderung von etwa 20 Zellen/mm<sup>2</sup>.

##### 4.4.2.1 Migration mit IL-8 als Chemotaxin

Für die Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von IL-8 auf die 12Z-Zellen wurde das Migrationsverhalten unbehandelter Zellen mit dem von 48 h mit Reparixin behandelten Zellen in Richtung IL-8 verglichen. Als Chemotaxin wurde IL-8 mit steigenden Konzentrationen von 200 pg/ml, 100 pg/ml und 100 ng/ml in 50 % DPBS/SR-M eingesetzt. Die Migration zu der EZM-Komponente Fibronectin (10 µg/ml in 50 % DPBS/SR-M) diente als Positivkontrolle.

Das Ergebnis zeigte ein chemotaktisches Potenzial von IL-8 auf die 12Z-Zellen (*Abbildung 17*). Im Allgemeinen erhöhte sich die Migration der unbehandelten Zellen durchgehend mit zunehmender Konzentration von IL-8. In Relation zu dem stark potenten Lockstoff Fibronectin zeigte sich jedoch eine geringere chemotaktische Wirkung, welche sich erst mit der hohen, unphysiologischen Konzentration von 100 ng/ml IL-8 (162 Zellen/mm<sup>2</sup>) dem Wert der Positivkontrolle mit 172 Zellen/mm<sup>2</sup> annäherte. Die Migrationsfähigkeit der Reparixin-behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen war durchgehend reduziert. Während die Positivkontrolle mit Fibronectin als Lockstoff eine minimale Reduktion von etwa 6 % zeigte, nahmen die Unterschiede mit steigender Konzentration des Chemotaxins IL-8 gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu. So sank die Zahl der migrierten Zellen bei 200 pg/ml IL-8 auf 87 Zellen/mm<sup>2</sup>, was im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion von etwa 24 % bedeutete. Unter der Konzentration von 1000 pg/ml IL-8 ergab sich eine Minderung der Migration nach Inhibition der beiden Rezeptoren um etwa 35 % gegenüber der Kontrolle, was einem Wert von 77 Zellen/mm<sup>2</sup> entsprach. Im Vergleich dazu konnte bei 100 ng/ml IL-8 die stärkste Reduktion mit etwa 40 % gegenüber der Kontrolle auf einen Wert von 96 Zellen/mm<sup>2</sup> beobachtet werden. Dies ergab im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,046$ ) (*Abbildung 17*).



**Abbildung 17 Chemotaktische Zellmigration nach Reparixin-Behandlung von 12Z-Zellen mit IL-8 als Chemotaxin**

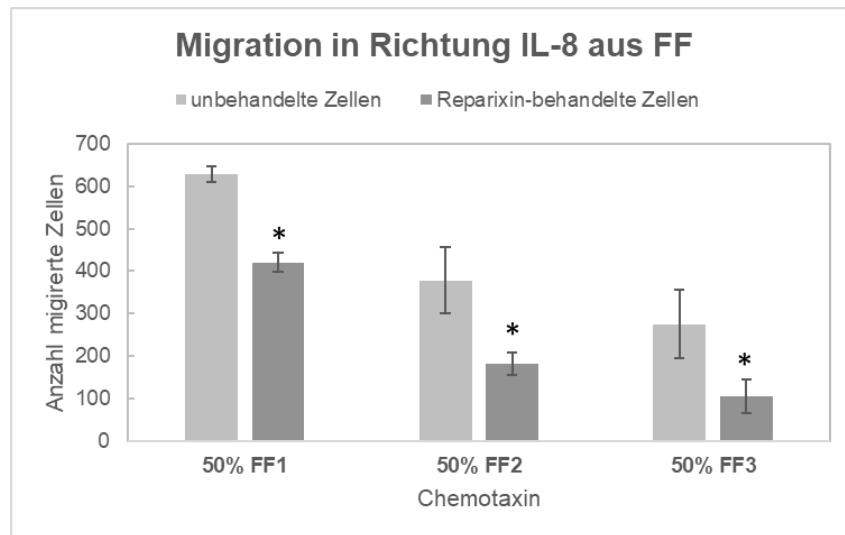
Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Die Zellen wurden für 48 h in 50 % DPBS/SR-M (unbehandelte Zellen) kultiviert bzw. mit Reparixin (CXCR1/-2 Inhibitor,  $IC_{50}$ -Wert = 0,1  $\mu$ mol/l in 50 % DPBS/SR-M) vorbehandelt. Als Chemotaxin wurde rekombinant humanes IL-8 in drei verschiedenen Konzentrationen (200 pg/ml, 1000 pg/ml, 100 ng/ml in 50 % DPBS/SR-M) verwendet. Der Einsatz von 10  $\mu$ g/ml Fibronektin in 50 % DPBS/SR-M diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind die gemittelten Werte (Anzahl an migrierten Zellen pro  $mm^2$ ) aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem T-Test ermittelt und bei einem  $p$ -Wert  $<0,05$  angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die unbehandelte Zellkontrolle wurden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

#### 4.4.2.2 Migration mit FF als Chemotaxin

Um die Rolle von IL-8 bei der gezielten zellulären Migration von 12Z-Zellen in Richtung FF zu charakterisieren, wurden analog zur Versuchsdurchführung in Abschnitt 4.4.2.1 unbehandelte Zellen als Kontrolle und Reparixin-behandelte Zellen verwendet. FF als Chemotaxin wurde in der Konzentration von 50 % FF/SR-M pro Pool (FF1, FF2, FF3) eingesetzt.

Das Migrationsverhalten der unbehandelten Zellen zu den drei FF-Pools zeigte einen ähnlichen Trend wie bei der in Abschnitt 4.3.3.2 beschriebenen Migration (Abbildung 18). Die Zellen wanderten am stärksten in Richtung FF1 und am geringsten in Richtung FF3. In Relation zu der entsprechenden unbehandelten Kontrolle bewirkte die Inhibition von CXCR1 und CXCR2 eine signifikante Minderung der Migration in Richtung aller drei FF-Pools. So wurde für FF1 eine Reduktion der migrierten Zellen um 33 % ( $p = 0,012$ ) und für FF2 um 52 % ( $p = 0,040$ ) im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die stärkste Abnahme nach Reparixin-Behandlung ergab sich in Richtung des Pools FF3. Es erfolgte eine Verringerung der Migration um etwa 62 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,023$ ).





**Abbildung 18 Chemotaktische Zellmigration nach Reparixin-Behandlung von 12Z-Zellen mit FF als Chemotaxin**

Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Die Zellen wurden für 48 h in 50 % DPBS/SR-M (unbehandelte Zellen) kultiviert bzw. mit Reparixin (CXCR1/-2 Inhibitor,  $IC_{50}$ -Wert =  $0,1 \mu\text{mol/l}$  in 50 % DPBS/SR-M) vorbehandelt. Als Chemotaxin wurde 50 % FF/SR-M (FF1, FF2, FF3) verwendet. Dargestellt sind die gemittelten Werte (Anzahl an migrierten Zellen pro  $\text{mm}^2$ ) aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem T-Test ermittelt und bei einem  $p$ -Wert  $<0,05$  angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die unbehandelte Zellkontrolle wurde mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

## 5 Diskussion

Nach dem aktuellen Stand der Forschung zur Pathogenese der Endometriose spielt die Mikroumgebung von peritonealen Endometrioseläsionen eine bedeutende Rolle. Entsprechende genetische und epigenetische Faktoren begünstigen das Wachstum von ektopen Zellherden. Hierbei gibt es Hinweise auf die Beteiligung immunologischer Faktoren; die Entwicklung der Endometriose wird zudem mit einer entzündlich veränderten Mikroumgebung in Verbindung gebracht (187). Es konnten zahlreiche immunologische Anomalien detektiert werden, wobei jedoch nicht geklärt ist, ob diese als Ursache oder Folge der Endometriose angesehen werden können.

Als wichtiger Bestandteil der Mikroumgebung in der Peritonealhöhle gilt die FF. Mit einer Zusammensetzung aus über 200 biochemischen Proteinen - darunter Zytokine, Wachstumsfaktoren und Steroidhormone - beeinflusst diese als Mikroumgebung der heranreifenden Eizelle zunächst die Follikulogenese (9, 188). Zum Zeitpunkt der Ovulation wird die FF in die Bauchhöhle freigesetzt und vermischt sich mit der PF. Prins et al. postulierten in ihrem Review aus dem Jahr 2020 die Rolle der FF als Bestandteil eines „Teufelskreises“ bei der Entstehung der Endometriose. Studien konnten belegen, dass das Vorhandensein von Endometriose die Zusammensetzung der FF verändern kann und zu Ovulationsstörungen, schlechter Eizellenqualität, geringerer Befruchtungsrate, minderwertigen Embryonen und geringeren Implantationsraten führen kann (189, 190). Zudem könnten nach wiederholter Freisetzung der veränderten FF in die Bauchhöhle bestehende Endometrioseherde zum weiteren Wachstum angeregt werden. Der funktionelle Mechanismus der FF sowie einzelner Immunkomponenten mit Wirkung auf die Zellen des Endometriums ist jedoch unzureichend erforscht (8). Bisherige Studien, welche auf die Fragestellung des Einflusses von FF auf Endometriose abzielen, haben vielfach stromale Endometriosezellen für *in vitro*-Versuche verwendet. Daraus resultiert jedoch eine eingeschränkte Aussagekraft der Ergebnisse, denn die ektopen Zellverbände bestehen, wie einleitend beschrieben, nicht nur aus stromalen, sondern auch aus epithelialen Zellen. Letztere sind hormonabhängig und könnten daher die Endometriose-bedingten Beschwerden verursachen (10, 130). Um genauere Rückschlüsse auf die Funktion von FF bei der Krankheitsentstehung von Endometriose ziehen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit funktionelle Zellanalysen mit der epithelialen Zelllinie 12Z nach Behandlung mit FF durchgeführt.

Hierfür wurde FF von Frauen gesammelt, welche aufgrund einer männlichen Sterilität am IVF-Programm des Fertilitätszentrums der Universitätsmedizin Mainz teilnahmen. Für die Studie wurden drei Pools mit einer zufälligen Verteilung von sechs FF-Proben gebildet und anschließend quantitativ durch den laborchemischen Nachweis ausgewählter Komponenten

miteinander verglichen (*Tabelle 1*). Zur genaueren Charakterisierung wurden neben Hormonen die Elektrolytkonzentrationen von Calcium und Magnesium sowie die Konzentration von IL-6 und IL-8 detektiert. Während die Hormone LH, FSH und IGF-1 sowie die Elektrolytkonzentrationen in allen drei Pools kaum Unterschiede aufzeigten, wurden bei Estradiol, Progesteron und hCG Differenzen verzeichnet. Endometriose wächst nachweislich östrogenabhängig: Die Progesteron- und Östrogensignalübertragung ist gestört, was zu einer Progesteronresistenz und Östrogendominanz führt (191). Unter der Voraussetzung, dass in 11 % der Fälle Endometriose nicht erkannt wird, und sie gleichzeitig bei bis zu 50 % von infertilen Patientinnen als Ursache gilt, ist davon auszugehen, dass in der vorliegenden untersuchten Stichprobe zu einem gewissen Anteil auch Proben von unerkannten Endometriose-Erkrankten enthalten waren (192). Dies könnte unter anderem ein Grund für Konzentrationsunterschiede in den drei FF-Pools darstellen. Die Konzentrationsbestimmung der Interleukine zeigte ebenfalls Differenzen zwischen den Pools (*Tabelle 1*). So konnte für IL-8 in FF1 und FF2 jeweils ein höherer Wert als in FF3 festgestellt werden, wobei FF1 die höchste Konzentration aufwies. Sehr starke Schwankungen waren in Bezug auf IL-6 erkennbar. Hier wurde für FF2 eine deutlich höhere Konzentration in Relation zu FF1 und FF3 nachgewiesen. Die in der FF enthaltenen Zytokine werden durch lokale Synthese im Ovar gebildet oder stammen aus dem Blutplasma. Sie können Prozesse des Follikelwachstums, der Eizellreifung, des Eisprungs, der Embryonalentwicklung und der Schwangerschaft modulieren (193-195). Prins et al. zählten IL-6 und IL-8 zusammen mit IL-1B und IL-12 zu den „Schlüsselzytokinen“ innerhalb der FF (8, 196, 197). Mehrere Studien konnten bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesunden Frauen eine erhöhte Konzentration von Interleukinen, darunter auch IL-6 und IL-8, feststellen (9, 62). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die FF mit ihren veränderten Bestandteilen an der Entstehung von ektopischem Endometriumgewebe beteiligt ist. So existieren bereits Studien, welche eine Korrelation zwischen der Konzentration von Zytokinen und des Wachstums von Endometrioseherden darstellen (187, 198). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob zwischen dem genannten Unterschied der Interleukin-Konzentrationen der drei FF-Pools und deren Ergebnisse in funktionellen Zellanalysen ein Zusammenhang besteht.

### **5.1 Auswirkungen von FF auf die Zellviabilität**

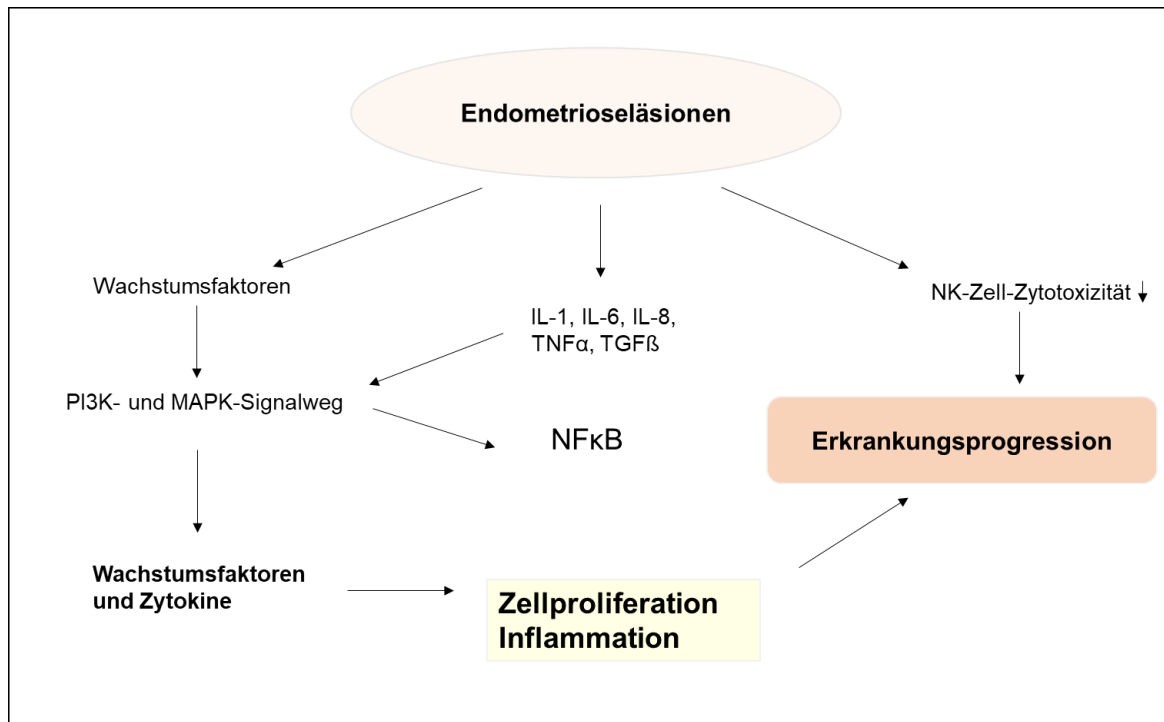
Auf Grundlage der Beschreibung einer Volumenzunahme der PF von durchschnittlich ~5 ml auf ~20 ml nach dem Eisprung wurde die Behandlung mit FF pro Pool in vier Konzentrationen (10, 25, 50 und 75 %) vorgenommen (141). Um die Auswirkung der einzelnen FF-Konzentrationen korrekt bewerten zu können, mussten entsprechende Kontrollen zu den jeweiligen Konzentrationen mit DPBS verdünnt werden. So konnte ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Effekte nicht auf das dem Medium zugesetzte FCS zurückzuführen sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach 24 h in der FF eine Steigerung der Zellviabilität bei 50 und 75 % FF im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Die Messung nach 48 h zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen der 24 h-Messung einen insgesamt geringeren Effekt der FF auf die Zellviabilität. Bahtiyer et al. konnten in einer *in vitro*-Studie mit stromalen endometriotischen Zellen nachweisen, dass die Fähigkeit von FF, die metabolische Aktivität zu erhöhen, am stärksten nach einer Inkubationszeit von 48 h ist (165). Aufgrund unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten von epithelialen und stromalen Zellen könnte die FF demzufolge zeitlich versetzte metabolische Auswirkungen auf die genannten Zelltypen haben. So zeigten die epithelialen 12Z-Zellen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der genannten Studie von Bahtiyer et al. zwar den stärksten Effekt bei einer 50 %igen Konzentration von FF, allerdings bereits nach einem Tag der Behandlung. Die vorliegenden Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die FF in verdünnter Form ein günstiges Umfeld für endometriotische Zellen bietet. Da die Messungen absolut gesehen mit steigender Konzentration auf 75 % FF eine Abnahme der Lebensfähigkeit ergaben, lässt sich vermuten, dass die FF neben den stimulierenden Wachstumsfaktoren auch inhibitorische Komponenten enthält, beispielsweise Stoffwechselprodukte. In der genannten Studie von Bahtiyer et al. wurde auch der Effekt von 50 % FF von gesunden Probandinnen mit der Wirkung der FF an Endometriose erkrankter Patientinnen verglichen. Das Ergebnis zeigt eine deutliche Steigerung der stromalen Zellvitalität bei der FF von Endometriosepatientinnen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Die FF der vorliegenden Studie stammt jedoch nicht von Endometriosepatientinnen, weshalb der Vergleich an dieser Stelle nicht für die Epithelzellen aufgestellt werden kann. Allerdings ist es denkbar, dass sich unter den FF-Spenderinnen Frauen mit einer noch nicht diagnostizierten Endometriose befanden, so dass pro Pool möglicherweise FF von Endometriose-Erkrankten enthalten sind. Dies kann eine Erklärung für die beschriebenen Konzentrationsunterschiede von IL-6 und IL-8 zwischen den drei FF-Pools sein. Die Ergebnisse der Zellviabilität lieferten verschieden starke Effekte der drei FF-Pools. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Es wäre jedoch möglich, dass vermehrt vorhandene Interleukine die Stoffwechselaktivität der 12Z-Zellen positiv beeinflussen. Für FF1 konnte bei einer Konzentration von 50 % sowohl nach 24 h als auch nach 48 h der größte Unterschied zur Kontrolle beobachtet werden. Die Tatsache, dass FF1 die höchste IL-8-Konzentration unter den drei Pools aufweist, stützt die Annahme einer positiven Wirkung von IL-8 auf die Stoffwechselaktivität. Der Konzentrationsnachweis von IL-6 innerhalb der drei Pools passt dagegen weniger zu den jeweils beobachteten Ergebnissen der Zellviabilität. Hier hebt sich FF2 mit einer deutlich stärkeren Konzentration von den anderen beiden FF-Pools ab.

## 5.2 Auswirkungen von FF auf die Zellproliferation

Koutsilieris et al. fanden heraus, dass die PF mitogene Proteine enthält, welche das Wachstum von endometrialen Zellen und Fibroblasten fördern (199). Es konnte nachgewiesen werden, dass die PF von Frauen mit Endometriose die Proliferation endometrialer Zellen stimuliert (142). Die Wirkung der PF auf die Proliferation von Stromazellen unterscheidet sich jedoch zwischen den Endometriosestadien mit einer induzierenden Wirkung im niedrigen und einer inhibitorischen Wirkung im fortgeschrittenen Stadium (200). Es bleibt dabei unklar, welche Rolle die FF hierbei übernimmt. In der vorliegenden Studie wiesen die Ergebnisse der Zellproliferations- und Viabilitätsanalyse nach FF-Behandlung Ähnlichkeiten auf. Nach einer Behandlung mit 50 % FF für 24 h war eine deutliche Steigerung der Proliferation zu erkennen. Auch die Konzentration von 75 % FF ergab eine erhöhte Proliferationsrate. Die längere Inkubationszeit von 48 h zeigte zwar eine verstärkte Wachstumsrate bei 50 %iger FF, allerdings mit einem insgesamt geringeren Effekt im Vergleich zu der Behandlungszeit von 24 h. Dies könnte bedeuten, dass die Wirkung der FF auf die Zellproliferation vorübergehend ist. Möglicherweise werden relevante Komponenten der FF, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Interleukine, über die Zeit verstoffwechselt und verlieren ihre Wirksamkeit.

Ähnliche proliferationssteigernde Effekte der FF bei Endometriosezellen sind durch Somigliana et al. beschrieben worden (166). Interessant ist hierbei, dass die durch die FF vermittelte Proliferationssteigerung nicht auf die Steroidkonzentration zurückzuführen ist. Die in der genannten Studie verwendeten Kontrollmedien enthielten die gleichen Konzentrationen an Estradiol und Progesteron wie die FF-Proben. Dies ist ein Hinweis darauf, dass neben den hormonellen Faktoren auch andere proliferationsstimulierende Faktoren in der FF enthalten sind. Che et al. fassten in ihrem Review die Rolle von Wachstumsfaktoren und Interleukinen bei der Pathogenese der Endometriose zusammen (4). Diese können über die Aktivierung nichthormoneller Signalkaskaden wie NFκB, PI3K und MAPK die Progression der Erkrankung vorantreiben (*Abbildung 19*). Für IL-8 konnte ein Einfluss bei der Entwicklung von Endometriose mithilfe der Studie von Arici et al. bestätigt werden (174). Die Ergebnisse des *in vitro*-Experiments mit stromalen Endometriosezellen deuten auf eine direkte Wirkung von IL-8 auf die Proliferation der Zellen hin. Übereinstimmend dazu, lassen die unterschiedlich stark ausfallenden Ergebnisse zwischen den drei FF-Pools in der vorliegenden Arbeit vermuten, dass der größte proliferationsfördernde Effekt bei FF1 mit dem Einfluss von IL-8 zusammenhängen könnte.



**Abbildung 19 Schematische Darstellung der Rolle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen bei der Pathogenese von Endometriose nach Che et al., 2015 (modifiziert)**

Über die Aktivierung nichthormoneller Signalkaskaden kommt es zur Rekrutierung weiterer Wachstumsfaktoren sowie Zytokine, welche einen direkten Einfluss auf die Progression der Erkrankung haben (4). IL = Interleukin; TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor alpha; TGF- $\beta$  = transformierender Wachstumsfaktor beta, NK-Zellen = natürliche Killerzellen, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, MAPK = 'mitogen activated protein'-Kinase, NF $\kappa$ B = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

### 5.3 Auswirkungen von FF auf die chemotaktische Zellmigration

Mithilfe der beiden Markerproteine Cytokeratin (epitheliales Intermediärfilament) und E-Cadherin (Zell-Zell-Adhäsionsprotein) konnte eine Mischung von Zellen in mehreren Entwicklungsstadien innerhalb einer peritonealen endometriotischen Läsion nachgewiesen werden (92). Neben differenzierten stromalen (Cytokeratin(-), E-Cadherin(-)) und epithelialen Zellen (Cytokeratin(+), E-Cadherin(+)) fanden sich auch unvollständig differenzierte Zellen (Cytokeratin(+), E-Cadherin(-)). Daraus entstand die Annahme einer Stammzellerkrankung, wobei die Differenzierungsrichtung der unvollständig differenzierten Zellen maßgeblich von den Faktoren der Umgebung beeinflusst wird (92). Ein bekanntes Merkmal von Cytokeratin(+), E-Cadherin(-) und endometriotischen Zellen ist das motile und invasive Wachstumsverhalten, das mit klinischen Beobachtungen übereinstimmt. Starzinski-Powitz et al. zeigten in einem *in vitro*-Kollageninvasionstest, dass endometriotische Zellen einen invasiven Phänotyp - ähnlich wie metastatische Karzinomzellen - aufweisen (13). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Invasivität durch ein hitzestabiles Protein der PF stimuliert werden kann (13, 128, 201). Für die Zelllinie 12Z konnte ein Phänotyp mit Cytokeratin(+) und E-Cadherin(-) festgestellt werden, weshalb diese auch als „epithelialähnlicher“ Zelltyp

beschrieben wird (130). 12Z könnte sich in einer Art Übergangsstadium zwischen einer undifferenzierten Vorläuferzelle und einer endständig differenzierten Zelle befinden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Faktoren aus der Mikroumgebung die weitere Differenzierung von Zellen mit Plastizität prägen könnten. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welchen Einfluss die FF auf das invasive Migrationsverhalten der 12Z-Zellen ausübt.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zu der Auswirkung von FF-Behandlung auf 12Z-Zellen zeigten eine deutliche Reduktion der Migrationsfähigkeit. Als Erklärung für dieses Ergebnis könnte folgende Beobachtung herangezogen werden: Durch die Behandlung der Zellen mit FF war eine verstärkte Zell-Zell-Interaktion erkennbar. Für das Experiment der chemotaktischen Zellmigration müssen die Zellen - anders als bei der Viabilität und Proliferation - nach der FF-Behandlung separiert und gezählt werden. Diesbezüglich zeigte sich eine deutlich erschwerte Zelltrennung. Mithilfe einer verlängerten Inkubationszeit des Trypsin- EDTA's und einer stärkeren mechanischen Resuspension der Zellen konnten diese dennoch separiert und eingesetzt werden.

Bei den wenigen migrierten Zellen wurde nach der Versuchsdurchführung eine Auffälligkeit beobachtet: Diese entwickelten die starke Tendenz, sich zu Zellhaufen zu formieren. Es waren kaum einzelne, freiliegende Zellen zu sehen, wodurch das mikroskopische Auszählen beeinträchtigt war. Mittels der immunzytochemischen Färbung des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin vor und nach der FF-Behandlung konnten in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf den Grund des makroskopisch erscheinenden Bildes der Zellklumpen gesammelt werden. Der Kontakt mit FF führte zu einer erhöhten Expression von E-Cadherin. Somit scheint die FF bei undifferenzierten Zellen eher einen mesenchymal-epithelialen Übergang (MET) mit der Entstehung von terminal ausdifferenzierten Epithelzellen zu fördern. Durch die erhöhte Bindungsaffinität zeigten sich die Zellen damit zwar weniger invasiv, allerdings konnten dadurch Anzeichen anderer erworbener Charakteristika beobachtet werden. Die Ansiedlung und Erhaltung von Endometriosezellen an ektopischen Stellen setzen voraus, dass diese der Erkennung durch das Immunsystem entgehen. Es ist bereits bekannt, dass Frauen mit Endometriose eine veränderte (zelluläre) Immunreaktion auf endometriale Ablagerungen in der Peritonealhöhle zeigen. Eine gestörte Funktion der NK-Zellen, eine verminderte Phagozytose durch Makrophagen und die Induktion regulatorischer T-Zellen führen zu einer verminderten Clearance von Zelltrümmern (6, 202-204). Die nach der FF-Behandlung kaum trennbaren Zellcluster könnten einen zusätzlichen morphologischen Schutz gegen die Immunüberwachung darstellen. Die Hypothese wäre also, dass die Zellen innerhalb der Zellcluster nicht erkannt werden und bei intakter interzellulärer Kommunikation unkontrolliert wachsen können.

Neben dem typisch epithelialen Markerprotein E-Cadherin wurde zusätzlich die Veränderung der Expression von N-Cadherin nach FF-Behandlung untersucht. Das Oberflächenmolekül N-

Cadherin wird normalerweise von Mesenchymzellen exprimiert. Die Kombination aus einer verringerten Expression von E-Cadherin mit einer gleichzeitig verstärkten Expression von N-Cadherin gilt als Kennzeichen einer EMT (124). Diese ist ein entscheidender Mechanismus für die Invasion bei malignen Erkrankungen, bei der die Epithelzellen ihre Zell-Zell-Kontakte verlieren und anschließend die migratorischen, invasiven Fähigkeiten von Mesenchymzellen entwickeln. Zeitvogel et al. vermuten, dass epithelähnliche Zelllinien möglicherweise durch den Einfluss von N-Cadherin ebenso invasiv sind wie metastatische Karzinomzellen (130). In der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich bei unbehandelten 12Z-Zellen keine N-Cadherin-Expression festgestellt werden, während die Expression nach FF-Behandlung zunahm. Eine leichte Steigerung der Expression von N-Cadherin auf den Zellmembranen könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass die FF die Fähigkeit besitzt, die Expression beider Adhäsionsmoleküle zu stimulieren. Das Ergebnis impliziert, dass E- gegenüber N-Cadherin dominant ist, und es kann postuliert werden, dass sich die Cadherine in verschiedenen Zellen unterschiedlich verhalten. Um dieser Annahme nachzugehen, wäre eine Doppelfärbung der migrierten im Vergleich mit den nicht-migrierten Zellen für beide Cadherine notwendig, die in dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte.

Das Phänomen der verringerten Migrationsfähigkeit nach FF-Behandlung könnte auch durch den Einfluss von FF-Faktoren auf die Expression verschiedener Integrine begründet werden. Gaetje et al. verglichen die Expression verschiedener Integrine in Epithelzellen von eutopem mit ektopem Endometrium bei Endometriose-Erkrankten Frauen (205). Hierbei wurde im ektopen Endometrium eine verringerte Expression der beiden Integrinuntereinheiten  $\alpha_2$  und  $\alpha_v$  im Vergleich zum eutopen Endometrium nachgewiesen. Daher könnte es durchaus sein, dass Faktoren der Mikroumgebung die Integrinexpression und damit verbunden auch die Wanderungsfähigkeit von Zellen modulieren. Integrine sind Transmembranproteine, welche über ihre extrazelluläre Domäne u.a. die RGD (Arginin, Glycin, Asparaginsäure)-Sequenz von EZM-Bestandteilen, bspw. Fibronectin, erkennen und binden (206). Die Komplexbildung der EZM-Komponenten mit Integrinen ermöglicht durch inside-out- und outside-in-Signalwege eine koordinierte Zellmigration. So konnte die Studie von Li et al. zeigen, dass die RGD-Sequenz eines Membranproteins (alpha-Kette des Fibrinogens) die Migration sowie Invasion von stromalen Endometriumzellen über die Aktivierung des FAK/AKT/MMP-2-Signalwegs fördern kann (207). Es wäre also denkbar, dass Faktoren der FF über die Beeinflussung der RGD-Integrin-Komplexbildung eine verringerte Migrationsfähigkeit der 12Z-Zellen hervorrufen können. Zur Aufklärung dieser Annahme bedarf es weiterer Analysen.

Ein anderer Erklärungsansatz für die verringerte Wanderungsfähigkeit der 12Z-Zellen nach FF-Behandlung könnte ein Konkurrenzverhalten von Faktoren der FF und des eingesetzten Lockstoffs Fibronectin sein. Möglicherweise präferieren die endometriotischen Zellen eine Umgebung mit Faktoren der FF. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die



Migrationstendenz der 12Z-Zellen zu den verschiedenen FF-Pools mit derjenigen zu Fibronectin verglichen. FF erwies sich hierbei als starkes Chemotaxin. Im Vergleich zu dem potenten chemotaktischen Lockstoff Fibronectin zeigte sich eine deutlich gesteigerte Migration der 12Z-Zellen in Richtung der FF. Ausgehend von der Implantations- und Metaplasietheorie stellt sich die Frage, wie der Ort einer anfänglichen Läsion maßgeblich bestimmt wird. Die Mehrzahl der endometriotischen Läsionen befindet sich in der Beckenhöhle. Hierbei kommt es zu unterschiedlichen anatomischen Verteilungen mit den häufigsten Lokalisationen an den Eierstöcken, Eileitern, dem Beckenperitoneum und den Bändern des Beckens (208). Die starke Migrationstendenz könnte also ein Hinweis dafür sein, dass die FF das Maß und die Richtung endometriotischer Zellmigration und damit die Lokalisation von Endometrioseherden beeinflussen kann. Interessanterweise migrierten die Zellen der vorliegenden Studie in unterschiedlichem Ausmaß zu den verschiedenen FF-Pools. Während FF1 das stärkste chemotaktische Potenzial aufzeigte, wanderten die Zellen deutlich weniger in Richtung FF3. Ein ähnlicher Trend wurde bereits bei den Viabilitäts- und Proliferationsergebnissen beobachtet. Demnach kann auch hier die unterschiedlich starke Verteilung der IL-8-Konzentration in den einzelnen FF-Pools als möglicher Einflussfaktor auf die Migrationsfähigkeit der 12Z-Zellen betrachtet werden.

#### **5.4 Die Bedeutung der FF-Komponente IL-8 als Chemotaxin**

Bei den Untersuchungen des Einflusses der FF-Pools sowohl auf die Zellviabilität, die Proliferation als auch die Migration konnte ein Zusammenhang mit der IL-8-Konzentration festgestellt werden: FF1 mit der höchsten IL-8-Konzentration bewirkte die höchste Viabilität der 12Z-Zellen, die größten Unterschiede in der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle, und die stärkste Migration. Allerdings erlaubt dieser Zusammenhang keinen eindeutigen Rückschluss auf die Rolle von IL-8 bei der Krankheitsentstehung von Endometriose. Das unterschiedlich starke chemotaktische Potenzial der drei FF-Pools deutet darauf hin, dass diese in Vorkommen und Konzentration bestimmter Lockstoffe divergierten. Um zu überprüfen, ob tatsächlich das Chemokin IL-8 in der FF für die chemotaktische Wanderung der 12Z-Zellen verantwortlich ist, wurden weitere Analysen durchgeführt.

IL-8 ist bereits als bedeutendes Zytokin für die Pathogenese der Endometriose beschrieben (180). So konnten Ryan et al. neben einer erhöhten Konzentration von IL-8 auch eine signifikante Korrelation der IL-8-Konzentration mit dem Endometriosestadium feststellen (162). Mithilfe endometrialer Stromazellen konnten bereits einige Wirkmechanismen des Zytokins in der Entwicklung und Ausbreitung der Erkrankung aufgedeckt werden. So stimuliert IL-8 möglicherweise die Anhaftung von Endometriumimplantaten am Peritoneum. Garcia-Velasco und Arici zeigten, dass eine Erhöhung der IL-8-Menge zu einer verstärkten Fähigkeit

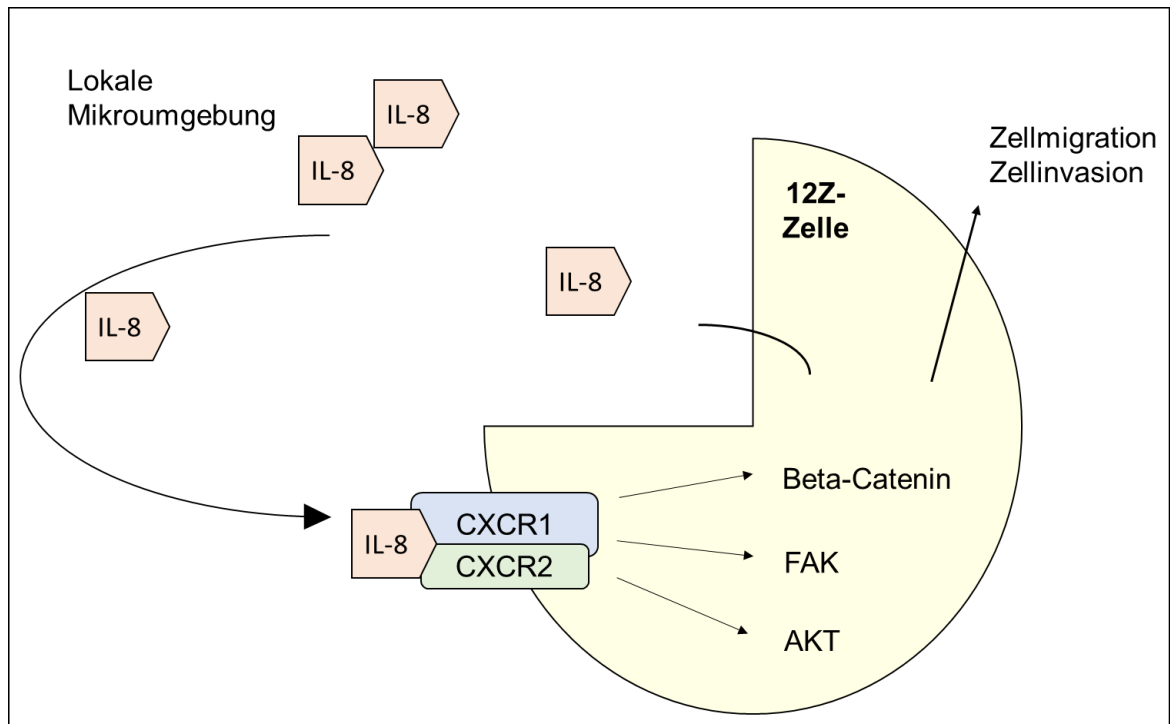
der Adhäsion an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin führt (209). Sie konnten auch beobachten, dass die Adhäsion endometrialer Stromazellen an extrazelluläre Matrixproteine eine unterschiedlich starke IL-8-Genexpression und Proteinsekretion induziert, und dass dieser Vorgang integrinvermittelt abläuft (210). Zudem wurde durch Li et al. beschrieben, dass die abnormale Sekretion von IL-8 in endometriotischem Gewebe durch Herunterregulation der PTEN-Expression und Aktivierung der PI3K/AKT-Signalübertragung das Zellwachstum, das Überleben und die Invasion fördert (176). Allgemein spielen Interleukine eine entscheidende Rolle bei der Auslösung und Regulierung von Entzündungsreaktionen. Durch die Aktivierung von Immunzellen kann es zum Ausbruch einer Kaskade von Entzündungsmediatoren kommen. Hierbei zeigen vor allem Chemokine Funktionen, die der Rekrutierung unterschiedlicher Zelltypen am Ort der Entzündung dienen (187). Chemokine spielen außerdem eine Rolle bei der Aufrechterhaltung und dem Fortschreiten von Karzinomen (211). Waugh und Wilson veröffentlichten im Rahmen ihrer Übersichtsarbeit wichtige IL-8-vermittelte Signalkaskaden bei Karzinomkrankungen (212). Sie beschrieben die Aktivierung bzw. Phosphorylierung verschiedener Signalproteine, welche mit Zellmigration oder -invasion in Verbindung stehen, beispielsweise AKT, FAK und  $\beta$ -Catenin (212). Es wurden allerdings keine Studien gefunden, in denen der chemotaktische Einfluss von IL-8 auf die endometriotischen Zellen untersucht wurde.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit als Grundlage zunächst die Expression der Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 vor und nach FF-Behandlung bei den 12Z-Zellen überprüft. Unbehandelte 12Z-Zellen präsentierten dabei beide IL-8-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, mit einer etwa vierfach stärkeren Expression von CXCR1 gegenüber CXCR2. Ulukus et al. konnten diesbezüglich bereits zeigen, dass die Expression von CXCR1 und CXCR2 in Epithelzellen von ektopischem Endometriumgewebe im Vergleich zu denen des eutopen Endometriums signifikant erhöht ist (213). Die Behandlung mit FF für 24 h führte zu einer deutlich gesteigerten Expression beider Rezeptoren. Die Expression von CXCR1 nahm dabei insgesamt stärker zu als die CXCR2-Expression. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse kann als Hinweis auf eine mögliche Rolle von CXCR1 und CXCR2 hinsichtlich des gesteigerten Migrationsverhaltens in Richtung der FF gesehen werden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurde IL-8 in steigenden Konzentrationen als Chemotaxin eingesetzt und die Migrationsfähigkeit beurteilt. Um die IL-8-Spezifität des Effekts zu belegen, wurde eine Kontrolle mit dem IL-8-Rezeptor-Inhibitor mitgeführt. Die geringste IL-8-Konzentration (200 pg/ml) sollte dabei ungefähr der Konzentration von IL-8 in der FF von gesunden Frauen entsprechen. Die Konzentration von 1000 pg/ml sollte steigende Werte in der FF von Endometriosepatientinnen simulieren und mit dem Einsatz von 100 ng/ml sollte der Trend von weiter steigenden Konzentrationen *in vitro* beobachtet werden. Das Ergebnis deutet auf eine chemotaktische Potenz von IL-8 auf die 12Z-Zellen hin. Zwar zeigte sich bei allen

Konzentrationen ein geringeres Migrationsverhalten als unter Verwendung des sehr potenten Lockstoffs Fibronektin, jedoch wurde mit steigender IL-8-Konzentration eine erhöhte Migrationsfähigkeit induziert. Der beobachtete Effekt wurde durch die Hemmung der beiden IL-8-Rezeptoren mittels Reparaxin wieder aufgehoben, was belegt, dass die erhöhte Migration auf einer Bindung von IL-8 an einen oder beide IL-8-Rezeptoren CXCL1 bzw. CXCL2 zurückzuführen ist.

Es ist allerdings anzunehmen, dass auch andere Faktoren zu dem Migrationsverhalten beitragen. Dafür spricht auch, dass nach Hemmung von CXCR1 und CXCR2 dennoch sehr viele Zellen migrierten. Ein ähnliches Verhalten nach Hemmung der IL-8-Rezeptoren war in der Migrationsanalyse mit dem Einsatz der drei FF-Pools als Lockstoffe erkennbar. Zu allen drei Pools war eine signifikant reduzierte Migrationsfähigkeit der CXCR1- und CXCR2-inhibierten Zellen festzustellen. Erwartungsgemäß zeigte sich die stärkste Reduktion in Richtung von FF3. Wobei angenommen werden kann, dass die Rest-Aktivität der beiden Rezeptoren nach einer Hemmung für eine Migration zu dem Pool mit der geringsten IL-8 Konzentration nicht mehr auszureichen scheint. Die Vermittlung von Migration und Invasion durch CXCR1 und CXCR2 wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Karzinomen nachgewiesen. Die durch die IL-8/CXCR-Achse ausgelöste Aktivierung verschiedener Signalwege kann beispielsweise über EMT eine erhöhte Motilität erklären. Studien, welche auf den Zusammenhang von IL-8 und Tumormigration aufmerksam machten, wurden mit Kolonkarzinom- oder Ovariakarzinomzellen durchgeführt. Sun et al. beschrieben nach Behandlung mit blockierenden Antikörpern gegen CXCR1 und CXCR2 eine Hemmung der IL-8-induzierten Migration von Kolonkarzinomzellen (178). Auch die Ergebnisse der Studie mit SKOV3-Ovariakarzinomzellen von Wen et al. lieferten Hinweise auf eine Beteiligung von IL-8 an der Tumorprogression (179). So konnte durch Hemmung der beiden IL-8-Rezeptoren die migrationsfördernde Wirkung von IL-8 aufgehoben werden. Weiterhin fanden Wen et al. heraus, dass IL-8 vermutlich über die Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs eine EMT initiieren und damit die Migration der Zellen stimulieren kann (179). Außerdem wurde IL-8 mit einer gesteigerten Aktivierung des FAK-Signalweges in Verbindung gebracht, was zu einer verstärkten Proliferation sowie Invasion von stromalen Endometriosezellen führte (214). Vor dem Hintergrund der aufgeführten Migrationsergebnisse und der geschilderten Migrationsvermittlung über IL-8 im Zusammenhang mit Karzinomzellen wäre eine Rolle von IL-8 bei der Ausbreitung von Endometriose durchaus denkbar (*Abbildung 20*).



**Abbildung 20 Hypothese zum stimulierenden Einfluss von IL-8 auf die Zellmigration und -invasion bei 12Z-Zellen**

*IL-8 aus der inflammatorisch veränderten Mikroumgebung (u.a. freigesetzt durch 12Z-Zelle selbst) könnte durch die Bindung der beiden CXCR1 und CXCR2-Rezeptoren über verschiedene Signaltransduktionswege, wie  $\beta$ -Catenin, FAK und AKT, die Zellmigration und -invasion modulieren. FAK = 'focal adhesion'-Kinase; AKT = Proteinkinase B*

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass FF in der Lage ist, das Wachstum von epithelialen endometriotischen Zellen *in vitro* zu induzieren. Unter dem Einfluss der zyklisch freigesetzten FF scheinen die retrograd ausgeschwemmten bzw. pluripotenten Stammzellen einem ständigen Reiz ausgesetzt zu sein. Als erhöhter Faktor in der FF von Endometriosepatientinnen scheint das Zytokin IL-8 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Endometriose zu spielen. Durch seine chemotaktische Wirkung ist es möglicherweise an der Entstehung von endometriotischen Läsionen in der Beckenhöhle beteiligt.

## 5.5 Ausblick

Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit geben Anstöße für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Rolle von FF und deren Komponenten in der Progression der Erkrankung.

In Form einer verbesserten Zellviabilität, einer verstärkten Proliferation und einer gesteigerten Migrationstendenz konnte aufgezeigt werden, dass FF die Fähigkeit besitzt, das Wachstum epithelialer Endometriosezellen positiv zu beeinflussen. Wie einleitend beschrieben, wurde Endometriosegewebe als Zellverband bestehend aus mehreren verschiedenen Zellsubtypen beschrieben. So kommen neben den epithelialen auch stromale Zellen vor (1). Studien analysierten bereits die Wirkung von FF auf die metabolische Aktivität sowie die Proliferation stromaler Endometriosezellen, mit dem Ergebnis wachstumsfördernder Eigenschaften (165, 166). In Anlehnung dieser Untersuchungen sowie den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre somit die Untersuchung des Einflusses von FF auf das Migrationsverhalten von stromalen Zellen von Interesse.

Bahtiyer et al. verglichen zudem die Wirkung von FF gesunder Probandinnen mit dem Effekt von FF, welche von Endometriose erkrankten Patientinnen stammt. Hierbei wurde eine deutliche Steigerung der stromalen Zellvitalität bei Behandlung mit der FF von Endometriosepatientinnen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen (165). Bei den FF-Spenderinnen der vorliegenden Studie handelte es sich um Frauen, bei denen keine Endometriose diagnostiziert wurde. Aufgrund der erschwerten Diagnosestellung bei Endometriose ist es dennoch denkbar, dass pro Pool möglicherweise FF von Endometriose-Erkrankten enthalten sind. In Bezug auf die Zusammensetzung der FF von Endometriosepatientinnen belegten Studien im Unterschied zu FF von gesunden Probandinnen einen Unterschied mit steigenden Konzentrationen inflammatorischer Zytokine, wie IL-1B, IL-6, IL-8 und IL-12 (7, 9, 62). Dies kann als Erklärung für die beschriebenen Differenzen der IL-Konzentrationen zwischen den Pools und im Falle des IL-8 folglich für die unterschiedlichen Effekte der FF-Pools auf die epithelialen Endometriosezellen herangezogen werden. Um den möglichen Einfluss einzelner FF-Komponenten zu verifizieren, wäre es sinnvoll, die durchgeführten Versuche mit FF von diagnostizierten Endometriosepatientinnen zu wiederholen und schließlich zu vergleichen. Vorab wäre hierbei wichtig zu analysieren, ob sich eine unterschiedliche FF-Komponentenverteilung der beiden Spendergruppen, mit dem Fokus auf inflammatorische Interleukine, bestätigt. Die Auswirkungen verschiedener IL sowie deren Zusammenspiel in der Mikroumgebung von Endometrioseherden sind kompliziert, und bisher fehlt eine klare Abgrenzung der Rolle jedes einzelnen IL. Da die Ergebnisse dieser Arbeit über ein gesteigertes Migrationsverhalten eine initiierende Funktion des IL-8 bei der Entstehung von Endometriose vermuten lassen, wären weitere Untersuchungen mit dem inflammatorischen IL von Interesse. Hierbei sollte genauer betrachtet werden, inwieweit IL-8

die Viabilität und Proliferation der 12Z-Zellen beeinflusst. Des Weiteren könnte der Frage nachgegangen werden, ob IL-8 eine ähnlich positive Wirkung auf das Migrationsverhalten stromaler Endometriosezellen ausübt.

Eine Aufklärung der Funktion einzelner IL der FF und deren biologischen Mechanismen könnte Aufschluss über die Rolle der FF bei der Krankheitsentstehung geben und die Möglichkeiten der Vorbeugung und Behandlung von Endometriose verbessern.

## 6 Zusammenfassung

Endometriose ist eine häufige gynäkologische, multifaktorielle Erkrankung. Sie ist durch das Vorkommen von Endometriumgewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle gekennzeichnet. Die Mikroumgebung um die Endometrioseherde, einschließlich der Peritonealflüssigkeit (PF) und der Follikelflüssigkeit (FF), trägt möglicherweise neben epigenetischen Veränderungen verschiedener Signalkaskaden über direkte Wirkmechanismen durch die humoralen Stoffe zur Entstehung und Ausbreitung der Erkrankung bei. Die funktionellen Mechanismen sowie die krankheitsrelevanten Komponenten der FF sind noch nicht bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss der FF auf das funktionelle Verhalten von epithelialen Endometriosezellen zu untersuchen.

12Z-Zellen (epitheliale Endometriosezellen) wurden mit FF behandelt. Diese, gewonnen von insgesamt 18 Patientinnen, wurde in drei Pools zusammengefasst. Der Einfluss der FF wurde in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50 und 75 %) auf die Zellviabilität (MTT-Assay) und die Zellproliferation (BrdU-Assay) nach 24- und 48-stündiger Inkubation der Zellen untersucht. Die Auswirkung der FF auf das Migrationsverhalten der 12Z-Zellen wurde mithilfe der chemotaktischen Zellmigration (Chemotaxis-Boyden-Kammer) analysiert. Die E- und N-Cadherin-Expression der Zellen wurde über immunzytochemische Färbung bestimmt, und die Expression der IL-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Die Inkubation von 12Z-Zellen mit FF stimulierte die Zellviabilität und Zellproliferation am stärksten bei 50 %iger Verdünnung nach 24 h. Nach 48 h war sie vergleichbar mit den in Kontrollmedium inkubierten Zellen. Die Zellmigration wurde durch die Behandlung mit FF gehemmt. Beim Einsatz der FF als Lockstoff wurde ein stark chemotaktisches Potential beobachtet. Die aufgeführten Ergebnisse zeigten Unterschiede zwischen den drei Pools der FF, was mit der unterschiedlichen Konzentration von IL-8 in den Pools zusammenhängen könnte. Die Expression der CXCR1- und CXCR2-Rezeptoren war in FF-stimulierten Zellen gegenüber Zellen, die mit Kontrollmedium inkubiert wurden, deutlich erhöht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die FF das Wachstum von epithelialen endometriotischen Zellen *in vitro* induzieren kann. Die retrograd ausgeschwemmten bzw. pluripotenten Stammzellen in der Peritonealhöhle sind somit einem zyklischen Reiz ausgesetzt, wobei das Zytokin IL-8 in die Entstehung der Erkrankung involviert zu sein scheint. Kenntnisse über die Bedeutung einzelner Faktoren der FF bei der Ausbreitung von Endometriose können neue Therapiemöglichkeiten aufzeigen.

## 7 Referenzen

1. Ebert AD. Endometriose: ein Wegweiser für die Praxis: Walter de Gruyter GmbH & Co KG; 2019.
2. Farquhar C. Endometriosis. *Bmj*. 2007;334(7587):249-53.
3. Simoens S, Hummelshoj L, Dunselman G, Brandes I, Dirksen C, D'Hooghe T. Endometriosis cost assessment (the EndoCost study): a cost-of-illness study protocol. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;71(3):170-6.
4. Che Xh, Chen Yc, Chen Cl, Ye Xi, Zhu H. Non-hormonal targets underlying endometriosis: A focus on molecular mechanisms. *Molecular reproduction and development*. 2015;82(6):410-31.
5. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Gornall V, Martin DC. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. *Fertility and sterility*. 2019;111(2):327-40.
6. Zhang T, De Carolis C, Man GCW, Wang CC. The link between immunity, autoimmunity and endometriosis: a literature update. *Autoimmunity reviews*. 2018;17(10):945-55.
7. Lachapelle M-H, Hemmings R, Roy D-C, Falcone T, Miron P. Flow cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients. *Fertility and sterility*. 1996;65(6):1135-40.
8. Prins JR, Marissen LM, Scherjon SA, Hoek A, Cantineau AEP. Is there an immune modulating role for follicular fluid in endometriosis? A narrative review. *Reproduction*. 2020;159(1):R45-r54.
9. Singh AK, Dutta M, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(10):1363-72.
10. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364(9447):1789-99.
11. Giannella L, Marconi C, Di Giuseppe J, Delli Carpini G, Fichera M, Grelloni C, et al. Malignant Transformation of Postmenopausal Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. *Cancers*. 2021;13(16):4026.
12. Mehedintu C, Plotogea MN, Ionescu S, Antonovici M. Endometriosis still a challenge. *Journal of medicine and life*. 2014;7(3):349-57.
13. Starzinski-Powitz A, Handrow-Metzmacher H, Kotzian S. The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis? *Molecular Medicine Today*. 1999;5(7):304-9.
14. Samani EN, Mamillapalli R, Li F, Mutlu L, Hufnagel D, Krikun G, et al. Micrometastasis of endometriosis to distant organs in a murine model. *Oncotarget*. 2019;10(23):2282.
15. Machairiotis N, Stylianaki A, Dryllis G, Zarogoulidis P, Kouroutou P, Tsiamis N, et al. Extrapelvic endometriosis: a rare entity or an under diagnosed condition? *Diagnostic Pathology*. 2013;8(1):1-12.
16. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *The Lancet Oncology*. 2012;13(4):385-94.
17. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *The Lancet*. 2021;397(10276):839-52.
18. Olive D, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med*. 1993;328:1759-69.
19. Oppelt P, Chavtal R, Haas D, Reichert B, Wagner S, Muller A, et al. Costs of in-patient treatment for endometriosis in Germany 2006: an analysis based on the G-DRG-Coding. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2012;28(11):903-5.
20. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(5):1292-9.



21. Hudelist G, Fritzer N, Thomas A, Niehues C, Oppelt P, Haas D, et al. Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. *Human reproduction*. 2012;27(12):3412-6.
22. Simoens S, Hummelshoj L, D'Hooghe T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Human reproduction update*. 2007;13(4):395-404.
23. Laganà AS, Condemi I, Retto G, Muscatello MR, Bruno A, Zoccali RA, et al. Analysis of psychopathological comorbidity behind the common symptoms and signs of endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2015;194:30-3.
24. Abbas S, Ihle P, Köster I, Schubert I. Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;160(1):79-83.
25. Laganà AS, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, et al. The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).
26. Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertility and sterility*. 2009;92(1):68-74.
27. Adamson GD, Kennedy S, Hummelshoj L. Creating solutions in endometriosis: global collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. SAGE Publications Sage UK: London, England; 2010.
28. Haas D, Chvatal R, Reichert B, Renner S, Shebl O, Binder H, et al. Endometriosis: a premenopausal disease? Age pattern in 42,079 patients with endometriosis. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012;286(3):667-70.
29. Clement PB. The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Advances in anatomic pathology*. 2007;14(4):241-60.
30. Bulun SE. Chapter 25 - Endometriosis. In: Strauss JF, Barbieri RL, editors. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2019. p. 609-42.e7.
31. Klemmt PAB, Starzinski-Powitz A. Molecular and Cellular Pathogenesis of Endometriosis. *Curr Womens Health Rev*. 2018;14(2):106-16.
32. Halis G, Mechsner S, Ebert AD. Diagnose und Therapie der tief-infiltrierenden Endometriose. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(25):446-56.
33. National German Guideline (S2k): Guideline for the Diagnosis and Treatment of Endometriosis: Long Version - AWMF Registry No. 015-045 <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-045.html>. 2020.
34. Burghaus S, Schäfer SD, Beckmann MW, Brandes I, Brünahl C, Chvatal R, et al. Diagnosis and Treatment of Endometriosis. Guideline of the DGGG, SGGG and OEGGG (S2k Level, AWMF Registry Number 015/045, August 2020). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2021;81(04):422-46.
35. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and sterility*. 1997;68(4):585-96.
36. Giudice LC, Evers JL, Healy DL. *Endometriosis: science and practice*: John Wiley & Sons; 2012.
37. Strehl JD, Hackl J, Wachter DL, Klingsiek P, Burghaus S, Renner SP, et al. Correlation of histological and macroscopic findings in peritoneal endometriosis. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(1):152.
38. Donnez J, Binda MM, Donnez O, Dolmans M-M. Oxidative stress in the pelvic cavity and its role in the pathogenesis of endometriosis. *Fertility and sterility*. 2016;106(5):1011-7.
39. Keckstein J. *Endometriose: die verkannte Frauenkrankheit*: Diametric-Verlag; 2009.
40. Koninckx PR, Martin DC. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertility and sterility*. 1992;58(5):924-8.
41. Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertility and sterility*. 2017;108(6):872-85. e1.

42. Thomas EJ, Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;50 Suppl 1:2-10.
43. Jubanyik KJ, Comite F. EXTRAPELVIC ENDOMETRIOSIS. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.* 1997;24(2):411-40.
44. Rousset-Jablonski C, Alifano M, Plu-Bureau G, Camilleri-Broet S, Rousset P, Regnard JF, et al. Catamenial pneumothorax and endometriosis-related pneumothorax: clinical features and risk factors. *Human reproduction (Oxford, England).* 2011;26(9):2322-9.
45. Keichel S, Barcena de Arellano M-L, Reichelt U, Riedlinger W, Schneider A, Köhler C, et al. Lymphangiogenesis in deep infiltrating endometriosis. *Human Reproduction.* 2011;26(10):2713-20.
46. Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertility and sterility.* 2010;94(5):1609-15.
47. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997;67(5):817-21.
48. Society TAF. Classification of endometriosis. *Fertility and Sterility.* 1979;32(6):633-4.
49. Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe K, Wustlich M, et al. ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis. *Zentralblatt für Gynäkologie.* 2005;127(5):275-81.
50. Keckstein J, Saridogan E, Ulrich UA, Sillem M, Oppelt P, Schweppe KW, et al. The# Enzian classification: A comprehensive non-invasive and surgical description system for endometriosis. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 2021 Jul.;100(7):1165-1175.
51. Renner S, Oppelt P, Binder H, Beckmann M. Endometriose. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde.* 2009;69(11):R115-R35.
52. Greene R, Stratton P, Cleary SD, Ballweg ML, Sinaii N. Diagnostic experience among 4,334 women reporting surgically diagnosed endometriosis. *Fertility and sterility.* 2009;91(1):32-9.
53. Fedele L, Bianchi S, Bocciolone L, Di Nola G, Parazzini F. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstetrics and gynecology.* 1992;79(5 (Pt 1)):767-9.
54. Mechsner S, Weichbrodt M, Riedlinger WF, Bartley J, Kaufmann AM, Schneider A, et al. Estrogen and progesterone receptor positive endometriotic lesions and disseminated cells in pelvic sentinel lymph nodes of patients with deep infiltrating rectovaginal endometriosis: a pilot study. *Human reproduction (Oxford, England).* 2008;23(10):2202-9.
55. Arnold J, Barcena de Arellano ML, Ruster C, Vercellino GF, Chiantera V, Schneider A, et al. Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis. *Brain Behav Immun.* 2012;26(1):132-41.
56. Vercellini P, editor *Endometriosis: what a pain it is. Seminars in reproductive endocrinology*; 1997: Copyright© 1997 by Thieme Medical Publishers, Inc.
57. *Endometriosis and infertility. Fertility and Sterility.* 2004;82:40-5.
58. Weinschenk S. Endometriose, Dysmenorrhoe, Sterilität und vegetatives Nervensystem. *Erfahrungsheilkunde.* 2004;53(9):523-32.
59. Halme J, Becker S, Haskill S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;156(4):783-9.
60. Wunder DM, Mueller MD, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Increased ENA-78 in the follicular fluid of patients with endometriosis. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica.* 2006;85(3):336-42.
61. Suginami H, Yano K. An ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid: an OCI-related membrane responsible for fimbrial failure of ovum capture\*\*Supported in part by the Grant-in-Aid for Scientific Research no. 62570761 from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture. *Fertility and Sterility.* 1988;50(4):648-53.
62. Choi YS, Cho S, Seo SK, Park JH, Kim SH, Lee BS. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. *Reproduction.* 2015;149(2):155-62.
63. Exacoustos C, Manganaro L, Zupi E. Imaging for the evaluation of endometriosis and adenomyosis. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology.* 2014;28(5):655-81.

64. Burghaus S, Hildebrandt T, Fahlbusch C, Heusinger K, Antoniadis S, Lermann J, et al. Standards used by a clinical and scientific endometriosis center for the diagnosis and therapy of patients with endometriosis. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2019;79(5):487.
65. Chamié LP, Blasbalg R, Gonçalves MO, Carvalho FM, Abrão MS, de Oliveira IS. Accuracy of magnetic resonance imaging for diagnosis and preoperative assessment of deeply infiltrating endometriosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2009;106(3):198-201.
66. Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, Van Der Veen F, et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 1998;70(6):1101-8.
67. Abbott J, Hawe J, Hunter D, Holmes M, Finn P, Garry R. Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and sterility*. 2004;82(4):878-84.
68. Shakiba K, Bena JF, McGill KM, Minger J, Falcone T. Surgical treatment of endometriosis: a 7-year follow-up on the requirement for further surgery. *Obstetrics & Gynecology*. 2008;111(6):1285-92.
69. Alkatout I, Mettler L, Beteta C, Hedderich J, Jonat W, Schollmeyer T, et al. Combined surgical and hormone therapy for endometriosis is the most effective treatment: prospective, randomized, controlled trial. *Journal of minimally invasive gynecology*. 2013;20(4):473-81.
70. Alkatout I, Egberts J, Mettler L, Doniec M, Wedel T, Jünemann K, et al. Interdisciplinary diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. *Zentralblatt für Chirurgie*. 2015;141(6):630-8.
71. Brown J, Crawford TJ, Allen C, Hopewell S, Prentice A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017(1).
72. Marjoribanks J, Proctor M, Farquhar C, Sangkomkarn US, Derks RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea. *Cochrane database of systematic reviews*. 2003(4).
73. Wu MH, Sun HS, Lin CC, Hsiao KY, Chuang PC, Pan HA, et al. Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(12):1103-10.
74. Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2010;362(25):2389-98.
75. Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C, Faustmann T, Seitz C. Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicentre, open-label trial. *Human Reproduction*. 2010;25(3):633-41.
76. Rudzitis-Auth J, Nenicu A, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW. Estrogen stimulates homing of endothelial progenitor cells to endometriotic lesions. *The American journal of pathology*. 2016;186(8):2129-42.
77. Schindler A. Operative und medikamentöse Therapie der Endometriose/Adenomyose. *Journal für Gynäkologische Endokrinologie*. 2008;2(2):18-24.
78. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(10):2698-704.
79. Meyer R. Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl Gynäkol*. 1919;36:745-50.
80. Van der Linden PJ. Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Human reproduction*. 1996;11(suppl\_3):53-65.
81. Von Recklinghausen F. Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the wolffian body. *Wien Klin Wochenschr*. 1896;8:530.
82. Russel W. Aberrant portion of the Mullerian duct found in an ovary. *Johns Hopkins Hospital Bulletin*. 1899;10:8-10.
83. Troncon JK, Zani ACT, Vieira ADD, Poli-Neto OB, Nogueira AA, Rosa-e-Silva JC. Endometriosis in a patient with mayer-rokitansky-küster-hauser syndrome. *Case reports in obstetrics and gynecology*. 2014;2014.
84. Olikier AJ, Harris AE. Endometriosis of the bladder in a male patient. *The Journal of urology*. 1971;106(6):858-9.

85. Samartzis EP, Imesch P, Fink D. Pathogenese der Endometriose. *Gynäkologie*. 2012;3(3):6-10.
86. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1927;14(4):422-69.
87. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984;64(2):151-4.
88. Salamanca A, Beltrán E. Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis. *Fertility and sterility*. 1995;64(1):193-5.
89. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol*. 1927;3(2):93-110.43.
90. Mahboubi S, Rostain A. Computed tomography finding in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome associated with endometriosis: a case report. *Journal of Computed Tomography*. 1987;11(3):301-2.
91. Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1955;34(4):366-98.
92. Starzinski-Powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, Baumann R. Endometriosis--a stem cell disease? *Zentralblatt für Gynäkologie*. 2003;125(7-8):235-8.
93. Starzinski-Powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, Baumann R. In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology. *Current molecular medicine*. 2001;1(6):655-64.
94. Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol*. 1997;150(2):461-7.
95. Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Molecular human reproduction*. 2010;16(11):818-34.
96. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem cells*. 2007;25(8):2082-6.
97. Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, et al. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biology of reproduction*. 1997;57(3):514-9.
98. Ueda M, Yamashita Y, Takehara M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, et al. Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. *Gynecological endocrinology*. 2002;16(5):391-402.
99. Kao A-P, Wang K-H, Chang C-C, Lee J-N, Long C-Y, Chen H-S, et al. Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model. *Fertility and sterility*. 2011;95(4):1308-15. e1.
100. Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2009;280(4):529-38.
101. Leyendecker G, Kunz G, Wildt L, Beil D, Deininger H. Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Human reproduction*. 1996;11(7):1542-51.
102. Leyendecker G, Kunz G, Herbertz M, Beil D, Huppert P, Mall G, et al. Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1034(1):338-55.
103. Samartzis N, Samartzis EP, Noske A, Fedier A, Dedes KJ, Caduff R, et al. Expression of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in endometriosis: a tissue microarray study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012;10(1):1-9.
104. S2k-Level. Diagnosis and therapy of endometriosis. Guideline of the DGGG, SGGG and OEGGG. AWMF Registry No 045/015. August 2020.

105. Koninckx P, Barlow D, Kennedy S. Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecologic and obstetric investigation*. 1999;47(Suppl. 1):3-10.
106. Du H, Taylor HS. Stem cells and reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2010;22(3):235.
107. Savilova A, Farkhat K, Yushina M, Rudimova YV, Makiyan Z, Adamyan L. Characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells isolated from the endometrium and endometriosis lesions of women with malformations of the internal reproductive organs. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;162(4):539-44.
108. Fernandez-Shaw S, Clarke M, Hicks B, Naish C, Barlow D, Starkey P. Immunology: Bone marrow-derived cell populations in uterine and ectopic endometrium. *Human Reproduction*. 1995;10(9):2285-9.
109. Coxhead D, Thomas E. Familial inheritance of endometriosis in a British population. A case control study. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1993;13(1):42-4.
110. Treloar SA, T O'Connor D, O'connor VM, Martin NG. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertility and sterility*. 1999;71(4):701-10.
111. Rahmioglu N, Missmer SA, Montgomery GW, Zondervan KT. Insights into assessing the genetics of endometriosis. *Current obstetrics and gynecology reports*. 2012;1(3):124-37.
112. Sapkota Y, Steinthorsdottir V, Morris AP, Fassbender A, Rahmioglu N, De Vivo I, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis highlighting key genes involved in hormone metabolism. *Nature communications*. 2017;8(1):1-12.
113. Koninckx P, Braet P, Kennedy S, Barlow D. Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Human Reproduction*. 1994;9(6):1001-2.
114. Nasu K, Kawano Y, Kai K, Aoyagi Y, Abe W, Okamoto M, et al. Aberrant histone modification in endometriosis. *Front Biosci*. 2014;19(8):1202-14.
115. Guo S-W. Epigenetics of endometriosis. *Molecular human reproduction*. 2009;15(10):587-607.
116. Hull ML, Escareno CR, Godsland JM, Doig JR, Johnson CM, Phillips SC, et al. Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment. *The American journal of pathology*. 2008;173(3):700-15.
117. Koninckx PR. Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? *Human Reproduction*. 1994;9(12):2202-4.
118. Wu Y, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Jailwala P, et al. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology*. 2006;147(1):232-46.
119. Feng X, Qi L, Xu X, Feng Y, Gong X, Aili A, et al. Analysis of differences in the transcriptomic profiles of eutopic and ectopic endometriums in women with ovarian endometriosis. *PeerJ*. 2021;9:e11045.
120. Liu Z, Sun Z, Liu H, Niu W, Wang X, Liang N, et al. Single-cell transcriptomic analysis of eutopic endometrium and ectopic lesions of adenomyosis. *Cell & bioscience*. 2021;11(1):1-17.
121. Kasvandik S, Samuel KI, Peters M, Eimre M, Peet Nd, Roost AM, et al. Deep quantitative proteomics reveals extensive metabolic reprogramming and cancer-like changes of ectopic endometriotic stromal cells. *Journal of proteome research*. 2016;15(2):572-84.
122. de Mattos RM, Pereira PR, Barros E, da Silva JH, Palmero CY, da Costa NM, et al. Aberrant levels of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway components in a rat model of endometriosis. *Histology and histopathology*. 2016;31(8):933-42.
123. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(2):a002915.
124. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews cancer*. 2002;2(6):442-54.
125. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular cancer*. 2016;15(1):1-14.
126. Matsuzaki S, Darcha C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(3):712-21.

127. Kazmi I, Alharbi KS, Al-Abbasi FA, Almalki WH, Kumar S, Yasmeeen A, et al. Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Markers in Different Stages of Endometriosis: Expression of the Snail, Slug, ZEB1, and Twist Genes. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2021;31(2).
128. Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *The American journal of pathology*. 1997;150(2):461.
129. Gaetje R, Baumann R, Herrmann G, Kotzian S, Starzinski-Powitz A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *The Lancet*. 1995;346(8988):1463-4.
130. Zeitvogel A, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Identification of an Invasive, N-Cadherin-Expressing Epithelial Cell Type in Endometriosis Using a New Cell Culture Model. *The American Journal of Pathology*. 2001;159(5):1839-52.
131. Béliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart J-M. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertility and sterility*. 1997;67(2):266-72.
132. Zubrzycka A, Migdalska-Sęk M, Jędrzejczyk S, Brzezińska-Lasota E. Circulating miRNAs Related to Epithelial–Mesenchymal Transitions (EMT) as the New Molecular Markers in Endometriosis. *Current Issues in Molecular Biology*. 2021;43(2):900-16.
133. Bjorkman S, Taylor HS. MicroRNAs in endometriosis: biological function and emerging biomarker candidates. *Biology of reproduction*. 2019;101(6):1167-78.
134. Moga MA, Bălan A, Dimienescu OG, Burtea V, Dragomir RM, Anastasiu CV. Circulating miRNAs as biomarkers for endometriosis and endometriosis-related ovarian cancer—An overview. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(5):735.
135. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and sterility*. 2012;98(3):511-9.
136. Han SJ, Jung SY, Wu S-P, Hawkins SM, Park MJ, Kyo S, et al. Estrogen receptor  $\beta$  modulates apoptosis complexes and the inflammasome to drive the pathogenesis of endometriosis. *Cell*. 2015;163(4):960-74.
137. Koninckx P, Kennedy S, Barlow D. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Human Reproduction Update*. 1998;4(5):741-51.
138. Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Human Reproduction Update*. 1996;2(5):385-98.
139. Koninckx P, Renaer M, Brosens I. Origin of peritoneal fluid in women: an ovarian exudation product. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1980;87(3):177-83.
140. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction*. 2002;123(2):217-26.
141. Syrop CH, Halme J. Cyclic changes of peritoneal fluid parameters in normal and infertile patients. *Obstetrics and Gynecology*. 1987;69(3 Pt 1):416-8.
142. Surrey ES, Halme J. Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Obstet Gynecol*. 1990;76(5 Pt 1):792-7.
143. Ho HN, Wu MY, Yang YS. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1997;38(6):400-12.
144. Dmowski W, Steele RW, Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1981;141(4):377-83.
145. Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and sterility*. 1988;50(2):216-22.
146. 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. *Fertility and sterility*. 1991;56(1):45-51.
147. Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj MH, Raj S. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1983;145(3):333-7.
148. Haney A, Muscato JJ, Weinberg JB. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertility and sterility*. 1981;35(6):696-8.

149. Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski WP. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertility and sterility*. 1996;65(5):925-30.
150. Kauma S, Clark MR, White C, Halme J. Production of fibronectin by peritoneal macrophages and concentration of fibronectin in peritoneal fluid from patients with or without endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*. 1988;72(1):13-8.
151. Guo M, Bafligil C, Tapmeier T, Hubbard C, Manek S, Shang C, et al. Mass cytometry analysis reveals a distinct immune environment in peritoneal fluid in endometriosis: a characterisation study. *BMC medicine*. 2020;18(1):1-16.
152. Zou G, Wang J, Xu X, Xu P, Zhu L, Yu Q, et al. Cell subtypes and immune dysfunction in peritoneal fluid of endometriosis revealed by single-cell RNA-sequencing. *Cell & bioscience*. 2021;11(1):1-17.
153. Chan RWS, Lee C-L, Ng EHY, Yeung WSB. Co-culture with macrophages enhances the clonogenic and invasion activity of endometriotic stromal cells. *Cell Proliferation*. 2017;50(3):e12330.
154. Bouckaert P, Evers J, Doesburg W, Schellekens L, Brombacher P, Rolland R. Patterns of changes in proteins in the peritoneal fluid of women during the periovulatory phase of the menstrual cycle. *Reproduction*. 1986;77(2):329-36.
155. Braun J, Kiesel L. Regulation der Follikulogenese. *Gynäkologische Endokrinologie*. 2010;8(3):175-9.
156. Hennet ML, Combelles CM. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International journal of developmental biology*. 2012;56(10-12):819-31.
157. Clarke HG, Hope SA, Byers S, Rodgers RJ. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction*. 2006;132(1):119-31.
158. Gosden R, Hunter R, Telfer E, Torrance C, Brown N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Reproduction*. 1988;82(2):813-25.
159. Sutton M, Gilchrist R, Thompson J. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human reproduction update*. 2003;9(1):35-48.
160. Nagy R, Van Montfoort A, Dikkers A, van Echten-Arends J, Homminga I, Land J, et al. Presence of bile acids in human follicular fluid and their relation with embryo development in modified natural cycle IVF. *Human Reproduction*. 2015;30(5):1102-9.
161. Basuino L, Silveira Jr CF. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA assisted reproduction*. 2016;20(1):38-40.
162. Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, Khorram O, Landers DV, Taylor RN. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1995;63(4):929-32.
163. Wunder DM, Mueller MD, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Increased ENA-78 in the follicular fluid of patients with endometriosis. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2006;85(3):336-42.
164. Choi YS, Cho S, Seo SK, Park JH, Kim SH, Lee BS. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2015;149(2):155-62.
165. Bahtiyar MO, Seli E, Oral E, Senturk LM, Zreik TG, Arici A. Follicular fluid of women with endometriosis stimulates the proliferation of endometrial stromal cells. *Hum Reprod*. 1998;13(12):3492-5.
166. Somigliana E, Vigano P, La Sala GB, Balasini M, Candiani M, Incerti L, et al. Follicular fluid as a favourable environment for endometrial and endometriotic cell growth in vitro. *Human reproduction*. 2001;16(6):1076-80.
167. Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ, Olive DL. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod*. 1996;2(1):40-5.
168. Arici A, Head JR, MacDonald PC, Casey ML. Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Molecular and cellular endocrinology*. 1993;94(2):195-204.

169. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001;12(4):375-91.
170. Arici A, Seli E, Senturk LM, Gutierrez LS, Oral E, Taylor HS. Interleukin-8 in the human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(5):1783-7.
171. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertility and sterility*. 1998;69(5):924-30.
172. Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Current opinion in hematology*. 2000;7(3):178-82.
173. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258(5089):1798-801.
174. Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Oral E, Olive DL. Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(4):1201-5.
175. Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;955(1):101-9.
176. Li MQ, Luo XZ, Meng YH, Mei J, Zhu XY, Jin LP, et al. CXCL8 enhances proliferation and growth and reduces apoptosis in endometrial stromal cells in an autocrine manner via a CXCR1-triggered PTEN/AKT signal pathway. *Hum Reprod*. 2012;27(7):2107-16.
177. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*. 2014;32:659-702.
178. Sun Q, Sun F, Wang B, Liu S, Niu W, Liu E, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 upregulation in colorectal cancer. *Cancer letters*. 2014;354(2):245-53.
179. Wen J, Zhao Z, Huang L, Wang L, Miao Y, Wu J. IL-8 promotes cell migration through regulating EMT by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ovarian cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020;24(2):1588-98.
180. Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation—The role of IL-8 in pathogenesis of endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017;77(4):e12622.
181. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2003;50(1):48-59.
182. Arici A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Engin O, Olive DL. Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology*. 1996;137(9):3762-9.
183. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
184. Muir D, Varon S, Manthorpe M. An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal Biochem*. 1990;185(2):377-82.
185. Brenner W, Greber I, Gudejko-Thiel J, Beitz S, Schneider E, Walenta S, et al. Migration of renal carcinoma cells is dependent on protein kinase C $\delta$  via  $\beta$ 1 integrin and focal adhesion kinase. *International journal of oncology*. 2008;32(5):1125-31.
186. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2006;2(3):1-11.
187. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and sterility*. 2001;76(1):1-10.
188. Von Wald T, Monisova Y, Hacker MR, Yoo SW, Penzias AS, Reindollar RR, et al. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertility and sterility*. 2010;93(7):2354-61.
189. Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J, Remohi J, Pellicer A, Simon C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Human reproduction update*. 2002;8(1):95-103.



190. Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *Journal of Reproduction and fertility Supplement*. 2000;55:109-19.
191. Marquardt RM, Kim TH, Shin JH, Jeong JW. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *International journal of molecular sciences*. 2019;20(15).
192. Louis GMB, Hediger ML, Peterson CM, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, et al. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. *Fertility and sterility*. 2011;96(2):360-5.
193. Ostanin A, Aizikovich B, Aizikovich I, Kozhin AY, Chernykh E. Role of cytokines in the regulation of reproductive function. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2007;143(1):75-9.
194. Machelon V, Emilie D. Production of ovarian cytokines and their role in the European cytokine network. 1997;8(2):137-43.
195. Sarapik A, Velthut A, Haller-Kikkatalo K, Faure GC, Béné M-C, de Carvalho Bittencourt M, et al. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012.
196. Kawasaki F, Kawano Y, Hasan ZK, Narahara H, Miyakawa I. The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids. *Clinical and experimental medicine*. 2003;3(1):27-31.
197. Vujisic S, Zidovec S. Follicular immunology environment and the influence on in vitro fertilization outcome. *Current Women's Health Reviews*. 2005;1(1):49-60.
198. Soni UK, Chadchan SB, Kumar V, Ubba V, Khan MTA, Vinod BSV, et al. A high level of TGF- $\beta$ 1 promotes endometriosis development via cell migration, adhesiveness, colonization, and invasiveness. *Biology of reproduction*. 2019;100(4):917-38.
199. Koutsilieris M, Allaire-Michaud L, Fortier M, Lemay A. Mitogen (s) for endometrial-like cells can be detected in human peritoneal fluid. *Fertility and sterility*. 1991;56(5):888-93.
200. Meresman GF, Baranao RI, Tenenbaum A, Singla J, Neuspiller N, Rumi LS. Effect of peritoneal fluid from patients with mild and severe endometriosis on endometrial stromal cell proliferation. *Archives of gynecology and obstetrics*. 1997;259(3):109-15.
201. Starzinski-Powitz A, Gaetje R, Zeitvogel A, Kotzian S, Handrow-Metzmacher H, Herrmann G, et al. Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Hum Reprod Update*. 1998;4(5):724-9.
202. Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertility and sterility*. 1994;62(5):1086-8.
203. Chuang PC, Wu MH, Shoji Y, Tsai SJ. Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2009;219(2):232-41.
204. Olkowska-Truchanowicz J, Bocian K, Maksym RB, Białoszewska A, Włodarczyk D, Baranowski W, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Human Reproduction*. 2013;28(1):119-24.
205. Gaetje R, Rody A, Kissler S, Kaufmann M, Ahr A. Integrinexpression im eutopen und ektopen Endometrium von Endometriosepatientinnen. *Zentralblatt für Gynäkologie*. 2006;128(03):135-7.
206. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*. 1996;12(1):697-715.
207. Li H, Ma R-Q, Cheng H-Y, Ye X, Zhu H-L, Chang X-H. Fibrinogen alpha chain promotes the migration and invasion of human endometrial stromal cells in endometriosis through focal adhesion kinase/protein kinase B/matrix metalloproteinase 2 pathway. *Biology of Reproduction*. 2020;103(4):779-90.
208. Sonavane SK, Kantawala KP, Menias CO. Beyond the boundaries—endometriosis: typical and atypical locations. *Current problems in diagnostic radiology*. 2011;40(6):219-32.
209. Garcia-Velasco J, Arici A, editors. Interleukin-8 stimulates endometrial stromal cell adhesion to fibronectin. *HUMAN REPRODUCTION*; 1999: OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND.

210. Garcia-Velasco JA, Arici A. Interleukin-8 expression in endometrial stromal cells is regulated by integrin-dependent cell adhesion. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 1999;5(12):1135-40.
211. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
212. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research*. 2008;14(21):6735-41.
213. Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y, Zheng W, Arici A. Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis. *Human reproduction*. 2005;20(3):794-801.
214. Luo Xz, Zhou Wj, Tao Y, Wang Xq, Li Dj. TLR 4 Activation Promotes the Secretion of IL-8 Which Enhances the Invasion and Proliferation of Endometrial Stromal Cells in an Autocrine Manner via the FAK Signal Pathway. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015;74(6):467-79.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
BrdU	Pyrimidin-Analogons 5-Bromo-2'deoxyuridin
CFU	colony forming units
COX-2	Cyclooxygenase-2
CXCL8	Interleukin-8
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dubelcco`s Phosphate Puffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFI	Endometriosis Fertility Index
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERalpha	Östrogenrezeptor-alpha
ERbeta	Östrogenrezeptor-beta
EZM	Extrazellular-Matrix Komponente
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAK	focal adhesion-Kinase
FCS	fetal calf serum
FF	Follikelflüssigkeit
FF1	Pool 1 der Follikelflüssigkeit
FF2	Pool 2 der Follikelflüssigkeit
FF3	Pool 3 der Follikelflüssigkeit
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-releasing-Hormon
GPER	G-protein-gekoppelter Östrogenrezeptor
GWAS	Genome Wide Genome Wide Association Studies
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
hCG	humanes Choriongonadotropin
IGF-1	Insulin-like Growth Faktor-1

---

IL-	Interleukin-
IL-8	Interleukin-8
IVF	in vitro-Fertilisation
LH	luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen activated protein-Kinase
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
min	Minute
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
MMP-2	Matrixmetalloproteinase-2
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
MTT	3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
NFκB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSAP	nichtsteroidale Antiphlogistika
P/S	Penicillin/Streptomycin
PF	Peritonealflüssigkeit
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PP	Polypropylen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
rASRM	revidierte Fassung der American Society for Reproductive Medicine
RE	relative Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	runs per minute
RT	Raumtemperatur
SR-M	serumreduziertes Medium
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor beta
TIAR	Tissue Injury and Repair
TIE	tief infiltrierende Endometriose
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Nodus Metastase

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 #ENZIAN-Klassifikation nach Keckstein et al., 2021 (modifiziert) .....	7
Abbildung 2 Genetisch/epigenetische-Theorie nach Koninckx et al., 2019 (modifiziert) .....	14
Abbildung 3 Hypothetische Rolle von FF bei der Entstehung von Endometriose nach Prins et al., 2020 (modifiziert) .....	19
Abbildung 4 Repräsentative Darstellung der Zelllinie 12Z .....	27
Abbildung 5 Zellviabilität von 12Z-Zellen in vier verschiedenen Medienansätzen von DMEM/F-12 mit dem Zusatz von 0, 1, 2 und 10 % FCS .....	37
Abbildung 6 Zellviabilität von 12Z-Zellen nach 24 h FF-Behandlung .....	39
Abbildung 7 Zellviabilität von 12Z-Zellen nach 48 h FF-Behandlung .....	41
Abbildung 8 Zellproliferation von 12Z-Zellen nach 24 h FF-Behandlung .....	44
Abbildung 9 Zellproliferation von 12Z-Zellen nach 48 h FF-Behandlung .....	46
Abbildung 10 Chemotaktische Zellmigration von 12Z-Zellen nach FF-Behandlung in Richtung Fibronektin .....	49
Abbildung 11 Repräsentative Darstellung der geformten Zellklumpen nach chemotaktischer Migration von FF-behandelten 12Z-Zellen .....	49
Abbildung 12 Chemotaktische Zellmigration von 12Z-Zellen in Richtung FF .....	51
Abbildung 13 Repräsentative Darstellung der immunzytochemischen Färbung von E-Cadherin und N-Cadherin bei 12Z-Zellen vor und nach FF-Behandlung .....	52
Abbildung 14 Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von CXCR1 bei 12Z-Zellen nach FF-Behandlung .....	55
Abbildung 15 Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von CXCR2 bei 12Z-Zellen nach FF-Behandlung .....	56
Abbildung 16 Expression von CXCR1 und CXCR2 bei 12Z-Zellen nach FF-Behandlung ....	57
Abbildung 17 Chemotaktische Zellmigration nach Reparixin-Behandlung von 12Z-Zellen mit IL-8 als Chemotaxin .....	59
Abbildung 18 Chemotaktische Zellmigration nach Reparixin-Behandlung von 12Z-Zellen mit FF als Chemotaxin .....	60
Abbildung 19 Schematische Darstellung der Rolle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen bei der Pathogenese von Endometriose nach Che et al., 2015 (modifiziert) .....	65
Abbildung 20 Hypothese zum stimulierenden Einfluss von IL-8 auf die Zellmigration und -invasion bei 12Z-Zellen .....	71

### 8.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Konzentration verschiedener Komponenten in den drei FF-Pools (FF1; FF2; FF3). Jeder Pool enthält die FF von sechs Patientinnen. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 2 Übersicht über die Effekte von FF1, FF2 und FF3 auf die Viabilität von 12Z-Zellen .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 3 Übersicht über die Effekte von FF1, FF2 und FF3 auf die Proliferation von 12Z-Zellen .....</i>	<i>47</i>

## 8.4 Werte/Rohdaten

Werte zu Abbildung 5: Zellviabilität von 12Z in vier verschiedenen Medienansätzen DMEM/F-12 mit dem Zusatz von 0, 1, 2 und 10 % FCS

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Die Werte sind in % der Kontrolle (Zellen in M+10 % FCS) dargestellt.

### Viabilität Kontrollmedium

<b>M+2%FCS</b>	<b>1.Durchgang</b>	<b>2.Durchgang</b>	<b>3.Durchgang</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
12h	94,231	98,086	102,122	98,147	3,946
24h	86,235	86,648	84,189	85,691	1,316
36h	68,356	82,710	82,217	77,761	8,149
48h	75,517	79,597	79,728	78,281	2,394
60h	68,412	72,648	78,387	73,149	5,006
72h	54,461	48,792	51,273	51,509	2,842

<b>M+1%FCS</b>	<b>1.Durchgang</b>	<b>2.Durchgang</b>	<b>3.Durchgang</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
12h	88,004	99,781	106,553	98,113	9,387
24h	60,414	81,440	78,528	73,461	11,392
36h	41,490	67,758	58,255	55,834	13,300
48h	31,734	45,691	42,941	40,122	7,393
60h	11,635	31,315	28,937	23,962	10,742
72h	1,397	0,982	2,873	1,751	0,994

<b>M+0%FCS</b>	<b>1.Durchgang</b>	<b>2.Durchgang</b>	<b>3.Durchgang</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
12h	73,076	89,026	86,420	82,841	8,556
24h	51,836	56,932	43,578	50,782	6,739
36h	38,589	63,922	32,042	44,851	16,837
48h	34,796	49,676	30,216	38,229	10,174
60h	10,199	9,879	5,805	8,627	2,450
72h	0,570	1,116	0,758	0,815	0,277

Werte zu Abbildung 6: Zellviabilität von 12Z nach 24 h FF-Behandlung

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Test auf Signifikanz zu entsprechender DPBS-Kontrolle) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % der entsprechenden DPBS-Kontrollen dargestellt.

24h Viabilität		1.Durchgang	2.Durchgang	3.Durchgang	Mittelwert	SD	p-Wert
DPBS	100%	0,032	0,074	0,042	0,049	0,022	
SR-M	100%	0,488	0,487	0,539	0,505	0,030	
DPBS	10%	0,503	0,519	0,528	0,516	0,013	
	25%	0,507	0,496	0,517	0,506	0,011	
	50%	0,446	0,434	0,443	0,441	0,007	
	75%	0,327	0,327	0,320	0,324	0,004	
<b>FF1</b>	10%	0,451	0,464	0,555	0,490	0,057	0,428
	25%	0,546	0,503	0,636	0,562	0,068	0,236
	50%	0,568	0,554	0,516	0,546	0,027	<b>0,023</b>
	75%	0,379	0,430	0,421	0,410	0,028	<b>0,037</b>
<b>FF2</b>	10%	0,449	0,449	0,528	0,475	0,046	0,190
	25%	0,501	0,497	0,462	0,487	0,021	0,381
	50%	0,487	0,486	0,473	0,482	0,008	<b>0,026</b>
	75%	0,350	0,407	0,367	0,374	0,029	0,095
<b>FF3</b>	10%	0,462	0,435	0,550	0,483	0,060	0,387
	25%	0,500	0,473	0,547	0,507	0,037	0,978
	50%	0,493	0,555	0,537	0,528	0,032	0,057
	75%	0,352	0,438	0,400	0,397	0,043	0,102
<b>in % zur entsprechenden DPBS-Kontrolle:</b>							
					<b>FF1</b>	<b>FF2</b>	<b>FF3</b>
	10%				94,880	92,002	93,441
	25%				110,935	96,105	100,097
	50%				123,732	109,684	119,827
	75%				126,457	115,448	122,355



Werte zu Abbildung 7: Zellviabilität von 12Z nach 48 h FF-Behandlung

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Test auf Signifikanz zu entsprechender DPBS-Kontrolle) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % der entsprechenden DPBS-Kontrollen dargestellt.

48h Viabilität		1.Durchgang	2.Durchgang	3.Durchgang	Mittelwert	SD	p-Wert
DPBS	100%	0,012	0,016	0,054	0,027	0,023	
SR-M	100%	0,549	0,585	0,615	0,583	0,033	
DPBS	10%	0,574	0,595	0,596	0,589	0,012	
	25%	0,548	0,515	0,479	0,514	0,035	
	50%	0,500	0,421	0,408	0,443	0,049	
	75%	0,354	0,380	0,385	0,373	0,017	
<b>FF1</b>	10%	0,506	0,494	0,602	0,534	0,059	0,226
	25%	0,574	0,522	0,721	0,606	0,174	0,346
	50%	0,510	0,536	0,519	0,522	0,013	0,148
	75%	0,315	0,480	0,454	0,417	0,089	0,409
<b>FF2</b>	10%	0,519	0,507	0,587	0,537	0,043	0,157
	25%	0,560	0,445	0,444	0,483	0,066	0,316
	50%	0,517	0,472	0,525	0,505	0,028	0,169
	75%	0,417	0,414	0,420	0,417	0,003	<b>0,044</b>
<b>FF3</b>	10%	0,534	0,501	0,620	0,552	0,061	0,392
	25%	0,574	0,517	0,569	0,553	0,032	0,274
	50%	0,430	0,521	0,594	0,515	0,082	0,438
	75%	0,291	0,471	0,453	0,405	0,099	0,573
<b>in % zur entsprechenden DPBS-Kontrolle:</b>							
					<b>FF1</b>	<b>FF2</b>	<b>FF3</b>
	10%				90,669	91,317	93,725
	25%				117,911	93,936	107,631
	50%				117,784	113,961	116,279
	75%				111,674	111,714	108,564

## Werte zu Abbildung 8: Zellproliferation von 12Z nach 24 h FF-Behandlung

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Test auf Signifikanz zu entsprechender DPBS-Kontrolle) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % der entsprechenden DPBS-Kontrollen dargestellt.

24h Proliferation		1.Durchgang	2.Durchgang	3.Durchgang	Mittelwert	SD	p-Wert
DPBS	100%	0,909	0,914	0,981	0,935	0,040	
SR-M	100%	1,063	1,053	1,409	1,175	0,203	
DPBS	10%	1,215	1,065	1,097	1,126	0,079	
	25%	1,192	1,102	1,016	1,103	0,088	
	50%	1,144	1,017	0,948	1,036	0,099	
	75%	1,017	0,936	0,948	0,967	0,044	
<b>FF1</b>	10%	1,022	1,125	1,206	1,117	0,092	0,939
	25%	1,280	1,157	1,135	1,191	0,078	<b>0,041</b>
	50%	1,383	1,276	1,231	1,297	0,078	<b>0,002</b>
	75%	1,468	0,851	1,099	1,139	0,310	0,382
<b>FF2</b>	10%	1,194	0,961	1,387	1,181	0,213	0,691
	25%	1,052	0,992	1,103	1,049	0,056	0,525
	50%	1,289	1,343	1,208	1,280	0,068	<b>0,043</b>
	75%	1,289	1,123	1,208	1,207	0,083	<b>0,012</b>
<b>FF3</b>	10%	1,247	1,059	1,381	1,229	0,162	0,374
	25%	1,063	0,980	1,264	1,102	0,146	0,994
	50%	1,199	1,041	1,352	1,197	0,156	0,318
	75%	1,146	1,131	1,232	1,169	0,055	<b>0,046</b>
<b>in % zur entsprechenden DPBS-Kontrolle:</b>							
					<b>FF1</b>	<b>FF2</b>	<b>FF3</b>
	10%				99,279	104,905	109,199
	25%				107,924	95,081	99,899
	50%				125,098	123,522	115,519
	75%				117,810	124,777	120,914

Werte zu Abbildung 9: Zellproliferation von 12Z nach 48 h FF-Behandlung

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Test auf Signifikanz zu entsprechender DPBS-Kontrolle) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % der entsprechenden DPBS-Kontrollen dargestellt.

48h Proliferation		1.Durchgang	2.Durchgang	3.Durchgang	Mittelwert	SD	p-Wert
DPBS	100%	1,060	1,304	1,085	1,149	0,134	
SR-M	100%	1,721	2,016	1,625	1,787	0,203	
DPBS	10%	1,618	1,867	1,898	1,794	0,154	
	25%	1,884	1,856	1,660	1,800	0,122	
	50%	1,570	1,476	1,532	1,526	0,047	
	75%	1,563	1,532	1,456	1,517	0,055	
FF1	10%	1,521	1,862	1,701	1,695	0,171	0,215
	25%	1,365	1,956	1,520	1,614	0,306	0,410
	50%	1,703	1,936	1,483	1,707	0,227	0,347
	75%	1,585	1,975	1,223	1,594	0,376	0,732
FF2	10%	1,826	2,007	1,632	1,822	0,188	0,870
	25%	1,562	1,727	1,440	1,577	0,144	0,057
	50%	1,607	1,852	1,659	1,706	0,129	0,217
	75%	1,706	1,992	1,483	1,727	0,255	0,246
FF3	10%	1,941	1,668	1,714	1,774	0,146	0,917
	25%	1,718	1,760	1,343	1,607	0,229	0,097
	50%	1,613	1,775	1,805	1,731	0,103	0,127
	75%	1,590	1,797	1,395	1,594	0,201	0,510
<b>in % zur entsprechenden DPBS-Kontrolle:</b>							
					<b>FF1</b>	<b>FF2</b>	<b>FF3</b>
	10%				94,439	101,530	98,873
	25%				89,652	87,581	89,282
	50%				111,890	111,800	113,420
	75%				105,109	113,849	105,106

Werte zu Abbildung 10: Chemotaktische Zellmigration von 12Z nach FF-Behandlung in Richtung Fibronektin

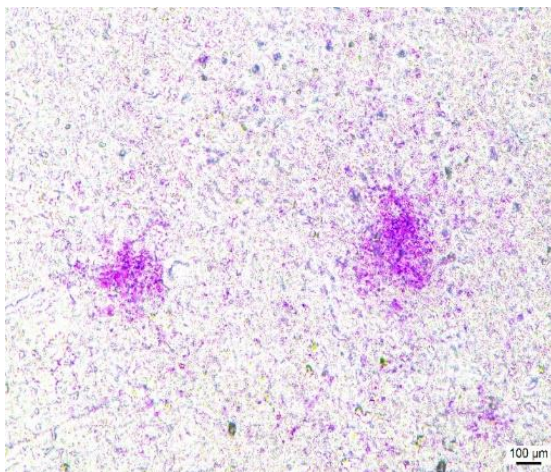
Angegeben sind die ausgezählten Zellen/mm<sup>2</sup>, Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Testung signifikanter Unterschiede im Vergleich zur Positivkontrolle) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % zur Positivkontrolle dargestellt.

#### Migration nach FF-Behandlung

	1.Membran	2.Membran	3.Membran	Mittelwert	SD	p-Wert
Negativkontrolle	30,6	41,4	37,4	36,45	5,46	
Positivkontrolle	223,8	197,6	170,1	197,19	26,82	
50% FF1/SR-M	135,6	40,2	26,6	67,45	59,39	<b>0,026</b>
50% FF2/SR-M	47,9	19,1	23,6	30,19	15,53	<b>0,004</b>
50% FF3/SR-M	101,4	30,0	48,7	60,02	37,00	<b>0,012</b>

in % zur Positivkontrolle:		
	Positivkontrolle	100
	50% FF1/SR-M	34,207
	50% FF2/SR-M	15,310
	50% FF3/SR-M	30,440

Mikroskopisches Bild in Abbildung 11: Repräsentative Darstellung der geformten Zellklumpen nach chemotaktischer Migration von FF-behandelten 12Z-Zellen (50 % FF3/SR-M)



Das mikroskopische Bild wurde mit dem Mikroskop Leica DMIL LED in 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt 100 µm.

### Werte zu Abbildung 12: Chemotaktische Zellmigration von 12Z in Richtung FF

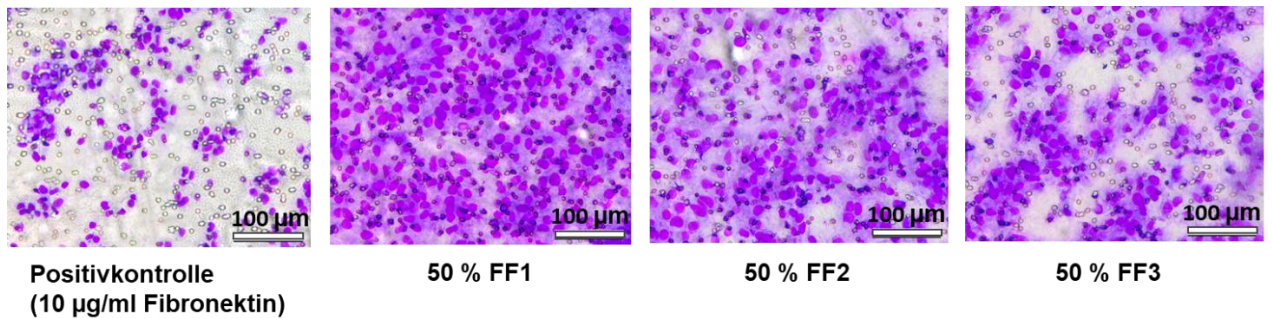
Angegeben sind die ausgezählten Zellen/mm<sup>2</sup>, Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Testung signifikanter Unterschiede im Vergleich zur Positivkontrolle) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % zur Positivkontrolle dargestellt.

#### Migration in Richtung FF

	1.Membran	2.Membran	3.Membran	Mittelwert	SD	p-Wert
Negativkontrolle	23,2	7,4	13,6	14,73	7,96	
Positivkontrolle	236,8	153,8	185,7	192,10	41,87	
50% FF1/SR-M	766,7	660,1	572,0	666,27	97,50	<b>0,009</b>
50% FF2/SR-M	701,4	504,7	407,8	537,97	149,60	<b>0,039</b>
50% FF3/SR-M	493,4	240,5	210,7	314,87	155,33	0,218

in % zur Positivkontrolle:		
	Positivkontrolle	100
	50% FF1/SR-M	346,833
	50% FF2/SR-M	280,045
	50% FF3/SR-M	163,908

Mikroskopische Bilder in Abbildung 12 (B): Repräsentative Aufnahmen der migrierten Zellen zu den verschiedenen Lockstoffen (von links nach rechts: Positivkontrolle (10 µg/ml Fibronectin in 50 % DPBS/SR-M), 50 % FF1/SR-M, 50 % FF2/SR-M, 50 % FF3/SR-M)



Die mikroskopischen Bilder wurden mit dem Mikroskop Leica DMIL LED in 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Der Maßstab beträgt jeweils 100 µm.

Werte zu Abbildung 14: Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von CXCR1 bei 12Z nach FF-Behandlung

Darstellung der Ergebnisse in Form eines Dotplots. Die Histogramme zeigen die Isotypenkontrollen, CXCR1 der unbehandelten Zellkontrolle in schwarz und das CXCR1 nach FF-Behandlung in blau.

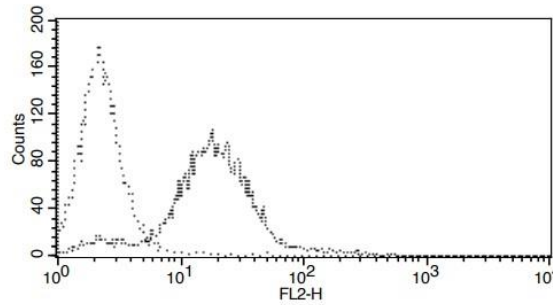
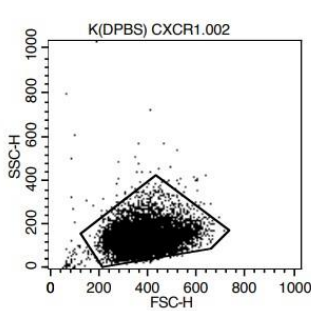
### CXCR1-Kontrolle

#### Histogram Statistics

File: K(DPBS) CXCR1.002  
 Sample ID: Kontrolle(M/PBS) CXCR1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14850  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G10  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14850	100.00	99.00	23.13	16.81	109.09	17.94	17



Key Name  
 ..... K(DPBS) Isotyp1.001  
 ..... K(DPBS) CXCR1.002

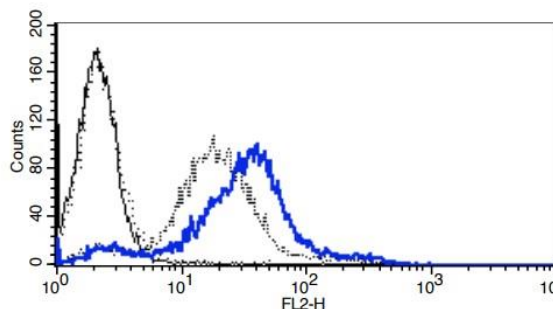
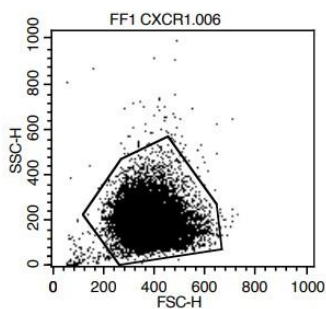
### CXCR1-FF1

#### Histogram Statistics

File: FF1 CXCR1.006  
 Sample ID: POOL1 CXCR1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14782  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G12  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14782	100.00	98.55	41.29	27.08	118.34	31.34	39



Key Name  
 ..... K(DPBS) Isotyp1.001  
 ..... K(DPBS) CXCR1.002  
 ..... FF1 Isotyp1.005  
 ..... FF1 CXCR1.006

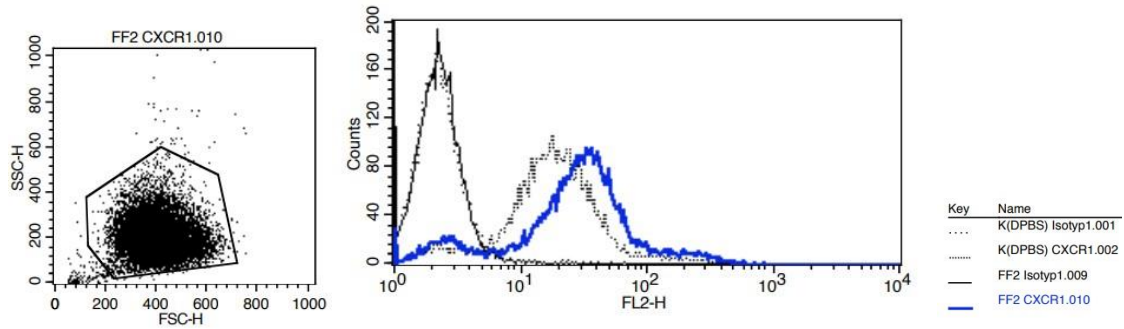
### CXCR1-FF2

#### Histogram Statistics

File: FF2 CXCR1.010  
 Sample ID: POOL2 CXCR1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14811  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G14  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14811	100.00	98.74	39.98	24.35	127.21	28.64	35



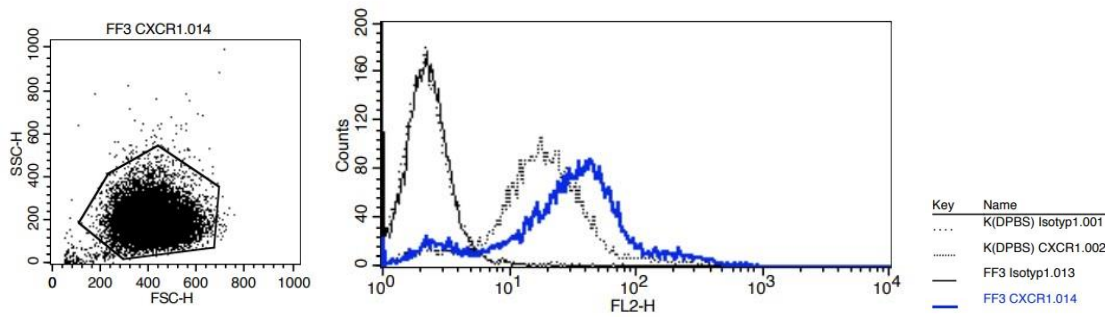
### CXCR1-FF3

#### Histogram Statistics

File: FF3 CXCR1.014  
 Sample ID: POOL3 CXCR1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14711  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G16  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14711	100.00	98.07	43.11	25.78	127.85	30.78	41



Werte zu Abbildung 15: Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von CXCR2 bei 12Z nach FF-Behandlung

Darstellung der Ergebnisse in Form eines Dotplots. Die Histogramme zeigen die Isotypenkontrollen, CXCR2 der unbehandelten Zellkontrolle in schwarz und das CXCR2 nach FF-Behandlung in grün.

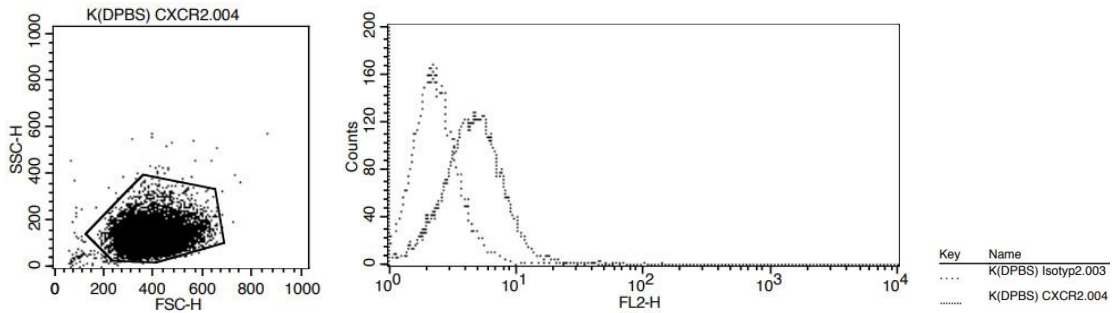
### CXCR2-Kontrolle

#### Histogram Statistics

File: K(DPBS) CXCR2.004  
 Sample ID: Kontrolle(M/PBS) CXCR2  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14868  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G8  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14868	100.00	99.12	5.27	4.62	63.60	4.66	4



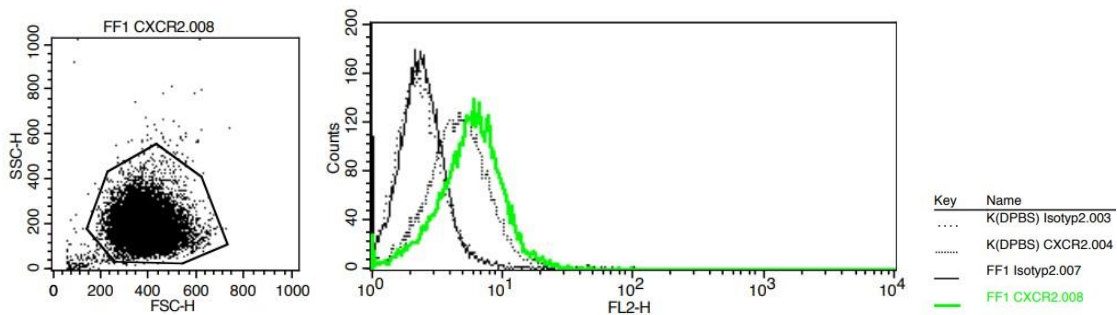
### CXCR2-FF1

#### Histogram Statistics

File: FF1 CXCR2.008  
 Sample ID: POOL1 CXCR2  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14789  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G10  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14789	100.00	98.59	6.33	5.56	54.00	5.78	5





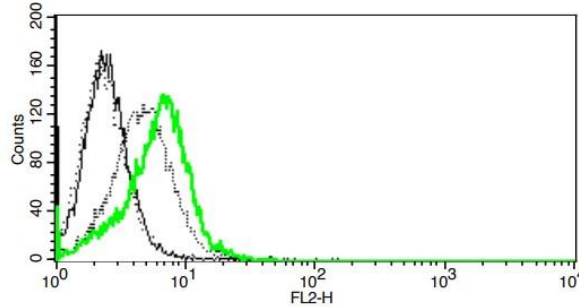
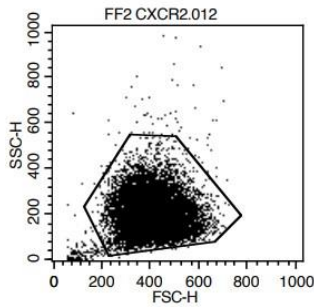
**CXCR2-FF2**

Histogram Statistics

File: FF2 CXCR2.012  
 Sample ID: POOL2 CXCR2  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14790  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G12  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14790	100.00	98.60	6.62	5.78	52.48	6.21	6



Key	Name
.....	K(DPBS) Isotyp2.003
.....	K(DPBS) CXCR2.004
.....	FF2 Isotyp2.011
—	FF2 CXCR2.012

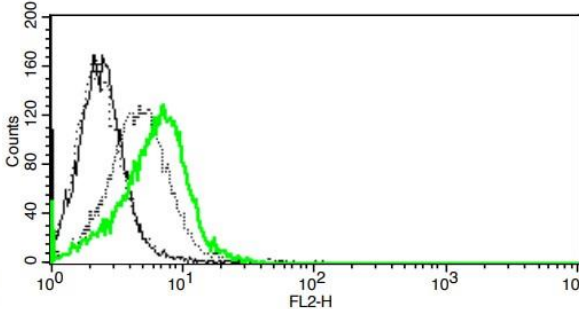
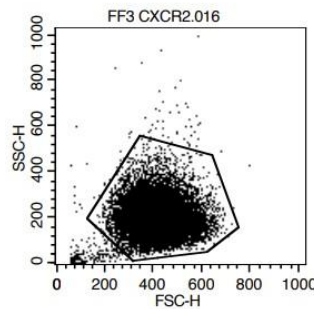
**CXCR2-FF3**

Histogram Statistics

File: FF3 CXCR2.016  
 Sample ID: POOL3 CXCR2  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 01-Oct-20  
 Gated Events: 14736  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G14  
 Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14736	100.00	98.24	6.71	5.84	53.09	6.21	6



Key	Name
.....	K(DPBS) Isotyp2.003
.....	K(DPBS) CXCR2.004
.....	FF3 Isotyp2.015
—	FF3 CXCR2.016

*Werte zu Abbildung 16: Expression von CXCR1 und CXCR2 bei 12Z nach FF-Behandlung*

*Angegeben sind die Mean Werte der durchflusszytometrischen Messung. Die Werte sind zusätzlich in % der unbehandelten Kontrolle dargestellt.*

**FACS- Expression**

	<b>CXCR1</b>		<b>CXCR2</b>	
	Mean	in % der Kontrolle	Mean	in % der Kontrolle
Kontrolle	23,1	100,0	5,3	100,0
50% FF1/SR-M	41,3	178,5	6,3	120,1
50% FF2/SR-M	40,0	172,8	6,6	125,6
50% FF3/SR-M	43,1	186,4	6,7	127,3

Werte zu Abbildung 17: Chemotaktische Zellmigration nach Reparixin-Behandlung von 12Z in Richtung IL-8

Angegeben sind die ausgezählten Zellen/mm<sup>2</sup>, Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Testung signifikanter Unterschiede Reparixin-behandelter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % der unbehandelten Zellen dargestellt.

**Migration in Richtung IL-8**

unbehandelte Z	1.Membran	2.Membran	3.Membran	Mittelwert	SD	p-Wert
Negativkontrolle	25,2	7,3	29,7	20,73	11,85	
Positivkontrolle	169,2	181,9	163,0	171,37	9,63	
200 pg/ml IL-8	125,0	131,3	85,1	113,80	25,05	
1000 pg/ml IL-8	168,2	103,9	81,4	117,83	45,05	
100 ng/ml IL-8	179,5	185,3	120,3	161,70	35,97	
Reparixin beh. Z	1.Membran	2.Membran	3.Membran	Mittelwert	SD	
Negativkontrolle	8,1	7,3	49,3	21,57	24,02	
Positivkontrolle	158,4	150,6	176,1	161,70	13,07	
200 pg/ml IL-8	104,8	73,2	83,2	87,07	16,15	0,248
1000 pg/ml IL-8	100,8	58,4	71,3	76,83	21,73	0,133
100 ng/ml IL-8	114,9	94,4	79,9	96,40	17,59	<b>0,046</b>

in % zu unbehandelten Zellen:	unbeh. Z.	Reparixin beh. Z
Positivkontrolle	100	94,359
200 pg/ml IL-8	100	76,508
1000 pg/ml IL-8	100	65,205
100 ng/ml IL-8	100	59,617

Werte zu Abbildung 18: Chemotaktische Zellmigration nach Reparixin-Behandlung von 12Z in Richtung IL-8 aus FF

Angegeben sind die ausgezählten Zellen/mm<sup>2</sup>, Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde der T-Test (Testung signifikanter Unterschiede Reparixin-behandelter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen) durchgeführt. Die Werte sind zusätzlich in % der unbehandelten Zellen dargestellt.

**Migration in Richtung IL-8 aus FF**

unbehandelte Zellen	1.Membran	2.Membran	3.Membran	Mittelwert	SD	p-Wert
Negativkontrolle	14,0	21,3	18,7	18,00	3,71	
50% FF1/SR-M	609,0	637,0	641,7	629,22	17,67	
50% FF2/SR-M	467,3	348,3	320,0	378,56	78,18	
50% FF3/SR-M	364,0	253,3	206,7	274,67	80,81	

Reparixin beh.Zellen	1.Membran	2.Membran	3.Membran	Mittelwert	SD	
Negativkontrolle	25,3	15,3	17,3	19,33	5,29	
50% FF1/SR-M	443,0	422,0	396,7	420,56	23,20	<b>0,012</b>
50% FF2/SR-M	190,3	202,7	152,7	181,89	26,05	<b>0,040</b>
50% FF3/SR-M	141,7	110,0	62,3	104,67	39,93	<b>0,023</b>

in % zu unbehandelten Zellen:	unbeh. Z.	Reparixin beh. Z.
50% FF1/SR-M	100	66,837
50% FF2/SR-M	100	48,048
50% FF3/SR-M	100	38,107

## **8.5 Tabellarischer Lebenslauf**



## **8.6 Danksagung**