

**Einfluss von 17- β -Estradiol und Dienogest auf humane
primäre endometriale Epithelzellen im Kontext der
Endometriose**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kary, Franziska Louisa
aus Holzminden

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Gynäkologie und Frauenheilkunde

Gutachter: PD Dr. Lutz Konrad

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorf

Tag der Disputation: 18.12.2025

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Endometriose | 1 |
| 1.1.1 Pathogenese der Endometriose | 1 |
| 1.1.2 Diagnostik und Behandlung der Endometriose | 3 |
| 1.2 Östrogen und Progesteron | 4 |
| 1.2.1 Synthese von Östrogenen | 5 |
| 1.2.2 Östrogen-Signaltransduktion | 5 |
| 1.2.3 Aufbau und Funktion von ER α und ER β | 6 |
| 1.2.4. Progesteronrezeptoren | 6 |
| 1.3 Matrix-Metalloproteinasen | 7 |
| 1.3.1 Matrix-Metalloproteinasen-7 | 8 |
| 1.4 Wundheilung | 8 |
| 1.4.1 Narbenbildung im Uterus | 10 |
| 1.4.2 CD26-positive Fibroblasten..... | 10 |
| 1.5 Die Interleukin-1-Familie | 12 |
| 1.5.1 Interleukin-1 α | 12 |
| 1.5.2 Regulation von IL1 α | 13 |
| 1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit | 13 |
| 2. Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Material | 15 |
| 2.1.1 Chemikalien..... | 15 |
| 2.1.2 Geräte..... | 16 |
| 2.1.3 Zellkulturreagenzien | 17 |
| 2.1.4 Antikörper..... | 18 |
| 2.1.5 Stimulanzien und Inhibitoren | 19 |
| 2.1.6 ELISA-Sets | 19 |
| 2.1.7 Puffer | 19 |
| 2.2 Verwendete Zelllinien | 20 |
| 2.2.1 eCRC560..... | 20 |
| 2.2.2 HPESC560..... | 20 |
| 2.3 Zellbiologische Standardmethoden | 20 |
| 2.3.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.2 Bestimmung der Zellzahl..... | 21 |
| 2.3.3 Passagieren der Zellen | 21 |
| 2.4 Durchführung der Experimente | 22 |
| 2.4.1 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Stimulanzen in indirekter Kokultur .. | 22 |
| 2.4.2 Kollektion der Proben für Western Blot und ELISA..... | 23 |
| 2.4.3 Stimulation von HPESC560 mit IL1 α und Diprotin A..... | 23 |
| 2.4.4 Zellmigrations-Assay..... | 24 |
| 2.4.5 Zellinvasions-Assay..... | 24 |
| 2.4.6 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes | 25 |
| 2.5 Proteinanalyse..... | 25 |
| 2.5.1 Western Blot | 25 |
| 2.5.2 Vorbereitung der Proben für den Western Blot..... | 25 |
| 2.5.3 Vorbereitung der Gele für die Gelelektrophorese..... | 26 |
| 2.5.4 Stripping von Membranen | 28 |
| 2.5.5 ELISA | 28 |
| 2.5.6 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellen | 29 |
| 2.6 Statistik..... | 30 |
| 3. Ergebnisse | 31 |
| 3.1 Charakterisierung der primären humanen endometrialen Epithelzelllinie eCRC560..... | 31 |
| 3.2 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf den transepithelialen elektrischen Widerstand von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560 | 32 |
| 3.3 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die ZO1 Expression in eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560..... | 33 |
| 3.3.1 Darstellung mittels Western Blot..... | 33 |
| 3.3.2 Darstellung mittels Immunfluoreszenz..... | 38 |
| 3.4 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die Migration von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560..... | 42 |
| 3.5 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die Invasivität von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560..... | 43 |
| 3.6 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die Lebensfähigkeit von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560..... | 45 |

| | |
|--|------------|
| 3.7 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die Sekretion von MMP-7 von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560..... | 47 |
| 3.8 Experimente zur narbenlosen Wundheilung im Rahmen der Menstruation | 49 |
| 3.8.1 Charakterisierung der Zelllinie HPESC560..... | 49 |
| 3.8.2 Effekt von IL1 α auf die Expression von CD26 in HPESC560..... | 49 |
| 3.8.3 Expression von CD26 unter Stimulation von HPESC560 mit Diprotin A und IL1 α | 51 |
| 4. Diskussion | 53 |
| 4.1 Effekt von Östrogen und Progesteron auf den TEER in eCRC560..... | 53 |
| 4.2 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die Expression von ZO1 in eCRC560 | 55 |
| 4.3 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die Migration und Invasivität von eCRC560..... | 57 |
| 4.4 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die Sekretion von MMP7 in eCRC560 | 59 |
| 4.5 MMP7 in der Pathogenese der Endometriose | 61 |
| 4.6 Die Expression von CD26 in HPESC560..... | 65 |
| 4.6.1 Effekt von IL1 α und Diprotin A auf die Expression von CD26 in HPESC560 | 66 |
| 4.7 Stärken und Limitationen dieser Arbeit | 67 |
| 4.8 Fazit | 68 |
| 5. Zusammenfassung..... | 70 |
| 6. Summary | 71 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis..... | 72 |
| 8. Abbildungsverzeichnis | 74 |
| 9. Tabellenverzeichnis | 75 |
| 10. Literaturverzeichnis..... | 76 |
| 11. Publikationsverzeichnis | 98 |
| 12. Ehrenwörtliche Erklärung | 99 |
| 13. Danksagung..... | 100 |

1. Einleitung

1.1 Endometriose

Endometriose ist eine Erkrankung, bei welcher es zu einer Absiedelung von Endometrium-Gewebe in den Bauchraum, aber auch in einigen Fällen in uterusferne Organe kommt. Am häufigsten sind hierbei die Ovarien, das pelvine Peritoneum, die Harnblase, der Darm und das rekto-vaginale Septum betroffen. Es kann jedoch auch zu einer Ausbreitung von Endometriose-Herden in Gehirn, Leber, Pleura, Perikard, Knochen oder Haut kommen (Vercellini et al. 2014; Zondervan et al. 2018).

Die Endometriose-Läsionen enthalten Drüsen, Stromazellen, Blutgefäße und wenige glatte Muskelzellen. Das Hauptsymptom, an dem ein Großteil der Endometriose-Patientinnen leidet, sind starke Schmerzen während der Menstruation (Dysmenorrhoe) (Viganò et al. 2004), was auf die nervale Innervation der Läsionen zurückzuführen ist (Ebert 2019). Des Weiteren suchen viele Patientinnen aufgrund von Endometriose-bedingter Infertilität medizinische Hilfe auf.

Die weltweite Prävalenz für Endometriose bei Frauen in gebärfähigem Alter liegt bei 1-10% (Viganò et al. 2004; Ballard et al. 2008; Eisenberg et al. 2018). Als Gründe für die hohe Spannweite des Wertes, sind sowohl die sich in Studien unterscheidenden Patientengruppen als auch die Verwendung uneinheitlicher Methoden zur Diagnostik der Endometriose zu nennen (Buck Louis et al. 2011). Die Endometriose-Herde zeigen im Vergleich zu normotopem Endometrium vermehrte Proliferation, Migration und Invasivität, sowie Neovaskularisationen. Außerdem sind sie durch eine verminderte Apoptose gekennzeichnet (Ebert 2019).

1.1.1 Pathogenese der Endometriose

Eine der ersten Beschreibungen der Endometriose aus dem Jahr 1890 geht auf Karl von Rokitansky zurück (Ebert 2019). Es existieren mehrere Theorien zur Pathogenese der Erkrankung, jedoch konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein exakter Mechanismus zur Entstehung der Endometriose beschrieben werden (Vercellini et al. 2014). Das Konzept der retrograden Menstruation und die darauffolgende Implantation des Gewebes in andere Organe gilt als weitgehend akzeptierte Theorie und wurde von Sampson (1927) etabliert. Sampson beschreibt, dass es im Rahmen der Menstruation zu einem Reflux von endometrialen

Einleitung

Fragmenten über die Eileiter (tubae uterinae) in die Bauchhöhle und zu einer anschließenden Implantation dieses Gewebes an ektopen Orten kommt.

Aus neueren Studien geht jedoch hervor, dass die Prävalenz der Endometriose bei 1-10 % liegt, eine retrograde Menstruation aber bei > 70 % aller Frauen vorkommt (Halme et al. 1984; Zondervan et al. 2018). Des Weiteren kritisieren Alifano et al. (2006), dass durch Sampsons Theorie das Auftreten extra-pelviner Läsionen nicht hinreichend erklärt wird. Yovich et al. (2020) betonen jedoch, dass Sampson neben der bereits genannten Implantationstheorie, ebenfalls das Konzept der vaskulären Verbreitung von Endometriose-Herden als eine Möglichkeit der Verteilung nannte. Weiter untermauert werden konnte Sampsons Ansatz durch Shakiba et al. (2008), die ein geringeres Wiederauftreten von Endometriose-Läsionen nach Laparoskopie mit zusätzlicher Hysterektomie zeigen konnten. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das Vorhandensein von Endometrium der Hauptfaktor in der Entstehung von Endometriose ist.

Ein weiteres verbreitetes Konzept ist die Metaplasie-Theorie von Meyer (1924). Sie besagt, dass sich aus undifferenzierten Coelom-Zellen unter Einfluss von Stimuli, wie Hormonschwankungen, Inflammation oder Wachstumsfaktoren, Zellen mit ähnlicher Differenzierung entwickeln können, die zu Endometriose-Läsionen führen können (Ebert 2019).

Neben den genannten Theorien existieren außerdem der Ansatz der lymphatischen und vaskulären Dissemination von endometrialen Zellen (Javert 1952) und das Konzept der Implantation endometrialer Stammzellen von Sasson und Taylor (2008). Weitere Hypothesen sind die genetische/epigenetische Theorie von Koninckx et al. (2019), die Stamm-/Vorläuferzell-Theorie von Gargett et al. (2014) und das Tissue-Injury and Repair Konzept, welches die Hyperperistaltik des Uterus als Auslöser der Endometriose betrachtet (Leyendecker et al. 2004). Zusätzlich wurden ein fetaler Ursprung (Signorile et al. 2012), sowie ein Ursprung im Rahmen der Adoleszenz diskutiert (Brosens et al. 2016).

Die genannten Theorien werden ergänzt durch weitere Faktoren, wie die Veränderung der peritonealen Barriere (Young et al. 2013) oder auch Inflammation und oxidativer Stress (Samimi et al. 2019), die in der Genese der Endometriose eine Rolle spielen könnten.

1.1.2 Diagnostik und Behandlung der Endometriose

Bis heute stellt sich die Diagnostik der Endometriose als schwierig dar. Gründe hierfür sind die bereits erläuterte, noch zu einem Teil ungeklärte Pathogenese, aber auch die Heterogenität der Erkrankung (Chapron et al. 2019). Aktuell sind drei Haupttypen der pelvinen Endometriose bekannt. Diese entsprechen der klinischen (intraoperativen) Einteilung: die ovarielle Endometriose, die peritoneale Endometriose und die tief infiltrierende Endometriose (Zondervan et al. 2018).

Die Symptome der Endometriose sind divers. Es können neben Schmerzen bei der Menstruation (Dysmenorrhoe), dem Geschlechtsverkehr (Dyspareunie), beim Wasserlassen (Dysurie) oder dem Stuhlgang (Dyschezie) auch psychische Auffälligkeiten, wie depressive Verstimmungen (Ebert 2019) auftreten. Ein weiteres Symptom, welches Frauen medizinische Hilfe aufsuchen lässt, ist die Endometriose-assoziierte Infertilität.

Die Diagnostik der Endometriose umfasst primär eine ausführliche ärztliche Anamnese, die unterstützend mittels Fragebogen erfolgen kann (Konrad et al. 2023). Außerdem sollte eine Palpation des Abdomens und des Beckens durchgeführt werden (Rolla 2019). Ein Test, der in Zukunft relevant werden könnte, ist der Endotest® des französischen Unternehmens Ziwig®. Dieser Test soll Endometriose-spezifische Mikro-RNA im Speichel nachweisen (Ferrier et al. 2023). Die Bildgebungen mittels (transvaginalem) Ultraschall, Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT) unterscheiden sich je nach Lokalisation der Endometriose in ihrer diagnostischen Güte (Rodriguez et al. 2017), wobei das CT aufgrund der hohen Strahlenbelastung nur bei einer sehr geringen Zahl an Patientinnen eingesetzt wird (Hoyos et al. 2017).

Als Goldstandard der Endometriose-Diagnostik gilt die Laparoskopie als invasive Maßnahme, da Läsionen zuverlässig dargestellt und Biopsien entnommen werden können. Des Weiteren ist eine intraoperative Sanierung der Endometriose-Herde während der Laparoskopie möglich (Rolla 2019). Die laparoskopische Therapie stellt primär eine gute und effektive Behandlungsoption dar, jedoch kommt es im Verlauf häufig zu Rezidiven mit erneutem Auftreten von Schmerzen. Die Rezidivrate liegt bei über 20 % nach zwei und bei 40 - 50 % nach fünf Jahren (Guo 2009).

Neben der Therapie mittels Laparoskopie gibt es weitere nicht-invasive Therapieansätze. Hier ist die hormonelle Therapie mittels Gestagenen wie Dienogest die erste Wahl in der Behandlung der Endometriose (Dt. Gesellschaft f. Gynäkologie u. Geburtshilfe e. V. 2020). Sie wird im Vergleich mit der hormonellen Suppression durch Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRH-Analoga) als besser verträglich und nebenwirkungsärmer beschrieben (Zito et al. 2014). Jedoch zeigt die Therapie in einem Drittel der weltweit behandelten Patienten kein ausreichendes Ansprechen (Donnez und Dolmans 2021).

1.2 Östrogen und Progesteron

Sowohl Östrogen als auch Progesteron zählen zu den Steroidhormonen. Diese Hormone leiten sich vom Cholesterin ab und sind daher lipophil. Östrogene entstehen durch die Aromatase-Reaktion aus Androgenen, während Progesteron als Zwischenstufe bei der Synthese der meisten Steroidhormone gebildet wird. Im Blut werden Östrogene an Sexualhormon-bindendes-Globulin (SHBG) oder Albumin gebunden. Progesteron wird an Transcortin gebunden transportiert (Rassow et al. 2022).

Das potenteste Östrogen im menschlichen Körper ist 17- β -Estradiol (E2), welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Des Weiteren existieren Östron (E1) und Östriol (E3) (*Abbildung 1*).

E2 wird bei prämenopausalen Frauen vornehmlich in den Ovarien synthetisiert. Östrogene regulieren viele physiologische Prozesse wie Zellwachstum, Reproduktion und Entwicklung. Sie spielen jedoch auch eine Rolle in einigen pathologischen Prozessen wie Krebs, dem Metabolischen Syndrom, kardiovaskulären Erkrankungen und auch in der Östrogen-abhängigen Erkrankung Endometriose (Jia et al. 2015).

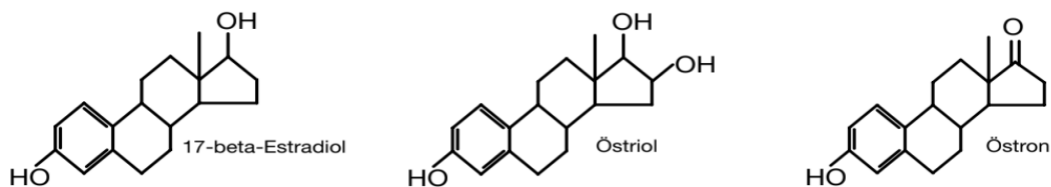


Abbildung 1: Darstellung der Strukturformeln von 17- β -Estradiol, Östriol und Östron

1.2.1 Synthese von Östrogenen

Wie bereits erwähnt, werden Steroidhormone und damit auch Östrogen aus Cholesterol synthetisiert und über verschiedene Zwischenstufen in Androstendion und Testosteron überführt. Durch die Aromatisierung des Östran-Ringes dieser Hormone, also die Umwandlung des Ringes in eine Aromastuktur, entstehen Östron beziehungsweise Östradiol. Das hierfür verantwortliche Enzym P450-Aromatase wird in Endometriose-Herden verstärkt exprimiert (Kitawaki et al. 1997; Bulun et al. 2004) und sorgt in diesem Gewebe für lokal erhöhte Östrogen-Spiegel (Huhtinen et al. 2012). Die Aktivität der Aromatase in Endometriose-Herden wird außerdem nicht, wie in den Gonaden durch das Follikel-stimulierende-Hormon (FSH) reguliert, sondern ist unabhängig von physiologischen Reizen (Zeitoun und Bulun 1999). Ein weiteres Hormon, das in Endometriose-Herden verändert exprimiert wird, ist die 17- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (HSD17B2). Dieses Enzym sorgt für die Umwandlung des biologisch hochpotenten E2 in weniger potentes E1. Im Gegensatz zu eutopem Gewebe ist Progesteron in ektopen Endometriose-Herden nicht in der Lage, die Expression von HSD17B2 zu induzieren, was ebenfalls zu einer verstärkten Östrogen-Wirkung beiträgt (Bulun et al. 2010).

1.2.2 Östrogen-Signaltransduktion

Der klassische Signalweg des Östrogens verläuft ligandenabhängig. 17- β -Estradiol bindet an den Östrogenrezeptor (ER). Hiervon existieren die zwei Unterformen ER α und ER β . (Cleve et al. 2012). Nach Bindung des Liganden kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors, der sich dann in den Zellkern verlagert. Dort fungiert der ER entweder direkt als Transkriptionsfaktor oder agiert indirekt, indem er an Estrogen-Response-Elemente (EREs) bindet. Über die Bildung von Komplexen mit Co-Aktivatoren und Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) kann ebenfalls die Transkription reguliert werden (Vrtačnik et al. 2014). Des Weiteren existieren Transkriptionsfaktoren, wie das Spezifitätsprotein 1 (SP1) und das Aktivierende-Protein 1 (AP1), mit welchen der ER ebenfalls interagieren kann. Diese Faktoren binden ihrerseits an Serum-response-Elemente (SRE) und beeinflussen hierüber die Transkription (Saville et al. 2000).

Ligandenunabhängig verläuft die Aktivierung des ER über Rezeptor-Tyrosinkinasen. Hierzu zählen der Insulin-like-growth-factor-receptor (IGFR), der epidermale

Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) oder der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2). Durch Aktivierung von Serin/Threonin-Kinasen kommt es zu einer Phosphorylierung des ER, der hierdurch erneut in den Zellkern wandert und dort als Transkriptionsfaktor agiert (Kato et al. 1995).

Der letzte Weg, über den die Östrogen-Signaltransduktion verläuft, involviert eine Aktivierung über den G-Protein gekoppelten Rezeptor 30 (GPR 30). Die Aktivierung dieses Rezeptors führt über Zwischenschritte zu einer weiterführenden Signaltransduktion über EGFR und den Mitogen-Activated-Protein-Kinasen (MAPK)-Signalweg (Filardo 2002; Chatterjee et al. 2018).

1.2.3 Aufbau und Funktion von ER α und ER β

Östrogene haben eine entscheidende Rolle in den zellulären Prozessen, die zur Entwicklung und Aufrechterhaltung physiologischer Körperfunktionen beitragen (Hall 2011). Hierfür interagieren sie mit vielen verschiedenen Geweben. Die Wirkung der Östrogene wird, wie oben beschrieben, zu einem großen Teil über die Östrogenrezeptoren vermittelt (Cleve et al. 2012). Die Art der Östrogen-Wirkung ist davon abhängig ob und welche Östrogenrezeptoren das jeweilige Gewebe exprimiert (Morissette et al. 2008). Die Östrogenrezeptoren werden kodiert durch die zwei verschiedenen Gene ESR1 und ESR2. Ihre Ähnlichkeit in der DNA-Bindungsdomäne liegt bei 96 % und die der Liganden-Bindungsdomäne bei 56 % (Mosselman et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von ESR1 in eutopem Endometrium durch Estradiol reguliert wird. ER α ist in diesem Gewebe der vorherrschende Rezeptor. Hierüber erfolgt auch eine Stimulation der Synthese von Progesteronrezeptoren. Gleichzeitig erfolgt durch ER β eine Suppression der ESR1-Expression (Chen et al. 2020). Dieser Umstand ist vor allem in endometriotischem Gewebe relevant, da dort vermehrt ESR2 exprimiert wird (Taraborrelli 2015). ESR2 wird durch verschiedene Promotoren reguliert, die sich je nach Gewebe unterscheiden. Dieses betrifft ebenso normotopes wie auch ektopes Endometrium-Gewebe (Dyson et al. 2015).

1.2.4. Progesteronrezeptoren

Progesteron ist ein Gestagen und der wichtigste Vertreter dieser Hormongruppe. Durch Progesteron kommt es unter anderem zum Umbau des Uterusgewebes als Vorbereitung auf die Nidation einer befruchteten Eizelle. Bei Absinken des

Progesteron-Spiegels folgt in der Regel ein Schwangerschaftsabbruch (Rassow et al. 2022).

Die Wirkung des Progesterons wird über die intrazellulären Progesteronrezeptoren PR-A und PR-B vermittelt. Diese werden, anders als die ERs, von demselben Gen kodiert. Sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Promoter und Translationsstellen (Chen et al. 2020), wobei PR-B an seinem N-terminalen Ende zusätzlich 165 Aminosäuren besitzt (Bain et al. 2000). Die Bindung von natürlichem oder synthetischen Progesteron an die Liganden-Bindungsstelle des PR führt zur Bildung eines Progesterin-Komplex-PR-Dimers, der mit spezifischen Progesteron-Response-Elements (PREs) in Zielgenen interagiert und diese so reguliert (Chen et al. 2020). Der Effekt von Progesteron auf die Transkription bestimmter Gene wird hauptsächlich über den PR-B vermittelt. Der PR-A hingegen hat vor allem eine supprimierende Wirkung auf den PR-B (Kurita et al. 2000). Auch hier zeigt sich erneut ein Unterschied der PR-Expression in eutopem und ektopem Endometrium-Gewebe. Wu et al. (2006) konnten beobachten, dass PR-A in Endometriose-Läsionen und auch in eutopem Endometrium von Frauen mit Endometriose erhöht exprimiert wird, während die Protein-Spiegel von PR-B sehr niedrig ausgeprägt sind.

1.3 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie zinkabhängiger Endoproteasen und am Umbau und der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix beteiligt. Sie fördern unter anderem die Proliferation und Migration von Zellen. Des Weiteren sind sie in der Lage, Einfluss auf verschiedene Signalwege zu nehmen. Veränderungen der MMP-Expression können Teil physiologischer Prozesse, wie einer Schwangerschaft oder der Wundheilung sein. Jedoch können auch Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Osteoporose mit einer Veränderung der MMP-Expression einhergehen. Ebenfalls konnte ein Zusammenhang mit der Progression von Tumoren gezeigt werden (Cui et al. 2017). Des Weiteren spielen MMPs auch eine Rolle in der Initiierung der Menstruation, wie von Marbaix et al. (1996) gezeigt werden konnte.

In Wirbeltieren sind 28 Mitglieder der MMP-Familie bekannt. Mindestens 23 dieser MMPs kommen auch in humanem Gewebe vor. MMPs werden klassischerweise anhand ihrer Substrate und ihrer strukturellen Domänen unterschieden. Sie werden

von unterschiedlichen Geweben und Zellen synthetisiert. Hierzu zählt das Bindegewebe, pro-inflammatorische Zellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Leukozyten, aber auch Fibroblasten und Epithelzellen des Uterus oder der Plazenta. Die Proteasen werden entweder durch Sekretion an die Umgebung der Zellen abgegeben oder können an der Zellmembran verankert werden (Cui et al. 2017).

1.3.1 Matrix-Metalloproteinase-7

Die kleinste Matrix-Metalloproteinase der MMP-Familie ist die Matrix-Metalloproteinase-7 (MMP7). Sie wird auch als Matrilysin bezeichnet und ist eine zink- und calciumabhängige Endopeptidase (Muller et al. 1988). MMP7 unterscheidet sich von den anderen MMPs, indem sie zwar dieselben vier MMP-charakteristischen Regionen besitzt, die C-terminale Hämoglobin-Domäne jedoch fehlt (Gaire et al. 1994). Sie wird als einzige Matrix-Metalloproteinase physiologischerweise nur von endometrialem Epithel und nicht von anderen endometrialen Geweben exprimiert (Ke et al. 2021). Des Weiteren kommt sie in dermale, bronchiale, urogenitale und gastrointestinale Gewebe vor, kann im Rahmen von kanzerogenen oder fibrotischen Erkrankungen, aber auch in anderen Geweben vermehrt exprimiert werden (Adachi et al. 1999; Ii et al. 2006). MMP7 sorgt wie die meisten MMPs für die Degradierung der extrazellulären Matrix (EZM), sie spaltet aber auch Proteine wie E-Cadherin, die nicht Teil der EZM sind (McGuire et al. 2003; Ii et al. 2006). Hierdurch spielt MMP7 eine Rolle in der Regulierung von Prozessen, die Alterung, Wundheilung und das Knochenwachstum betreffen. Ebenfalls werden durch MMP7 Signalwege der Zellproliferation, der Inflammation und der Angiogenese beeinflusst (Jung et al. 2010; Kessenbrock et al. 2010).

MMP7 fördert außerdem die Tumorgenese, indem sie die Apoptose von Krebszellen verhindert (Wang et al. 2006), die Zell-Adhäsion verringert und die Vaskularisierung induziert (Ii et al. 2006).

1.4 Wundheilung

Die Haut stellt eine natürliche Barriere des Körpers dar und schützt vor Umwelteinflüssen. Deshalb ist es essenziell, dass nach einer Verletzung, diese Barriere so schnell wie möglich wiederhergestellt wird. Die Gewebszerstörung oder

der Verlust von Gewebe der Haut und Schleimhaut werden generell als Wunde bezeichnet. Der Verschluss einer Wunde kann über zwei, sich im Mechanismus und Endergebnis unterscheidende Prozesse ablaufen: Regeneration und Reparatur. Bei der Regeneration kommt es dazu, dass das beschädigte Gewebe durch das Ausgangsgewebe ersetzt wird, sodass nach Abschluss der Wundheilung kein Unterschied zu dem umliegenden Gewebe besteht (Restitutio ad integrum) (Schmidt et al. 2017).

Die Fähigkeit zu dieser Wundheilung besitzen vor allem die Epidermis und Schleimhäute. Bei den meisten anderen Wunden kommt es jedoch nicht zu einer vollständigen Regeneration des Gewebes. Die Reparatur ist gekennzeichnet durch den Ersatz des Ausgangsgewebes durch Narbengewebe (Schmidt et al. 2017). Dieses Narbengewebe stellt in einem Großteil der Fälle die Funktion des Gewebes wieder her, es bleibt jedoch ein Unterschied zwischen der Narbe und dem restlichen Gewebe sichtbar, da die Narbe sich strukturell vom Ausgangsgewebe unterscheidet. Grund hierfür ist die unterschiedliche Anordnung der Kollagenfasern innerhalb der Narbe, die für eine geringere Elastizität der betroffenen Hautstelle sorgen. Des Weiteren verliert das Gewebe die Fähigkeit, Hautanhangsgebilde wie Talg- oder Schweißdrüsen auszubilden (Schmidt et al. 2017).

Der Prozess der Wundheilung wird in vier Phasen unterteilt: exsudative, resorptive, proliferative und reparative Phase. Diese Phasen laufen nicht vollkommen getrennt voneinander ab, sondern können sich überschneiden (Lippert und Altmann 2012). Die Exsudationsphase beinhaltet die initiale Blutung und die darauffolgende Blutgerinnung in den ersten Stunden nach dem Trauma. Die mit dem Blut aus dem Gewebe austretenden Bestandteile führen zu einem Wundverschluss. Die am ersten bis vierten Tag folgende Resorptionsphase beschreibt die Autolyse und Phagozytose des abgestorbenen Gewebes durch Granulozyten und eingewanderte Makrophagen. In der Proliferationsphase (dritter bis zehnter Tag) kommt es zu einer Einsprossung von Blutgefäßen, um die sich Fibroblasten versammeln. Es entsteht ein gut vaskularisiertes Granulationsgewebe. In der anschließenden Reparationsphase kommt es zur Ausbildung von Narbengewebe. Dieser Prozess findet ab dem siebten Tag nach Verletzung statt und kann mehrere Monate in Anspruch nehmen (Lippert und Altmann 2012).

1.4.1 Narbenbildung im Uterus

Zu einer Narbenbildung im Uterus kommt es nur in Ausnahmefällen. Die Menstruationsblutung, die durch die absinkenden Progesteron-Spiegel hervorgerufen wird, führt zu einer Degradation und Abstoßung von Teilen der Functionalisis des Endometriums. Anschließend kommt es zu einer Regeneration des Gewebes. Dieser Prozess läuft in relativ regelmäßigen Zyklen, in denen es nicht zu einer Befruchtung der Eizelle kommt, in einem Zeitraum von ungefähr 5 Tagen einmal im Monat ab (Garry et al. 2009). Es kommt also einmal im Monat zu einer Verwundung des Endometriums und einer Regeneration mit Wiederherstellung des Ausgangsgewebes ohne Narbenbildung (Critchley et al. 2020).

Es sind allerdings Fälle bekannt, in denen eine Narbenbildung auch im Endometrium stattfindet. Größtenteils lässt sich dieser Prozess im Rahmen von Kaiserschnitten (Sectio Caesarea) und anderen gynäkologischen Interventionen beobachten (Murji et al. 2022). Die Reaktion des Uterusgewebes auf iatrogene Verfahren wie Kürettagen mit Narbenbildung und die damit verbundene Bildung uteriner Adhäsionen ist als Asherman-Syndrom bekannt. Als Folge dieses pathologischen Prozesses, kommt es zu einer verminderten Regelblutung (Hypomenorrhoe), Infertilität und rekurrierenden Aborten (Liu et al. 2020). Das Asherman Syndrom tritt bei Frauen, die im ersten Trimester einen Schwangerschaftsabbruch durchführen ließen, in bis zu 13 % und im Rahmen einer Kürettage nach spätem Abort in bis zu 31 % der Fälle auf (Smikle et al. 2023). Durch die o.g. Eingriffe wird ein Teil der basalen Schicht des Endometriums abgetragen. Sind von dieser Abtragung opponierende Seiten des Uterus betroffen, kann es durch Inflammationsprozesse, die durch die vorliegende Verletzung ausgelöst werden, zu Verwachsungen und zur Ausbildung adhäsiver Bänder zwischen den betroffenen Gewebeabschnitten kommen. Die Ausprägung dieser Verwachsungen kann sich je nach Schwere der Erkrankung stark unterscheiden (Smikle et al. 2023).

1.4.2 CD26-positive Fibroblasten

(Dermale) Fibroblasten spielen eine große Rolle in der Wundheilung unterschiedlicher Gewebe. Während des Heilungsprozesses kommt es zu einer Proliferation und zu einem Einwandern der Fibroblasten in die Wundfläche (Ogawa, Rei (2020)). (Myo-)Fibroblasten gelten ebenfalls als mitverantwortlich für

pathologische Prozesse wie Organ- oder Gewebe-Fibrose (Wynn 2008; Wilson und Wynn 2009). Deshalb ist es naheliegend, die beteiligten Fibroblasten-Populationen genauer zu betrachten.

Rinkevich et al. (2015) transplantierten Fibroblasten aus kutanem Gewebe in die orale Schleimhaut. Ihre Ergebnisse zeigten, dass nicht nur die Umgebung Einfluss auf die Ausprägung der Narbenbildung hat, sondern auch die zelleigenen Charakteristika. Die transplantierten Fibroblasten führten in der oralen Schleimhaut, genau wie in ihrem Ursprungsgewebe zur Narbenbildung. Rinkevich et al. (2015) charakterisierten in diesem Kontext mehrere Fibroblasten-Linien, die verschiedene Rollen in der Entwicklung der Haut und der Reaktion auf chronische und akute Verletzungen haben. Die Studie beschreibt die Engrailed-1 (En1)-positive Fibroblasten-Linie, die verantwortlich für die Narbenbildung in der dorsalen Haut und auch in der oralen Schleimhaut ist. Des Weiteren gilt sie als Haupteffektor für die Bildung der EZM während der Wundheilung. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem genannten Zelltyp nicht um zirkulierende, sondern um lokale gewebständige Fibroblasten handelt. Identifiziert werden konnte En1 durch das Oberflächenprotein CD26 (Rinkevich et al. 2015). CD26 ist ein 110 kDa schweres Oberflächenprotein mit intrinsischer Dipeptidyl-Peptidase-4 (DPP4)-Aktivität (Inamoto et al. 2007). Die transmembrane Serin-Protease CD26/DPP4 spaltet von Substraten mit Prolin oder Alanin an vorletzter Position N-terminale Dipeptide. CD26/DPP4 wird von vielen Immunzellen wie T-Zellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und aktivierten B-Lymphozyten exprimiert und reguliert auch die T-Zell Aktivierung (Dang et al. 1990). Des Weiteren existiert eine katalytisch aktive lösliche Form von CD26/DPP4, die von der Plasmamembran freigesetzt werden kann (Chitadze et al. 2021). Viele Peptide kommen als Substrat für CD26/DPP4 infrage und werden von dem Enzym inaktiviert (Cordero et al. 2009). Durch diesen Mechanismus partizipiert CD26 an einigen physiologischen Prozessen des Organismus wie Migration, Adhäsion, Invasivität, Apoptose und Immunmodulation (Beckenkamp et al. 2016).

Des Weiteren besitzt CD26 auch nicht-enzymatische Fähigkeiten. Es fungiert als wichtigstes Protein für die zelluläre Bindung der Ekto-Amino-Deaminase (eADA), die für den Abbau von Adenosin verantwortlich ist (Dong et al. 1996). Außerdem interagiert CD26 mit extrazellulären Matrix-Proteinen, wie Fibronectin und Kollagen (Cheng et al. 2003) und partizipiert an Signalwegen unter anderem in

Verbindung mit der Serin-Protease Fibroblasten-Aktivierungsprotein-alpha (FAP- α) und dem Chemokin-Rezeptor CXCR4.

Wie im Proteinatlas (www.proteinatlas.org) dargestellt, wird CD26 in den endometrialen Fibroblasten nicht exprimiert. Dieser Umstand könnte einen Hinweis auf die Ursache der geringen Tendenz des Uterus zur Narbenbildung darstellen. Diese Arbeit beschäftigt sich außerdem mit der Frage, ob es möglich ist, die Expression von CD26 in endometrialen Fibroblasten zu induzieren, um besser zu verstehen, weshalb es unter bestimmten Umständen doch zu einer Ausbildung von Narben in uterinem Gewebe kommt.

1.5 Die Interleukin-1-Familie

In dieser Arbeit wurde versucht, die Expression von CD26 in endometrialen Fibroblasten mittels Interleukin-1 α (IL1 α) zu induzieren. Mitglieder der IL1 Zytokin-Familie zählen zu den Hauptregulatoren der Inflammation und bestehen aus 11 Zytokinen. Die IL1-Familie ist vor allem mit der angeborenen Immunantwort assoziiert (Dinarello 2018). Ein Hauptmechanismus dieser angeborenen Immunantwort ist die Inflammation, welche vordergründig die Abwehr von Erregern zum Ziel hat. Jedoch kann eine unkontrollierte Inflammation ebenso schädlich für den Organismus sein und ihn gefährden. Neben der angeborenen Immunantwort spielen Mitglieder der IL1-Familie auch eine Rolle in der Beeinflussung von T-Zell-Funktionen und sind so ebenfalls an der erworbenen Immunantwort beteiligt (Yazdi und Ghoreschi 2016).

1.5.1 Interleukin-1 α

Interleukin 1 α (IL1 α) wird durch Sekretion aus der Zelle freigesetzt und wirkt an seinem zugehörigen Rezeptor agonistisch (Dinarello 2018). IL1 α bindet genau wie IL1 β an den IL1-Rezeptor-1 (IL1-R1) und induziert dieselben proinflammatorischen Effekte. Diese inkludieren unter anderem die Aktivierung von nukleärem-Faktor- κ B (NF- κ B), Aktivator-Protein-1 (AP-1), der c-Jun-N-terminalen-Kinase, der Mitogen-assoziierten-Kinase (MAPK) und extrazellulär-regulierten-Kinasen (ERKs). Über diese Signalkaskaden und durch weitere Mediatoren, wie Chemokine und Prostaglandine, wird die Immunantwort beeinflusst (Dinarello 2009). Zusätzlich werden Adhäsionsproteine in

Endothelzellen exprimiert, die eine verbesserte Migration von Immunzellen in das umliegende Gewebe ermöglichen (Dinarello 2009).

1.5.2 Regulation von IL1 α

IL1 α wird in vielen verschiedenen Zellen konstitutiv exprimiert. Der größte Teil findet sich jedoch in Epithel- und Endothelzellen. Gesteigert werden kann die Expression durch Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorische Stimuli (Rider et al. 2012; Garlanda et al. 2013; Bersudsky et al. 2014). IL1 α wird in ein 31 kDa schweres Vorläuferprotein translatiert, welches bereits eine biologische Aktivität besitzt (Kim et al. 2013; Malik und Kanneganti 2018). Innerhalb der Zelle erfolgt die Kontrolle und Regulation des IL1 α -Vorläuferproteins durch den Interleukin-1-Rezeptor 2 (IL1-R2), der das Zytokin bindet, aber keine pro-inflammatorischen Signale weiterleitet (Zheng et al. 2013; Molgora et al. 2018). Nach der Sekretion kann IL1 α sofort an den Interleukin-1-Rezeptor 1 (IL1-R1) binden und hierüber seine biologischen Effekte vermitteln. Zu einer Expression von IL1 α auf der Zelloberfläche kommt es in Folge von oxidativem oder metabolischem Stress (Cavalli et al. 2021). Dadurch, dass IL1 α in vielen Zellen konstant in aktiver Form vorhanden ist, fungiert es im Rahmen von Nekrosen unterschiedlicher Genese als Alarmin. Es bindet bei Verlust der membranösen Integrität einer Zelle im Extrazellularraum an IL1-R1, worüber die Entzündungsreaktion mediiert wird (Kim et al. 2013).

1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit

Endometriose ist bis heute eine unterdiagnostizierte Erkrankung, die das Leben vieler Frauen in großem Maße beeinträchtigt. Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Erkenntnisse über die Pathogenese der Endometriose zu erlangen. Durch die Stimulation endometrialer Zellen mit Steroidhormonen soll untersucht werden, inwiefern die Beschaffenheit von Zell-Zell-Kontakten durch die Anwesenheit von Progesteron oder Östrogen beeinflusst wird. Sollte es zu einer Veränderung dieser Zell-Zell-Kontakte kommen, könnte das einen Hinweis darauf geben, welche Auswirkungen unterschiedliche Hormon-Spiegel auf das Endometrium haben. Es wird zudem untersucht, ob die Hormone Einfluss auf die Migration und Invasivität humaner endometrialer Epithelzellen haben, was zu einer vermehrten Ausbreitung und Vergrößerung von Endometriose-Herden beitragen könnte.

Einleitung

Des Weiteren sollen die Auswirkungen von Östrogen und Progesteron auf die Sekretion von MMP7 in den endometrialen Zellen beobachtet werden. Durch eine Veränderung des MMP7-Spiegels können viele Signalwege beeinflusst werden, die möglicherweise auch im Rahmen der Endometriose eine Rolle spielen. Diese Arbeit soll weitere Erkenntnisse liefern, um die Pathogenese der Endometriose noch besser zu verstehen.

Die Experimente sollen außerdem Hinweise darauf geben, wie hormonelle Präparate in der Therapie der Endometriose und assoziierter Beschwerden wirken, um eine Grundlage für die Optimierung vorhandener Therapiekonzepte zu schaffen.

Ein weiteres Ziel, das in dieser Arbeit verfolgt werden soll, ist die Induktion von CD26 in humanen endometrialen Fibroblasten. CD26 ist mit der Narbenbildung assoziiert und normalerweise in den genannten Zellen nicht vorhanden. Erkenntnisse aus diesen Versuchen sollen dabei helfen, die Pathogenese der Narbenbildung im Uterus besser zu verstehen und Hinweise auf eine mögliche Prävention liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

| Name: | Hersteller: |
|--|--|
| Acrylamid (AA) | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Aqua | B.Braun, Melsungen, Deutschland |
| Blue Loading Buffer | Cell Signaling Technologies, Frankfurt a M., Deutschland |
| Der Bunte Tobias | grp GmbH, Haag a.d. Amper, Deutschland |
| ECL Western Blot Detektions-Lösung | GE Healthcare, München, Deutschland |
| Ethanol $\geq 99,8\%$ | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Glycin Pufferan® $\geq 99,9\%$, p.a. | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Halt™ Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (100X) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| LDS-Sample Buffer, nicht reduzierend | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| PBS-Tabletten | Gibco® (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| Precision Red Protein Assay Reagenz | Cytoskeleton Inc., Denver, USA |
| Protease Inhibitor Single-Use Cocktail Halt™ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Protein Assay Reagenz | Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland |
| Milchpulver | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid (NaOH) | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Natriumdodecylphosphat (SDS) | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin (TEMED) | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| ROTI®Free Stripping-Puffer 2.2 plus | CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| SignalFire™ ECL Reagent | Cell Signaling Technologies, Frankfurt a. M., Deutschland |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| TBS - Tween™ Tabletten | Medicago AB, Uppsala, Schweden |
| TRIS Pufferan® ≥99,9%, p.a. | CARL ROTH GmbH CO.KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tween 20 | AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland |

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

| Name: | Hersteller: |
|--|--|
| Chemielumineszenz Maschine Fusion Pulse | Vilber, Lourmat, Eberhardzell, Deutschland |
| Glasplatten | Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland |
| Laborwaage (DeltaRange) | Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland |
| Laborwaage | Sartorius Lab Instruments GmbH und Co.KG, Göttingen, Deutschland |
| Lichtmikroskop (AE 31) | Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Nitrozellulosemembran | Whatman GmbH, Dassel, Deutschland |
| Magnetprüher (MR 3001) | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland |
| Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (HERAsafe) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

| | |
|---|---|
| Mikroplatten Reader (TECAN Infinite M200) | TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland |
| Parafilm M® Laboratory Film | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, U.S.A. |
| Pipettierhilfe (Accu jet pro) | Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Pipetten Eppendorf (10µl, 100µl, 1000µl) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Sonoplus™ Ultraschall-Homogenisator | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland |
| Spannungsquelle (PowerPac™ Basic power supply) | Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland |
| TC Automated Cell Counter | Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland |
| Thincert 0,4µm translucent (6-Well, 12-Well) | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| Thermo-Shaker PHMT | Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Shepreth, Großbritannien |
| Trans-Blot® Turbo™ Transfer System | Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland |
| Vortexmischer (Polymax 1040) | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland |
| Zellkultur-Einsätze, Porengröße 8µm (24-Well) | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A. |
| Zellkulturflaschen (75cm², 150cm²) | TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz |

2.1.3 Zellkulturreagenzien

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturreagenzien

| Name: | Hersteller: |
|---|--|
| DMEM 4.5 g/L high glucose | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| DMEM/F12 | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| Fötales Kälberserum (FBS) | Bio&Sell GmbH, Feucht, Deutschland |
| Gefriermedium Recovery™ Cell Culture Freezing Medium | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |

| | |
|--|--|
| L-Glutamin | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| Insulin | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |
| Trypan Blue Dye | Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland |
| TrypLE™ Express 1x | Gibco (Life Technologies), Schwerte, Deutschland |

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper

| Antikörper: | Katalog-Nr.: | Hersteller: |
|-----------------------|---------------------|---|
| Anti-CD26 | AF1180 | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland |
| Anti-CK19 | NB100-687SS | Novus Biologicals, Wiesbaden, Deutschland |
| Anti-Claudin-1 | NBP1-67515 | Novus Biologicals, Wiesbaden, Deutschland |
| Anti-CD26 | AF1180 | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland |
| Anti-GAPDH | 2118 | Cell Signaling Technologies, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Anti-ZO1 | 617300 | Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA |

Tabelle 5: Verwendete sekundäre Antikörper

| Antikörper: | Katalog-Nr.: | Hersteller: |
|--------------------|---------------------|---|
| Anti-Rabbit | 7074 | Cell Signaling Technologies, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Anti-Mouse | 7076 | Cell Signaling Technologies, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Anti-Goat | HAF109 | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland |

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Immunfluoreszenz-Antikörper

| Antikörper: | Katalog-Nr. | Hersteller: |
|--|--------------------|---|
| Donkey Anti-Rabbit (Alexa Fluor® 555) | A-31570 | Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA |

2.1.5 Stimulanzen und Inhibitoren

Tabelle 7: Verwendete Stimulanzen und Inhibitoren

| Name: | Katalog-Nr.: | Hersteller: |
|-----------------------|---------------------|---|
| Dienogest | SML1468 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Diprotin A | ALX-260-036 | Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland |
| 17-β-Estradiol | E8875 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Interleukin-1α | 200-LA/CF | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland |

2.1.6 ELISA-Sets

Tabelle 8: Verwendete ELISA Sets

| Name: | Spezies: | Katalog-Nr.: | Hersteller: |
|---------------------|-----------------|---------------------|---|
| MMP7 Duo Set | Mensch | DY907 | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland |

2.1.7 Puffer

Tabelle 9: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung

| Bezeichnung: | Zusammensetzung: |
|--------------------------|---|
| Lämmli Laufpuffer (pH 8) | 25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS |
| Transferpuffer (1x) | 192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 20 % Methanol |

2.2 Verwendete Zelllinien

2.2.1 eCRC560

Die eCRC560 sind eine humane endometriale Epithelzelllinie, die im Labor der Gynäkologie des Universitätsklinikums Gießen (UKGM) aus Uterusgewebe isoliert wurde. Die Zellen entstammen dem normotopen endometrialen Epithel einer 45-jährigen Frau und wurden im Rahmen einer laparoskopischen Hysterektomie bei bekannter Endometriose und einem Leiomyom gewonnen. Die Patientin erhielt im Vorfeld der Operation keine hormonelle Therapie. Die Isolation und die konditionale Reprogrammierung der Zellen wurde entsprechend dem Protokoll von Riaz et al. (2024) durchgeführt.

Die Kultivierung erfolgte in DMEM supplementiert mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin. Inkubiert wurden die Zellen im befeuchteten Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂). Ein Wechsel des Mediums wurde alle drei Tage durchgeführt.

2.2.2 HPESC560

Bei den HPESC560 handelt es sich um eine humane endometriale Stromazelllinie. Sie wurde analog zu den bereits vorgestellten eCRC560 im Labor (Gynäkologie UKGM) aus endometrialem Epithel isoliert. Die Zellen entstammen ebenfalls der oben genannten Patientin und wurden in derselben Operation gewonnen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM/F12 supplementiert mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % ITS (Insulin, Transferrin, Selen) im befeuchteten Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂). Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle drei Tage.

2.3 Zellbiologische Standardmethoden

2.3.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Flüssigstickstoff bei -120 °C. Um diese aufzutauen, wurden sie im Kryoröhrchen für 30 Sekunden im Wasserbad erwärmt und anschließend in ein vorbereitetes Röhrchen mit ca. 7 ml des vorgewärmten entsprechenden Mediums transferiert und anschließend bei 300 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen erneut in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Um die Zellen einzufrieren, wurden sie zunächst mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde im Wasserbad bei 37 °C erwärmtes 1x TrypLE™ Express hinzugegeben und je nach Zelllinie für 5 – 15 Minuten inkubiert. Der hierdurch initiierte Lösungsprozess wurde im Anschluss mit derselben Menge Medium abgestoppt und die Zellen in ein Röhrchen überführt. Diese wurde bei 300 xg für 5 Minuten zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes, mit Recovery™ Cell Culture Freezing Medium von Gibco resuspendiert. Es wurden ca. 1 – 1,5 x 10⁶ Zellen/ml in ein Kryoröhrchen gegeben. Diese wurden dann für 24 h, in einer mit Isopropanol gefüllten Box, bei -80 °C, aufbewahrt und im Anschluss in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zunächst wurden die Zellen, wie oben bereits beschrieben, von der Kulturplatte gelöst. Im nächsten Schritt wurden die Zellen 5 Minuten bei 300 xg zentrifugiert und in PBS oder dem jeweiligen Medium resuspendiert. 15 µl der Suspension wurden mit 15 µl Trypan-Blau gemischt und hiervon jeweils 10 µl auf eine Seite einer Zählplatte gegeben. Diese Platte wurde im Anschluss in das Zell-Zählgerät (TM Automated Cell Counter) eingeführt. Das Zählgerät erkennt die abgestorbenen Zellen, in welche das Trypanblau eindringen konnte und die lebendigen Zellen, die kein Trypanblau aufnehmen und errechnet daraus die Konzentration an Zellen pro Milliliter.

2.3.3 Passagieren der Zellen

Sobald die Zellen eine 90-prozentige Konfluenz erreicht hatten, wurde ihre Adhäsion an der Zellkulturflasche gelöst (2.3.1). Die Zellsuspension wurde anschließend, nach Zugabe des Mediums zum Abstoppen, zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes in dem jeweiligen Zellmedium resuspendiert. Hierbei wurden pro vorbereiteter Zellkulturflasche 10-20 ml Medium verwendet. Anschließend wurde die Suspension im gleichen Verhältnis auf die bereits mit Medium im Inkubator vorgewärmten Flaschen verteilt.

2.4 Durchführung der Experimente

2.4.1 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Stimulanzen in indirekter Kokultur

Für die in indirekter Kokultur durchgeführten Experimente wurden die endometrialen Epithelzellen eCRC560 und die Stromazelllinie HESC560 verwendet. In 6-Well-Platten wurden je Well 200.000 eCRC560 gesät. Darüber wurde ein lichtdurchlässiger Filter mit der Porengröße 0,4 µm gesetzt. In diese Filter wurden 200.000 HPESC560 gesät (**Abbildung 2**). Das Medium, mit welchem in dieser Versuchsreihe gearbeitet wurde, war ein Mix aus DMEM/F12 und DMEM, supplementiert mit ihren jeweiligen Zusätzen (**2.2.1/2**) und 10 % FCS, welche in einem Verhältnis von 1:1 gemischt wurden. Es wurden jeweils 2 ml je Well und Filter verwendet. Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h Stunden wurde das Medium der Zellen entfernt und sowohl die Wells als auch die Filter mit PBS gewaschen. Anschließend wurde reduziertes ‘‘Hunger‘‘-Medium mit einem FCS-Anteil von 1 % hinzugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Hierbei wurde ebenfalls ein Mix aus reduziertem DMEM/F12 und DMEM verwendet.

Nach weiteren 24 h erfolgte die Stimulation der Zellen mit den verschiedenen Hormonen. Zum Einsatz kamen hier entweder die Trägersubstanz Ethanol oder die Hormone 17-β-Estradiol (E2) sowie das synthetische Gestagen Dienogest von Sigma Aldrich. Die Zellen wurden entweder mit Dienogest (10, 50, 100 nM) vorbehandelt und 2 h später mit E2 (10, 20, 50 nM) stimuliert oder erhielten nur eines beziehungsweise keines der genannten Hormone, sondern nur die Trägersubstanz Ethanol in der entsprechenden Dosierung. Die Stimulation erfolgte für einen Teil der Zellen über 24 h und für den anderen Teil über 48 h. Die Kollektion der Proben und Überstände erfolgte nach 96 h wie in **2.4.2** geschildert.

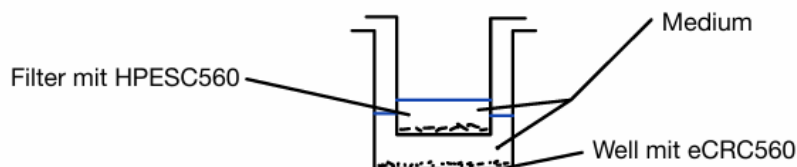


Abbildung 2: Aufbau der indirekten Kokultur aus eCRC560 und HPESC560

2.4.2 Kollektion der Proben für Western Blot und ELISA

Nach insgesamt 96 h wurden die Proben gesammelt. Hierzu wurde 1 ml des Überstandes je über und unter dem Filter in die Reaktionsgefäße pipettiert und in einer gekühlten Zentrifuge bei -4 °C und 14000 xg für 15 Minuten zentrifugiert. Hiervon wurde der Überstand für die nachfolgenden ELISAs bei -20°C eingefroren. Das verbliebene Medium wurde entfernt und verworfen. Die Wells wurden anschließend je 2x mit 2 ml PBS gewaschen. In die Wells wurde nun 500 µl 1x TrypLE™ Express zum Ablösen der Zellen gegeben und diese anschließend für 5 Minuten inkubiert. Der Ablösungsprozess wurde dann mit 500 µl Medium mit 10 % FCS abgestoppt, die Suspension in die Reaktionsgefäße gegeben und bei -4 °C und 700 xg für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand der Zellen wurde entfernt, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und danach gezählt. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert, nach Entfernen des Überstandes mit 110 µl eiskaltem Lyse Puffer gemixt und für 10-20 Minuten auf Eis gestellt. Alternativ konnte zu den Zellen auch bereits in den Wells Lyse-Puffer hinzugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst werden. Die Proben wurden anschließend mithilfe eines Vortex-Mischers gemischt und mit einem Ultraschall-Homogenisator für ca. 15 Sekunden homogenisiert. Während dieses Prozesses wurden sie zwischendurch immer wieder auf Eis gelagert.

Im Anschluss wurden die Proben bei -4 °C und 14000 xg für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde aufbewahrt und das Pellet verworfen. Das vorhandene Protein in den Proben konnte im nächsten Schritt quantifiziert und die Proben für einen anschließenden Western Blot vorbereitet werden.

2.4.3 Stimulation von HPESC560 mit IL1 α und Diprotin A

Die Stimulation der verwendeten HPESC560 erfolgte entsprechend der bereits geschilderten Experimente. Pro Well wurden 200.000 Zellen gesät und mit je 2 ml DMEM/F12 + 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % ITS über 24h inkubiert.

Nach anschließendem Aushungern über 24h wurden alle Zellen mit IL1 α (5, 10, 20, 50 ng/ml) stimuliert, wobei ein Teil der Zellen zum selben Zeitpunkt zusätzlich Diprotin A (10, 20, 50, 100 µM) erhielt. Nach einer weiteren Inkubation über 48 h wurden die Proben und Überstände, wie bereits für andere Experimente erläutert, gesammelt und aufbereitet (2.4.2).

2.4.4 Zellmigrations-Assay

Ein Zellmigrations-Assay ist eine Methode, um die Bewegung von Zellen aus einem Zellverband quantitativ nachzuweisen. Im Bereich der Endometriose-Forschung stellt sie ein Modell für die Migration von endometrialen Zellen in andere Bereiche des Körpers wie die Peritonealhöhle dar. Für diese Experimente wurden je 2×10^4 eCRC560 mit HPESC560 über 24 h indirekt kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen erneut über 24 h mit ‘‘Hunger‘‘-Medium mit 1 % FCS inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die eCRC560 mittels 1x TrypLE™ Express aus den Wells gelöst und gezählt. Im Anschluss wurden 1×10^5 Zellen in 200 µl Medium (1 % FCS) suspendiert und in lichtdurchlässige 24-Well-Filter (Porengröße 8 µm) gesät. In die Wells wurde Medium mit 10 % FCS gegeben. Die Zellen wurden, wie in den beschriebenen Vorversuchen (2.4.2/3), mit Dienogest und E2 stimuliert. Nach einer Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ über 24 h, wurde das Medium entnommen und die obere Membran des Filters mit einem Baumwollstäbchen abgestrichen, um nicht-migrierte Zellen zu entfernen. Die Zellkultur-Filter wurden in neue 24-Well-Platten mit je 500 µl Calcein AM (8 µM) und FCS-freiem Medium platziert und 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde das im Well befindliche Medium ebenfalls durch FCS-freies Medium ersetzt und Calcein AM 8 µM hinzugefügt. Der zelldurchlässige Farbstoff Calcein AM wurde zur Markierung der Zellen verwendet. Anschließend wurden die Platten für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium in den Wells erneut verworfen und durch 250 µl 1x TrypLE™ Express ersetzt, um die Zellen vom Filter zu lösen. Die Platten wurden 10 Minuten inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Proben auf eine 96-Well Platte verteilt und mit dem Tecan Infinite M200 Elisa Mikroplatten-Reader bei 480-520 nm Wellenlänge gemessen, sodass eine Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgen konnte.

2.4.5 Zellinvasions-Assay

Das Zellinvasions-Assay erfolgte mit $1,5 \times 10^5$ Zellen analog zu dem Migrations-Assay mit dem Unterschied, dass auf die Filter, die die Zellen durchdringen mussten, zuvor Matrigel (Corning/Greiner, Frickenhausen, Germany; 1:4 verdünnt mit DMEM + 0.1 % FCS) aufgetragen wurde, was als Modell für die EZM dient. Der Ablauf des Versuchs und auch die Quantifizierung der invasiven Zellen erfolgten nach demselben Prinzip (2.4.4).

2.4.6 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Wirkung von Hormonen auf die Barrierefunktion von Epithelzellen lässt sich mittels der Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bestimmen. 6×10^4 HPESC560 wurden in 800 μl Medium in 24-Well-Platten gesät und konnten über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 adhären. Anschließend wurden in die Wells lichtdurchlässige Filter mit einer Porengröße von 0,4 μm platziert und in diese 8×10^4 eCRC560 suspendiert in 200 μl Medium gesät und erneut für 24 h inkubiert. Nach dem Aushungern der Zellen wurden sie, wie in 2.4.1 beschrieben, mit E2 (20 nM) oder Dienogest (100 nM) stimuliert und 48 h inkubiert. Die Messung des TEERs wurde mit dem Millicell ERS-2 epithelial Volt-Ohm Meter (Merck Millipore) durchgeführt. Der Widerstand der zellfreien Filter wurde auf null gesetzt und die Werte ($\Omega \times \text{cm}^2$) analog der Herstellerangaben berechnet.

2.5 Proteinanalyse

2.5.1 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, um Proteine auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran darzustellen und sie anhand ihrer Masse zu identifizieren. Hierfür müssen die Proteine mithilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Hierzu wird an ein Polyacrylamid-Gel, durch welches die Proteine aufgetrennt werden, eine negative Spannung angelegt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dann anhand ihrer Masse, da schwerere Proteine im Gel langsamer laufen als leichtere Proteine. Um die Massen der Proteine später im Western Blot bestimmen zu können, wird neben den Proteinen zusätzlich eine Proteinleiter in ein Well gegeben. Diese spaltet sich ebenfalls auf und markiert farblich den Ort, an welchem sich eine bestimmte Masse im Gel befindet.

2.5.2 Vorbereitung der Proben für den Western Blot

20 μg Protein aus jeder Probe wurden in separate Reaktionsgefäße gegeben und kurz an zentrifugiert. Im Verhältnis 1:3 wurde anschließend zu jeder Probe Blue-Loading-Buffer (Cell Signaling Technologies, Leiden, Niederlande) hinzugefügt. Während der genannten Schritte erfolgte eine Kühlung der Proben auf Eis. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und erneut kurz an zentrifugiert. Sie konnten im Anschluss in die Wells pipettiert werden.

2.5.3 Vorbereitung der Gele für die Gelelektrophorese

Ein Gel setzt sich immer aus den folgenden Komponenten zusammen:

Sammelgel – Das Sammelgel unterscheidet sich vom Trenngel durch den pH-Wert und die unterschiedliche Porengröße. In das Sammelgel wird im noch flüssigen Zustand ein Kamm gegeben, welcher nach Festigung des Gels entfernt wird. In die entstehenden Wells können anschließend die vorbereiteten Proben und die Proteinleiter gegeben werden.

Trenngel – Im Trenngel erfolgt die Aufspaltung der einzelnen Proteine anhand ihrer Masse. Hierbei wandern die Proteine von der Kathode zur Anode.

Die Gele wurden in vorbereitete, aus zwei Glasplatten bestehende, Gelkammern gegossen, die mit einer Haltevorrichtung aneinander fixiert wurden. Zuerst wurde das Trenngel vorbereitet und mittels Pipette in die Gelkammer gefüllt. Nach oben sollte noch ca. 1 cm Platz für das Sammelgel gelassen werden. Um Luftblasen im Gel zu vermeiden, wurde der Rest mit destilliertem Wasser bis zum Rand aufgefüllt. Bis zur Aushärtung des Gels dauert es ca. 30 Minuten. Als nächstes wurde das Sammelgel vorbereitet und ebenfalls in die Gelkammer pipettiert. Direkt im Anschluss wurde der Kamm im Gel platziert. Je nach Menge der Proben, kann zwischen unterschiedlichen Kämmen ausgewählt werden. Die Aushärtung des Sammelgels dauert ebenfalls ca. 30 Minuten.

Nach Ablauf der Zeit wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt. Die Gelkammern wurden anschließend in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und darin fixiert. Die Kammer wurde dann mit Laufpuffer (Komponenten des Laufpuffers 2.1.7) gefüllt. Nach Entfernung des Kamms aus dem Gel, wurden die Wells mit in einer Spritze befindlichem Laufpuffer von verbliebenen Gelresten befreit.

Das Gel wurde im nächsten Schritt mit den Proben bestückt und die Elektrophorese-Kammer an eine Stromquelle angeschlossen. Bis zum Erreichen des unteren Teils des Sammelgels wandern die Proteine in der Kammer bei 60 Volt in Richtung der Anode. Anschließend wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde nun vorsichtig aus den Platten entfernt und das Sammelgel mit einem Spachtel abgetrennt. Es wurde ein „Sandwich“ erstellt, indem das Gel auf einer gleichgroßen PVDF-Membran zwischen je drei, in Blotting-Buffer getränkte, Blotting-Papiere gelegt und mittig in einer Blotting-Kammer platziert wurde. Vor

Verwendung der PVDF-Membran musste diese für 10 – 15 Sekunden in Methanol aktiviert werden. Anschließend wurde die Blotting-Kammer verschlossen und der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 300 mA für ca. 40 Minuten. Im nächsten Schritt wurde die Membran eine Stunde auf einem Plattformschüttler mit BSA 3 % geblockt. In dieser Zeit konnten ein oder mehrere primäre Antikörper (*Tabelle 4*) vorbereitet werden. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:1000 in T-BST (3 % BSA und 3 % FCS) verdünnt. Die PVDF-Membran wurde anschließend über Nacht bei +4 °C mit dem primären Antikörper auf einem Plattformschüttler inkubiert.

Die Vorbereitung der sekundären Antikörper (*Tabelle 5*) erfolgte im selben Verhältnis wie die der primären Antikörper. Die Lösung mit den primären Antikörpern wurde entfernt und die PVDF-Membran drei Mal für jeweils fünf Minuten mit T-BST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit T-BST, konnte der Antikörper auf der Membran detektiert werden.

Hierzu wurden, je nach Signalintensität, zwei verschiedene Chemilumineszenz-Reagenzien, das SignalFire™ ECL Reagent (GE Healthcare, München, Deutschland) oder das SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) analog der jeweiligen Anleitung verwendet. Ausgelesen wurde die Membran durch das Chemilumineszenz-System Fusion Pulse von Vilber Lourmat. Das Prinzip, nach welchem der Nachweis und die Detektion abläuft, ist folgendes: Durch das Blocken der Membran werden alle freien Bindungsstellen blockiert, sodass der folgende primäre Antikörper nur an sein spezifisches Epitop bindet. Durch den Waschvorgang werden dann die Antikörper entfernt, deren Bindung an der Membran zu schwach war. An den primären Antikörper bindet nun im Folgenden der sekundäre Antikörper, an welchen häufig das Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Bei der Detektion katalysiert die HRP die Reaktion von Luminol in dessen oxidierte Form, wodurch eine Lumineszenz entsteht. Diese kann mithilfe des Spektralfotometers detektiert werden. Für die Auswertung der Western Blots wurde das Programm Quantity One 4.6.6 von Bio-Rad verwendet.

2.5.4 Stripping von Membranen

Durch das Stripping bereits verwendeter Membranen können neue primäre und sekundäre Antikörper auf demselben Blot angewendet werden. Hierzu wurden diese Membranen, nach dem Waschen mit T-BST, mit je 5-10 ml Roti-Free Stripping Puffer (CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, Deutschland) auf einem Plattformschüttler bei 56 °C 30 Minuten inkubiert. Die Membranen konnten anschließend erneut mit T-BST gewaschen und mit einem anderen Antikörper verwendet werden.

2.5.5 ELISA

ELISA steht für „enzyme linked immunoabsorbent assay“ und ist eine Methodik zum Nachweis von Proteinen. Genutzt wird hier die Eigenschaft von Antikörpern, sich an ihre entsprechenden Epitope der Proteine zu koppeln. An diesen primären Antikörper bindet im nächsten Schritt ein sekundärer Antikörper, an welchen ein Enzym konjugiert ist. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion eines Substrates in ein Produkt, was für einen Farbumschlag sorgt. Mithilfe eines Mikroplatten Readers kann die Intensität des Farbumschlags quantifiziert und im Folgenden die Konzentration des vorhandenen Proteins bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Methodik des „Sandwich ELISA“ angewendet. Durch diesen ELISA ist es möglich, Proteine sowohl qualitativ als auch quantitativ nachzuweisen. Es kommen zwei spezifische Antikörper zur Verwendung, welche beide an dasselbe Protein, aber an unterschiedliche Epitope binden.

Zuerst wurde der „Capture-Antibody“ auf eine 96-Well Platte gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden die „Standards“ mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu bestimmenden Proteins vorbereitet. Nachdem die Wells gewaschen und die freien Bindungsstellen für eine Stunde blockiert wurden, konnten sowohl die „Standards“ als auch die Proben auf die Wells verteilt werden. In diesem Fall wurden als Proben die Überstände aus den Experimenten der Zellkultur verwendet. Die Platte wurde anschließend erneut bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert und der „Capture Antibody“ konnte an das zu bestimmende Protein binden. Im nächsten Schritt erfolgte, nach erneutem Waschen, die zweistündige Inkubation des „Detection Antibody“, woran bereits ein Enzym gekoppelt war. Dieses führte mit dem im Anschluss hinzugegebenen Substrat zu einem Farbumschlag. Diese Reaktion wurde nach vorgegebener Zeit

gestoppt, wodurch es zu einem erneuten Farbumschlag kam. Dessen Intensität konnte dann mithilfe des Mikropplatten-Readers quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde das ELISA Kit MMP7 Duo Set DY907 von R&D Systems verwendet.

2.5.6 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellen

Die Methode der Immunfluoreszenz dient der Darstellung von Proteinen in Zellen und anderen Geweben mittels Antikörper, welche in der direkten Immunfluoreszenz mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Hier wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet, bei welcher der Farbstoff nicht direkt an den primären, sondern an einen sekundären Antikörper gekoppelt ist.

Die Versuche für die Immunfluoreszenz wurden analog zu den bereits beschriebenen Experimenten in indirekter Kokultur mit 20 nM E2 oder 100 nM Dienogest durchgeführt. Die 5×10^4 eCRC560 wurden für diese Experimente auf 24-Well Platten gesät. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Filter mit den HPESC560 entfernt und verworfen.

Die zu untersuchenden eCRC560 wurden zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit eiskaltem Methanol (100 %) für 10 Minuten auf Eis fixiert. Die Zellen wurden anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit Blocking-Lösung (3% BSA, 0.1% Tween 20, 4 x SSC (Salzlösung-Natriumcitrat)) blockiert.

Im nächsten Schritt wurde der primäre Antikörper in einem Verhältnis von 1:300 in die jeweiligen Wells gegeben. Die verwendeten primären Antikörper in dieser Arbeit waren Claudin-1, CK-19 und ZO1 (**Tabelle 4**). Es wurden pro Well 200 μ l verwendet und die Platten wurden über Nacht bei +4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde aus den Wells entfernt und diese mit T-BST gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (**Tabelle 6**) in einem Verhältnis von 1:500 in die Wells gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um die DNA der Zellen ebenfalls darzustellen, wurden im letzten Schritt, nach erneutem Waschen, noch 1 μ g/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Lösung in jedes Well gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Wells wurden ein letztes Mal gewaschen und konnten anschließend im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und mittels ImageJ quantifiziert werden.

Verwendet wurde ein inverses Olympus IX81-Mikroskop, ausgestattet mit einem Fluoreszenzsystem.

2.6 Statistik

Jedes Experiment wurde mit Duplikaten je mindestens dreimal durchgeführt. Die Mittel- und SEM- (standard error of the mean) Werte aller Experimente wurden für die Analyse verwendet. Alle statistischen Analysen zwischen mehr als zwei verschiedenen Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgend mit „Dunnett's multiple comparison test“ durchgeführt. Der Student's T-Test erfolgte zum Vergleich zwischen zwei Gruppen mit der GraphPad Prism Software (Version 5.0, GraphPad Inc.) Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als statistisch signifikant gewertet bei $P \leq 0.05$.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der primären humanen endometrialen Epithelzelllinie eCRC560

Die primären endometrialen Epithelzellen eCRC560 wurden sowohl anhand ihrer Morphologie als auch durch Immunfluoreszenz (Claudin-1, CK-19) auf ihre Reinheit überprüft.

Die *Abbildung 3* zeigt nach 3-tägiger Kultivierung in der Phasen-Kontrast-Mikroskopie einen epithelzelltypischen Monolayer. Die Zellen wiesen zudem eine charakteristische kopfsteinpflasterartige Form auf.

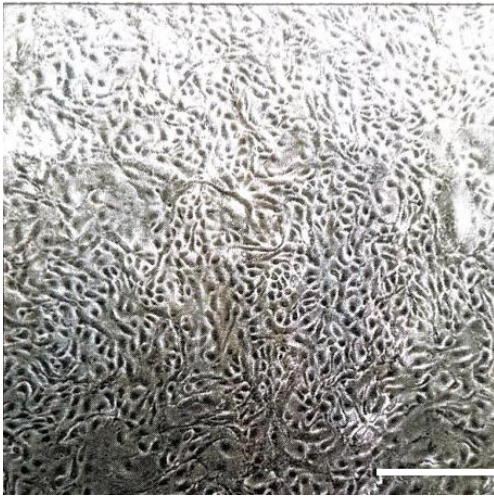


Abbildung 3: Phasen-Kontrast-Mikroskopie kultivierter eCRC560; Maßstabsleiste 200 μ M

Claudin-1 ist ein Hauptbestandteil der Zellkontakte, welche die Permeabilität von Epithelzellen regulieren (Kirschner et al. 2013). Auch Claudin-1 wird in endometrialen Epithelzellen exprimiert (Orchard und Murphy 2002).

CK-19, auch genannt Cytokeratin-19, ist ein 40 kDa schweres Protein, welches einen Teil des zytoskelettalen Gerüsts in Epithelzellen darstellt. Es trägt dazu bei, die Zellarchitektur aufrecht zu erhalten und mechanischem Stress zu widerstehen (Moll et al. 1982; Toivola et al. 2015; Dmello et al. 2019).

CK-19 kommt in einer großen Varietät vor allem in glandulären Geweben vor. So auch im gastrointestinalen Trakt, den Gallengängen, dem respiratorischen Epithel, der Prostata und anderen Organen (Moll et al. 1982; Bártek et al. 1986). Zusätzlich wurde DAPI verwendet, um die DNA der Zellkerne zu markieren. Wie in

Abbildung 4 zu erkennen, exprimierten die untersuchten eCRC560 sowohl Claudin-1 als auch CK-19, was ihre Identität als Epithelzellen bestätigte.

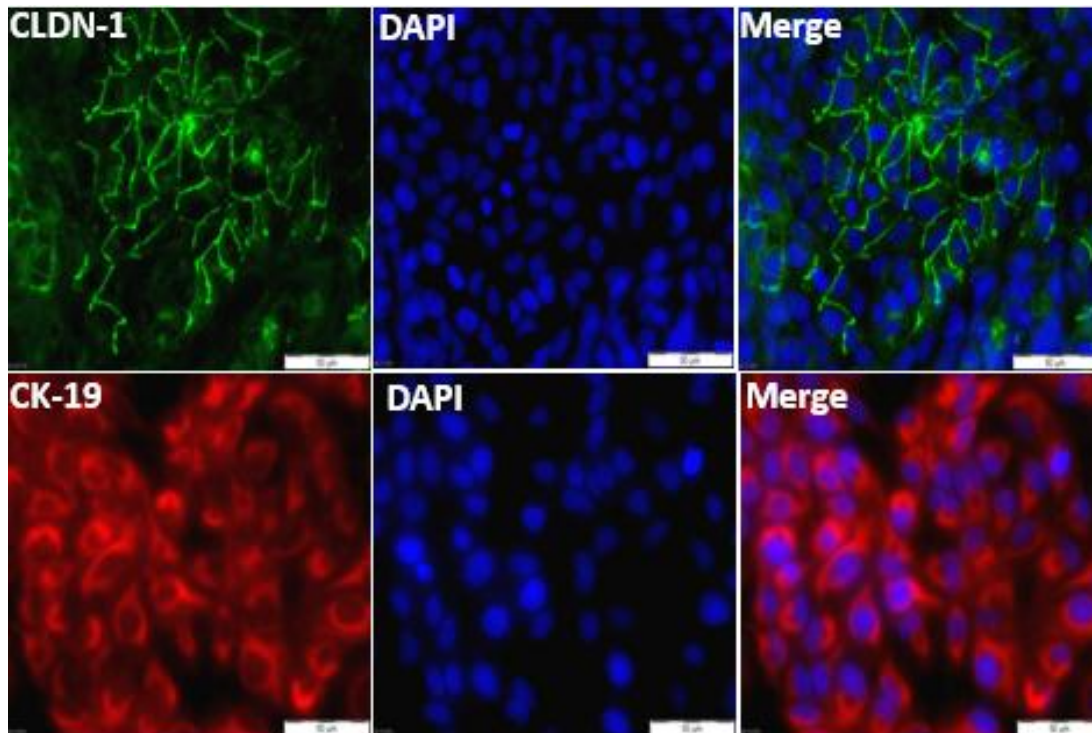


Abbildung 4: Repräsentative Immunfluoreszenz von Claudin-1 (CLDN-1) und Cytokeratin-19 (CK-19) in eCRC560; eine Gegenfärbung mit DAPI wurde durchgeführt, um den Zellkern zu markieren. Maßstabsleiste 50 μm

3.2 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf den transepithelialen elektrischen Widerstand von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560

Zuerst wurden die Konzentrationen und die zeitlichen Effekte von E2 und Dienogest auf die eCRC560 Zellen in indirekter Kokultur mit THESC untersucht. In der Studie von Gorodeski (2007) konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit 20 nM E2 sowohl zu einer Reduktion im TEER führte als auch der physiologischen Konzentration dieses Hormons im menschlichen Körper entspricht. Für die Stimulation mit Dienogest wurde von van der Giessen et al. (2019) eine Konzentration von 1000 nM verwendet. Wir wählten für unser Experiment mit 100 nM eine geringere Konzentration an Dienogest und übernahmen 20 nM als E2-Konzentration. Eine zusätzliche Gruppe erhielt beide Hormone. Die Stimulation erfolgte über 48 h. Die Kontrollgruppe wurde nicht stimuliert.

Wie **Abbildung 5** zeigt, führte die Stimulation mit Dienogest zu einer signifikanten Erhöhung des TEERs (+ 25 %) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. In Kontrast hierzu kam es nach Stimulation mit E2 zu einem Abfall des TEERs (- 15 %) unter das Niveau der Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen den Zellen, welche E2 und denen, die beide Hormone erhalten hatten, zeigte einen signifikanten Anstieg des TEERs um 25 % nach Zugabe von Dienogest. Es lässt sich also festhalten, dass Dienogest dem E2-bedingten Abfall des TEERs entgegen wirkt.

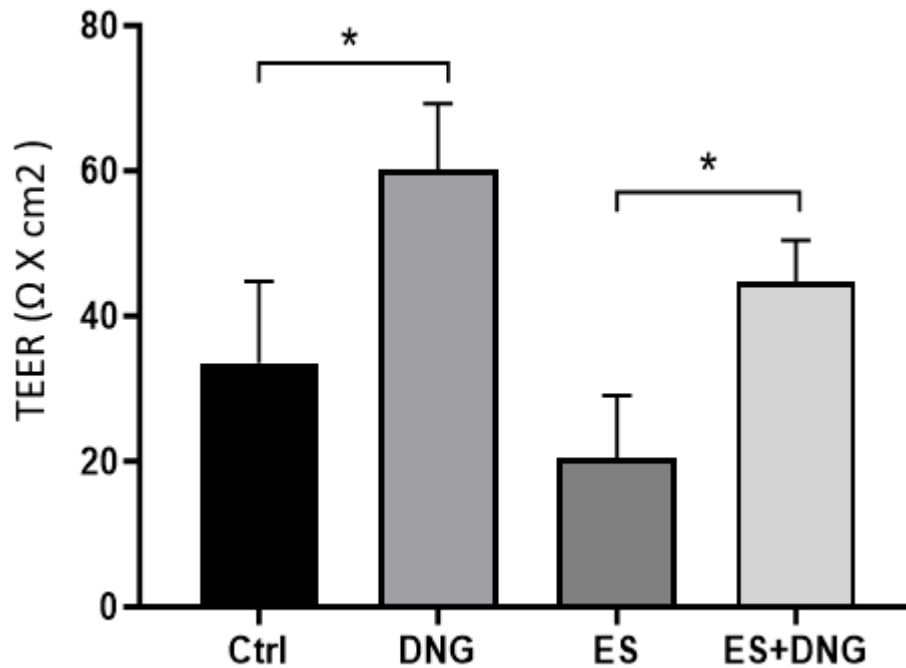


Abbildung 5: Darstellung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEERs) in eCRC560 nach Stimulation mit Sexualhormonen in indirekter Kokultur mit HPESC560; die Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme des TEERs sowohl unter alleiniger Stimulation mit Dienogest als auch mit beiden Hormonen. Eine Abnahme zeigt sich unter E2-Einfluss. (TEER in Ω x cm²); Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ES = E2; * P ≤ 0.05

3.3 Effekt von 17-β-Estradiol und Dienogest auf die ZO1 Expression in eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560

3.3.1 Darstellung mittels Western Blot

Aus publizierten Studien geht hervor, dass das Ausmaß des TEERs maßgeblich von spezifischen Zellkontakten abhängig ist (Lo et al. 1999; Anderson 2001). Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass die Proteinexpression von ZO1 durch

Sexualhormone beeinflusst wird (Oh et al. 2016). Aus diesem Grund wurde die Expression dieses Proteins unter hormoneller Stimulation in den folgenden Experimenten untersucht. Um die physiologischen Begebenheiten und das Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen im menschlichen Körper möglichst genau abzubilden, wurde hierfür die Methodik der indirekten Kokultur angewendet. Die Zellen wurden jeweils mit verschiedenen Konzentrationen von E2 oder Dienogest stimuliert, die hierbei an ihre physiologischen Korrelate im menschlichen Körper angelehnt waren. Für E2 entsprach dieses den Konzentrationen 10, 20, und 50 nM und für Dienogest 20, 50, und 100 nM. Um die zeitliche Komponente der Stimulation ebenfalls abzubilden, wurden die Zellen, je nach Gruppe für 24 h oder 48 h, dem jeweiligen Hormon ausgesetzt. Die gesammelten Überstände wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für spätere Experimente aufbewahrt. Mit den Zell-Lysaten wurde nach Abschluss der Experimente ein Western Blot durchgeführt. Um die Menge an Protein in der jeweiligen Bande des Western Blots zu quantifizieren, wurde zusätzlich GAPDH zur Normalisierung verwendet.

Die Ergebnisse zeigten einen hoch signifikanten Abfall der ZO1 Expression nach Stimulation mit 50 nM E2 über 24 h (**Abbildung 6**). Dieser betrug $\sim 70\%$ verglichen mit den unbehandelten Zellen. Ebenfalls hoch signifikant stellte sich die Expression von ZO1 nach Stimulation mit β -E2 über 48 h dar; alle Konzentrationen (10, 20, 50 nM) führten zu einer hoch signifikanten Reduktion im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Diese betrug für 10 nM $\sim 75\%$ und für 20 nM und 50 nM E2 jeweils $\sim 85\%$. Die Ergebnisse für die Stimulation mit 10 nM und 20 nM über 24 h führten nur zu einem geringen Abfall der ZO1 Expression und lieferten keine signifikanten Werte.

Da die Konzentrationen von 20 nM und 50 nM in diesem Experiment den größten Effekt auf die Protein-Expression von ZO1 zeigten, wurde für alle weiteren Experimente die physiologischere Konzentration von 20 nM verwendet.

In Bezug auf die Proben, welche mit Dienogest stimuliert wurden, ließ sich für alle Hormonkonzentrationen, unabhängig vom Zeitfaktor, eine signifikante Erhöhung der Expression von ZO1 im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten (**Abbildung 7**). Die am höchsten signifikanten Ergebnisse lieferten hierbei jeweils die Zellen, welche mit 50 nM und 100 nM über 24 h und mit 20 nM beziehungsweise 50 nM über 48 h, stimuliert wurden. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe kam es hier zu einer Erhöhung der Expression um mehr als 100 %. Einen geringeren, jedoch

trotzdem sehr signifikanten Anstieg um ~ 60 %, lieferte die Expression von ZO1 unter Stimulation mit 20 nM Dienogest über 24 h. Sehr signifikant zeigte sich auch der Anstieg nach Stimulation mit 100 nM Dienogest über 48 h, welcher ebenfalls bei ~ 60 % lag.

In **Abbildung 8** ist zusätzlich zur Expression von ZO1 unter alleiniger E2 - oder Dienogest-Stimulation die Behandlung mit beiden Hormonen abgebildet. Es ist, wie bereits in **Abbildung 6 und 7** gezeigt, eine sehr signifikante Verringerung der ZO1 Expression unter E2- und eine ebenfalls sehr signifikante Steigerung unter Dienogest-Einfluss zu erkennen. Die Stimulation mit beiden Hormonen führte ebenfalls zu einer zwar geringeren, jedoch signifikanten Steigerung der ZO1 Expression in eCRC560.

In den **Abbildungen 6 und 7** zeigen sich Doppelbanden bei 220 kDa. Dieses hängt damit zusammen, dass zwei unterschiedliche Isoformen von ZO1 existieren, die sich anhand einer internen Domäne von 80 Aminosäuren unterscheiden und durch alternatives Spleißen entstehen (Balda und Anderson 1993).

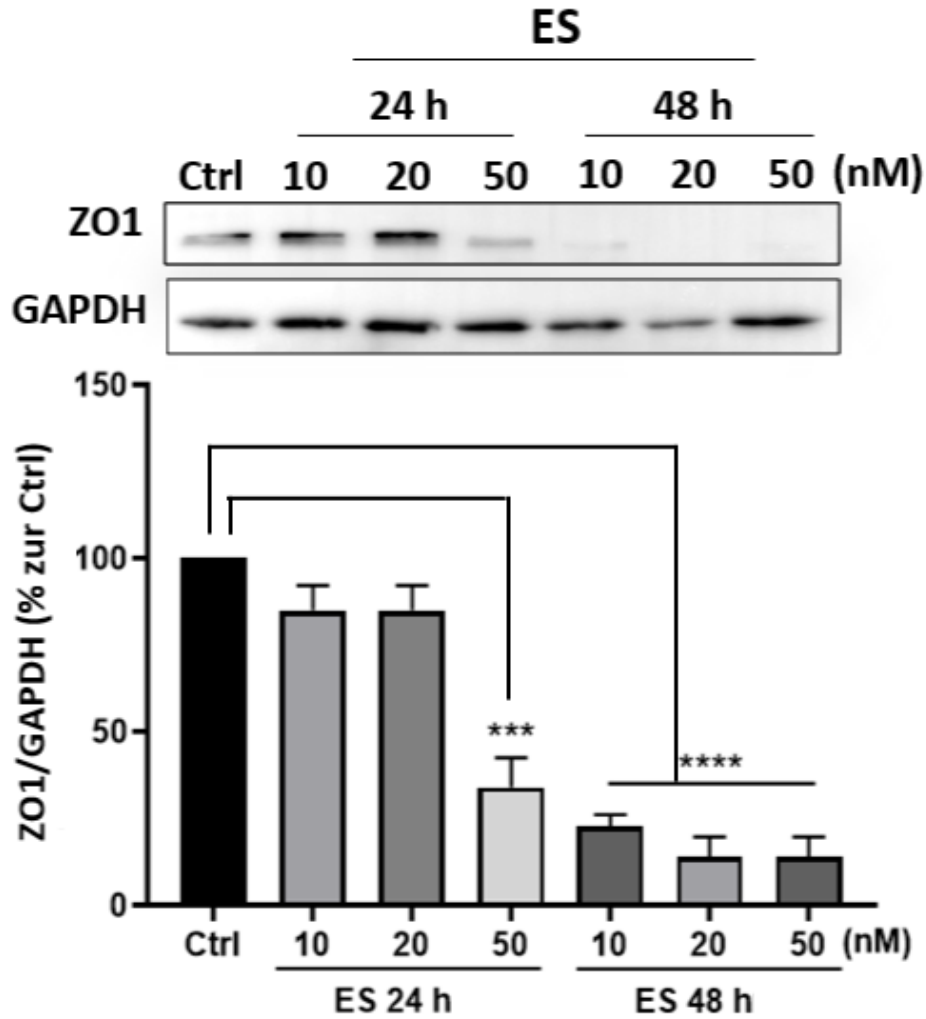


Abbildung 6: Darstellung der Expression von ZO1 mittels Western Blot und dessen densitometrischer Auswertung in eCRC560 nach Stimulation mit E2 in indirekter Kokultur mit HPESC560; es zeigt sich ein signifikanter konzentrations- und zeitabhängiger Abfall der ZO1 Expression unter Stimulation mit E2. (Ctrl = 100%); Ctrl = Kontrollgruppe; ES = E2; *** $P < 0.001$; **** $P < 0,0001$

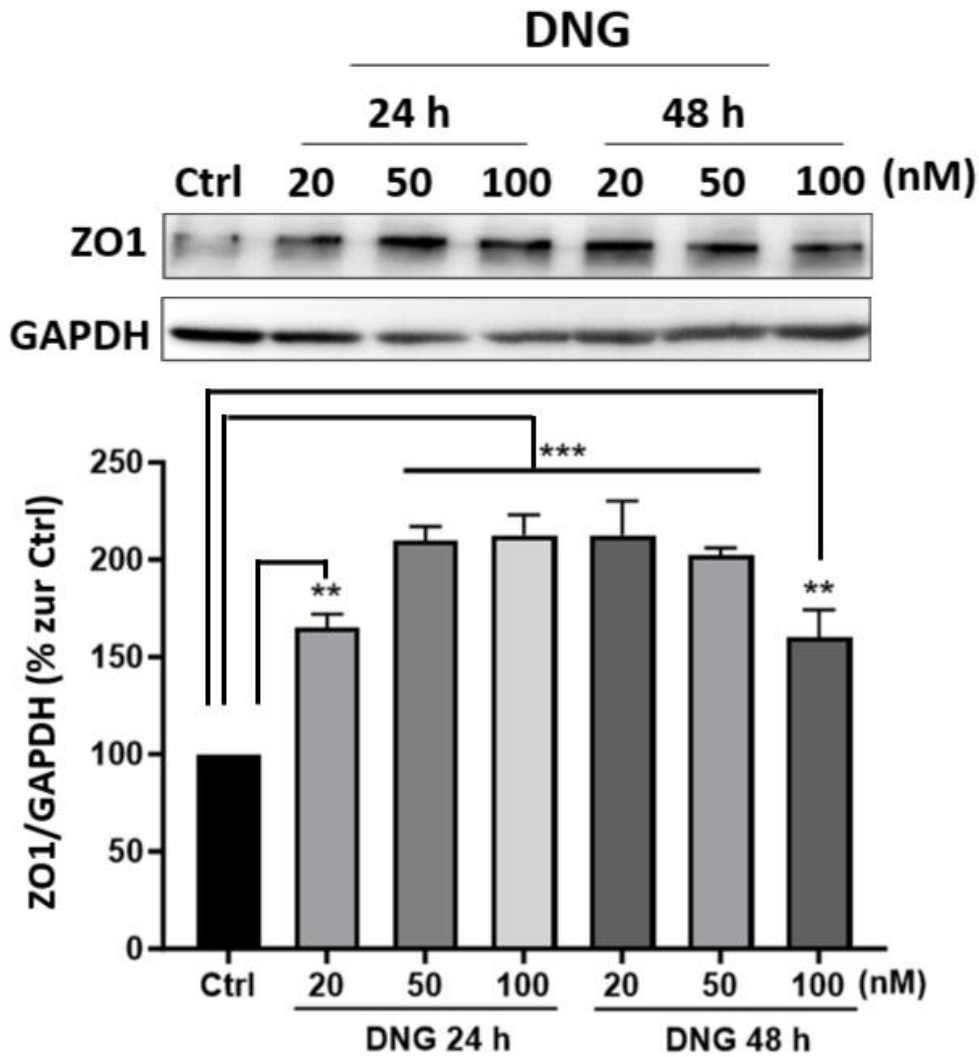


Abbildung 7: Darstellung der Expression von ZO1 mittels Western Blot und dessen densitometrischer Auswertung in eCRC560 nach Stimulation mit Dienogest in indirekter Kokultur mit HPESC560; die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Anstieg der ZO1 Expression unter Stimulation mit Progesteron. (Ctrl = 100 %); Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

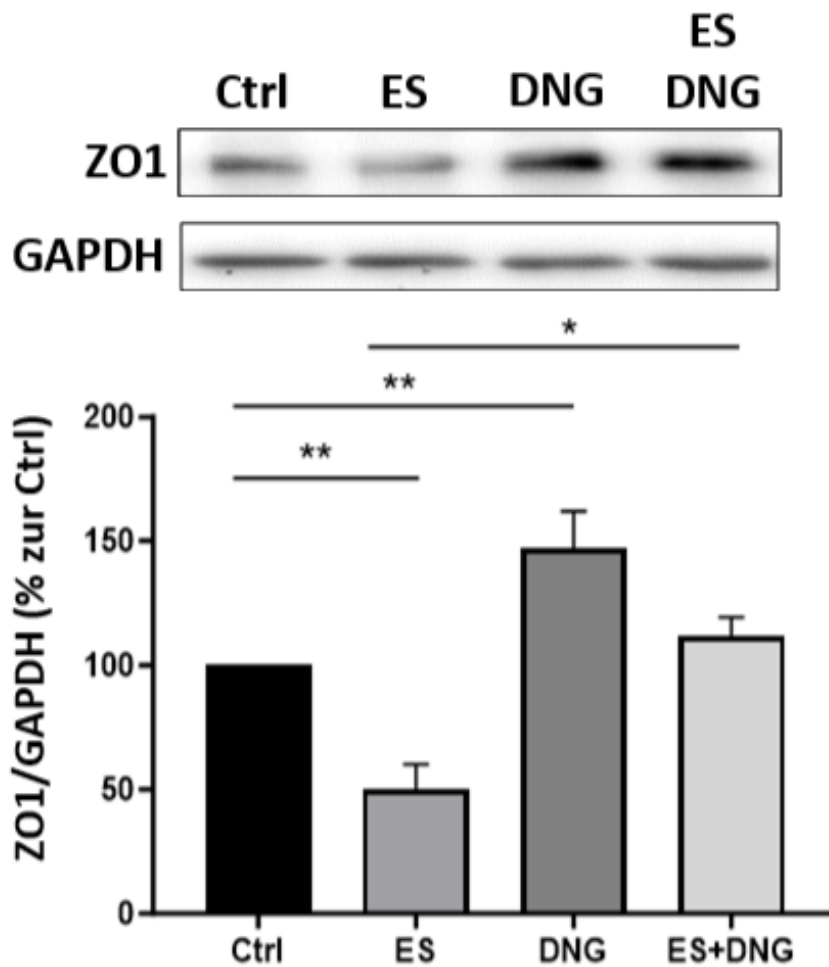


Abbildung 8: Darstellung der Expression von ZO1 mittels Western Blot und dessen densitometrischer Auswertung in eCRC560 nach Stimulation mit E2 und Dienogest in indirekter Kokultur mit HPESC560; die Ergebnisse zeigen eine sehr signifikante Reduktion der ZO1 Expression unter E2-Einfluss und eine Steigerung unter Dienogest. Die Gabe von beiden Hormonen führte ebenfalls zu einer Steigerung der ZO1 Expression. (Ctrl = 100%); Ctrl = Kontrollgruppe; ES = E2; DNG = Dienogest; * $P \leq 0.05$; ** $P < 0,01$

3.3.2 Darstellung mittels Immunfluoreszenz

Da die Bestimmung der Expression von ZO1 im Western Blot (**Abbildung 6/7/8**) keine Aussage über die Lokalisation und Verteilung im Zellverband zulässt, wurde in den folgenden Experimenten die Methode der Immunfluoreszenz angewandt. Vorgegangen wurde hierbei analog der bereits beschriebenen indirekten Kokultur, wobei jetzt eine 12-Well Platte verwendet wurde, da für die Immunfluoreszenz

weniger Zellen benötigt wurden. Außerdem wurden die Zellen, um einen größeren Effekt zu erzielen, ausschließlich für 48 h mit E2 und Dienogest stimuliert. Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte mittels ImageJ (*Abbildung 9*).

Der an ZO1 gekoppelte sekundäre Antikörper leuchtet in *Abbildung 9, Spalte A* grün. Zusätzlich wurde mit DAPI eine Hintergrundfärbung vorgenommen, welche die DNA in den Zellkernen blau markiert (*Abb. 9, Spalte B*). Die *Spalte C* bildet ZO1 und DAPI gemeinsam ab.

Die Ergebnisse zeigten den Nachweis von ZO1 in den Membranen der eCRC560. Es ließ sich zudem DAPI mittig zwischen den grün gefärbten Membranen in *Spalte C* erkennen. Die grüne Fluoreszenz zeigte sich in den unbehandelten Zellen (*Abb. 9, Reihe 1*) klar von der Umgebung abgegrenzt mit einer gleichmäßig starken Ausprägung im gesamten Bild. Verglichen hiermit (*Abb. 9, Reihe 1*) zeigten sich die Zellen, die eine Stimulation mit Dienogest erhalten hatten (*Abb. 9, Reihe 2*), mit einem noch intensiveren Fluoreszenzsignal. Bei Betrachtung der mit E2 stimulierten Zellen (*Abb. 9, Reihe 3*) fiel eine Abschwächung dieses Signals auf. Die Abgrenzung zur Umgebung war aufgelockert und es zeigten sich Unterbrechungen der in der Kontrollgruppe kontinuierlichen Umrandung der Zellen (*Abb. 9, Reihe 1*). Die gesamte *Abbildung (Abb. 9, Reihe 3)* zeigte sich zudem dunkler. Es ließ sich nach Stimulation mit E2 also ein Verlust von ZO1 in den Zellmembranen und eine Bildung intrazellulärer Lücken (weiße Pfeile) erkennen. In den Zellen, die mit beiden Hormonen stimuliert wurden (*Abb. 9, Reihe 4*), ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctrl) eine ähnliche Verteilung der Fluoreszenz erkennen. Diese zeigte sich jedoch deutlich schmaler und weniger intensiv. Die Kontinuität der Färbung um die Zellen herum ließ sich, im Gegensatz zu den mit E2 stimulierten Zellen, erneut beobachten. Die Intensität von DAPI war in *Abbildung 9, Spalte B und C* gleich.

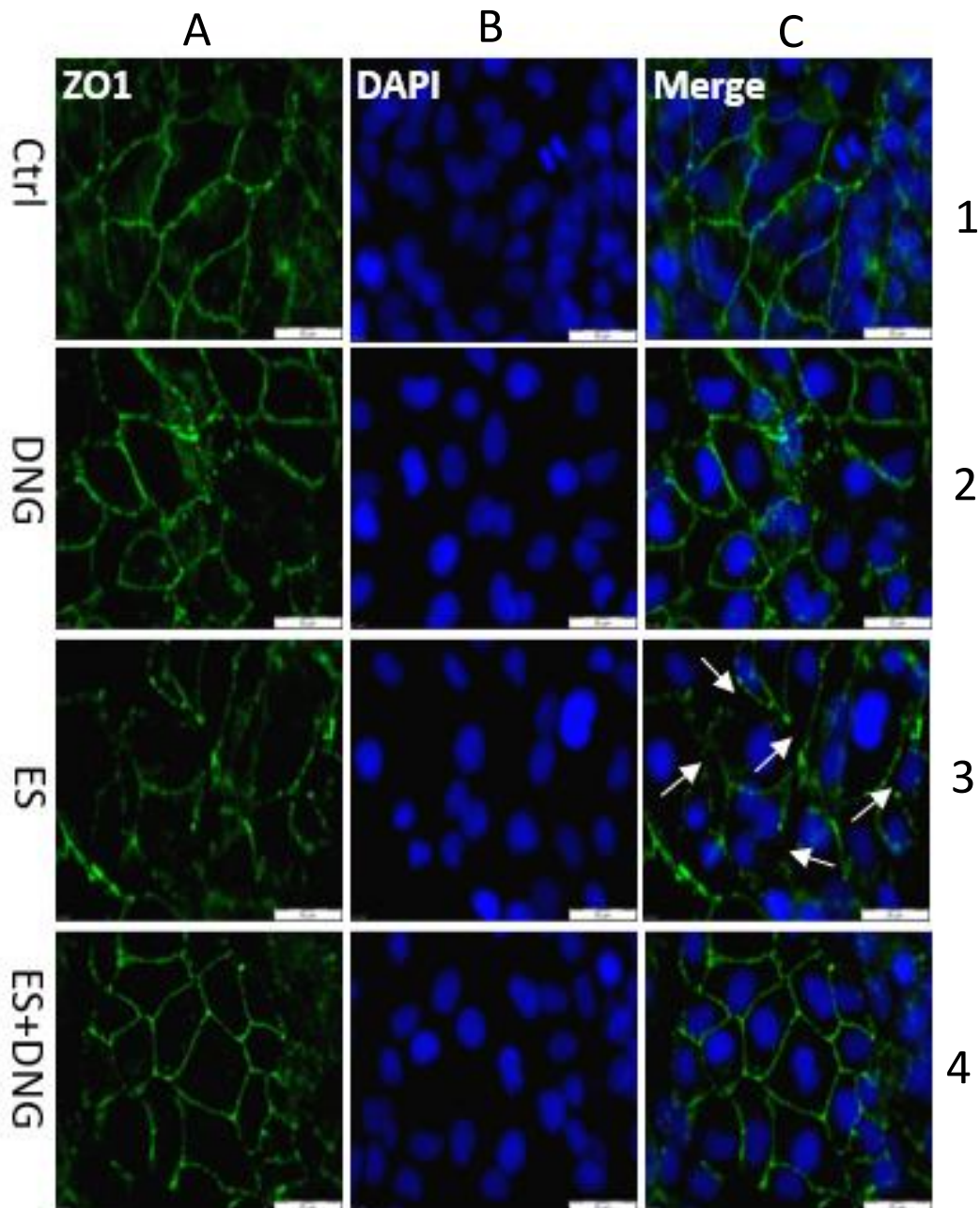


Abbildung 9: Darstellung der Expression von ZO1 mit Immunfluoreszenz in eCRC560 nach Stimulation mit Sexualhormonen in indirekter Kokultur mit HPESC560; eine Färbung mit DAPI wurde durchgeführt, um den Zellkern zu markieren. Es zeigte sich eine Verstärkung der Expression von ZO1 unter Stimulation mit Dienogest und ein Abfall unter Stimulation mit E2. Eine Stimulation mit beiden Hormonen führte zu einem ähnlichen Intensitätsmuster wie das der Kontrollgruppe; Weiße Pfeile = intrazelluläre Lücken; Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ES = E2; Maßstabsleiste 50 µm

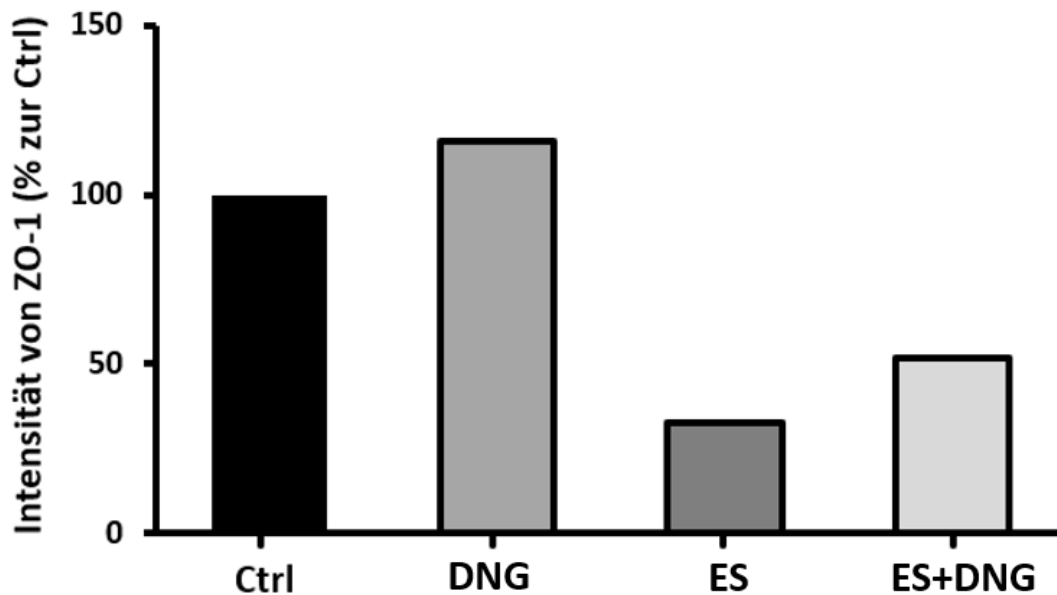


Abbildung 10: Auswertung der Immunfluoreszenz von ZO1 in eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560 mittels ImageJ; es zeigt sich eine Steigerung der Expression von ZO1 unter Stimulation mit Dienogest und ein Abfall unter Stimulation mit E2. Eine Stimulation mit beiden Hormonen führte im Vergleich zu E2 zu einem erneuten Anstieg der Expression von ZO1; (Ctrl = 100 %) Die Immunfluoreszenz wurde für diese Experimente nur einmal durchgeführt, sodass keine statistische Auswertung erfolgen konnte. Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ES = E2

Die Auswertung der Immunfluoreszenz mittels ImageJ (**Abbildung 10**) zeigte eine verstärkte Expression von ZO1 unter Stimulation mit Dienogest um ~ 20 % im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Stimulation mit E2 führte zu einem Abfall der ZO1 Expression von ~ 70 %. Die Auswertung der ZO1 Expression nach Stimulation mit E2 und Dienogest zeigte ebenfalls ein Abfall von jedoch nur ~ 50 %. Eine Steigerung konnte gegenüber der Stimulation mit E2 allein gezeigt werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine antagonistische Wirkung von Dienogest zu E2 hin.

3.4 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf die Migration von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560

Nachdem die Expression von ZO1 als ein wichtiger Einflussfaktor für eine Veränderung der Permeabilität von Epithelzellverbänden in den vorangegangenen Experimenten bereits beurteilt wurde, wurde im nächsten Schritt die Migration von eCRC560 untersucht. Diese stellt laut Nap et al. (2004) einen entscheidenden Faktor in der Entstehung der Endometriose dar.

Um den Effekt von E2 und Dienogest auf die Migration dieser Epithelzellen zu untersuchen, wurde der Transwell-Migrations-Assay angewandt. Die eCRC560 wurden zu Beginn des Versuchs erneut für 48 h mit E2 oder Dienogest stimuliert und in indirekter Kokultur mit HPESC560 inkubiert. Anschließend wurden diese auf einen permeablen Filter gesät, der auf einem Well mit Medium platziert wurde, das 10 % FCS enthielt. Das Medium in den Filtern enthielt 1 % FCS, wodurch die Zellen in Richtung des Wells gelockt wurden. Die Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgte mittels eines Mikroplatten-Readers.

Die Ergebnisse des Migrations-Assays (*Abbildung 11*) zeigten nach Stimulation mit E2 eine signifikante Erhöhung der Zellmigration um ~ 40 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter Stimulation mit Dienogest ließ sich hingegen eine Abnahme der migrierten Zellen um ca. 20 % beobachten. Auch in der Gruppe, die mit beiden Hormonen stimuliert wurde, konnte verglichen mit der Kontrollgruppe eine Abnahme der Migration um ~ 20 % gezeigt werden. Die Stimulation mit E2 und Dienogest zeigte im Vergleich zur alleinigen E2-Behandlung eine sehr signifikante Abnahme der Migration von eCRC560.

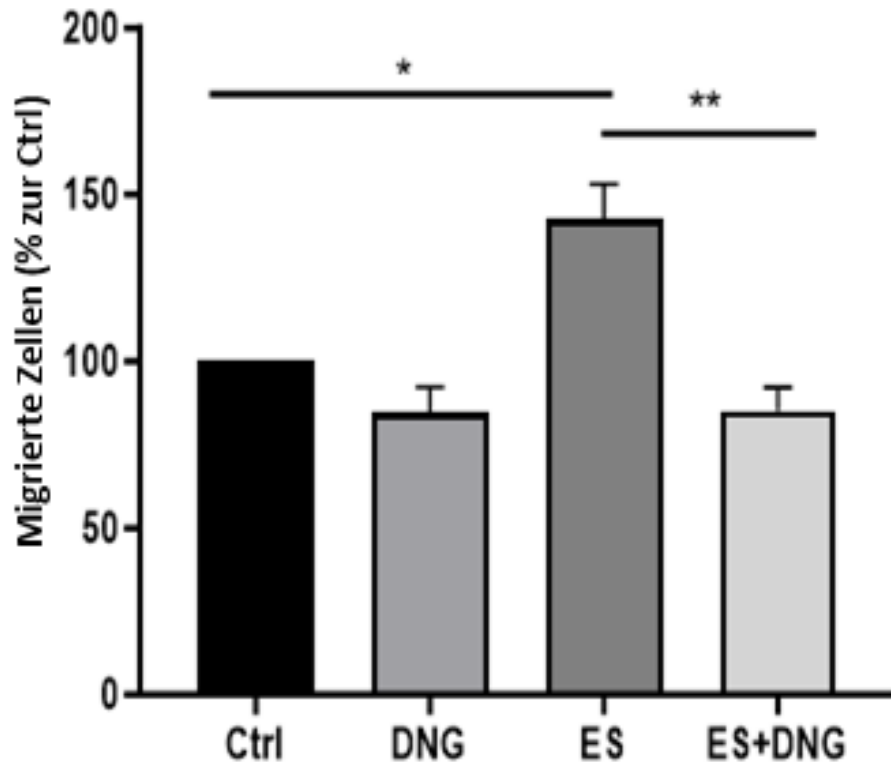


Abbildung 11: Darstellung der Menge migrierter eCRC560 nach Stimulation mit Sexualhormonen in indirekter Kokultur mit HPESC560; die Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Migration unter Stimulation mit E2. Unter alleiniger Stimulation mit sowohl Dienogest als auch mit beiden Hormonen nimmt die Migration der primären endometrialen Epithelzellen ab. (Ctrl = 100 %); Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ES = E2; * $P \leq 0.05$; ** $P < 0,01$

3.5 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf die Invasivität von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560

Ebenso wie die Migration ist auch die Invasivität ein wichtiger Faktor in der Endometriose Entstehung (Nap et al. 2004). Im Gegensatz zur Migration, handelt es sich bei der Invasivität, jedoch um ein Verhalten von Zellen, welches vor allem im Rahmen der Metastasierung von Karzinomen eine Rolle spielt. Die Zelle wandert aktiv in die extrazelluläre Matrix und andere umgebende oder auch weiter entfernte Gewebe ein. Bezogen auf die Pathophysiologie der Endometriose, wandern die endometrialen Zellen, welche sich bereits aus ihrem Zellverband gelöst haben, in das Peritoneum oder andere Organe ein. Hier können sie dann weiter proliferieren und zu Endometriose-Herden werden.

Ergebnisse

Um den Prozess der Zellinvasion bestmöglich darzustellen, wurde auch in diesem Experiment ein Transwell-Invasions-Assay verwendet. Dieses entsprach im Aufbau größtenteils dem des Migrations-Assays, mit dem Unterschied, dass der Filter, in welchen die Zellen gesät wurden, zuvor mit Matrigel beschichtet wurde. Dieses dient in Invasions-Assays als Modell für die Basalmembran und beinhaltet ähnliche Komponenten.

Das Experiment wurde nach demselben Prinzip wie der Transwell-Migrations-Assay durchgeführt und es erfolgte ebenfalls eine Stimulation mit E2 und Dienogest über 48 h.

Wie in **Abbildung 12** dargestellt, führte die Stimulation mit Sexualhormonen ebenfalls zu einer Veränderung der Invasivität der eCRC560. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Invasivität unter Einfluss von E2. Es kam zu einer Steigerung von 100 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter Stimulation mit Dienogest kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe nur zu einer geringen Reduktion der Invasivität, die im Rahmen der Variabilität nicht als Effekt zu werten ist. Die Invasivität der Gruppe, welche beide Hormone erhalten hatte, sank im Vergleich zu den Zellen, die mit E2 stimuliert wurden, signifikant um ~ 100 % auf das Niveau der Kontrollgruppe. Dieses bestätigt erneut den bereits gezeigten antagonistischen Effekt von Dienogest auf E2.

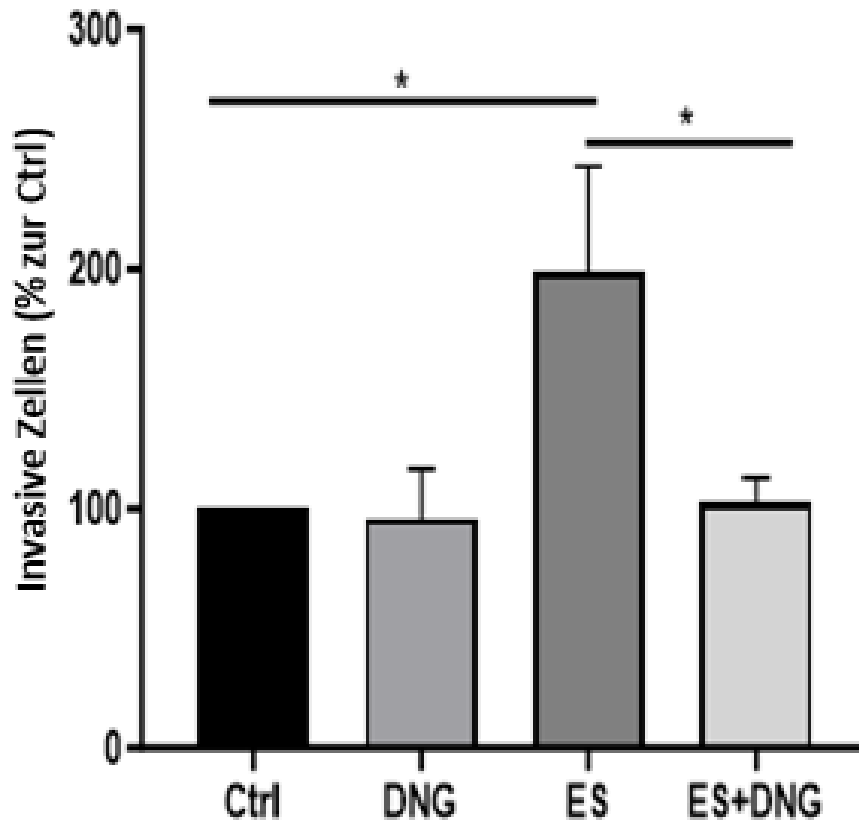


Abbildung 12: Darstellung der Menge invasiver eCRC560 nach Stimulation mit Sexualhormonen in indirekter Kokultur mit HPESC560; die Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Invasivität unter Stimulation mit E2. Eine Abnahme der E2-induzierten Invasivität zeigt sich unter Dienogest-Einfluss. Bei Stimulation mit beiden Hormonen bleibt die Invasivität der Zellen ähnlich der Kontrollgruppe. (Ctrl = 100 %); Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ES = E2; * $P \leq 0.05$

3.6 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf die Lebensfähigkeit von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560

Die bisherigen Versuche wiesen darauf hin, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen der veränderten Migration beziehungsweise Invasivität und der Expression von Zellkontakten unter Stimulation mit Sexualhormonen bestehen könnte. In Morita-Takemura et al. (2016) wurde beschrieben, dass auch die Proliferation von Zellen, Einfluss auf deren Permeabilität hat.

Aus diesem Grund wurde in dem folgenden Experiment der Einfluss von E2 und Dienogest auf die Lebensfähigkeit von eCRC560 in Zellkultur nach 24 h und 48 h untersucht. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten gesät und analog den bisherigen

Ergebnisse

Experimenten für 48 h mit E2 und Dienogest stimuliert. Nach Abschluss des Experiments wurden die Zellen mithilfe eines automatischen Zählgeräts ausgezählt. Um den Aufbau des Versuchs besser an die physiologischen Gegebenheiten im menschlichen Körper anzupassen, wurde im nächsten Schritt dieser Versuch in indirekter Kokultur mit HPESC560 durchgeführt. Die Kokultur sollte außerdem zeigen, ob die Anwesenheit von Fibroblasten einen Effekt auf die Proliferation der Epithelzellen haben könnte.

Bei der Stimulation mit E2 und Dienogest kam es innerhalb von 24 h zu keinen signifikanten Veränderungen. Nach 48 h zeigte sich ein signifikanter Anstieg um ~ 60 % unter Stimulation mit E2. Die Zellzahlen der mit Dienogest stimulierten Gruppen veränderten sich auch nach 48 h nicht signifikant. Hier blieben die Werte auf dem Niveau der Kontrollgruppe (**Abbildung 13**).

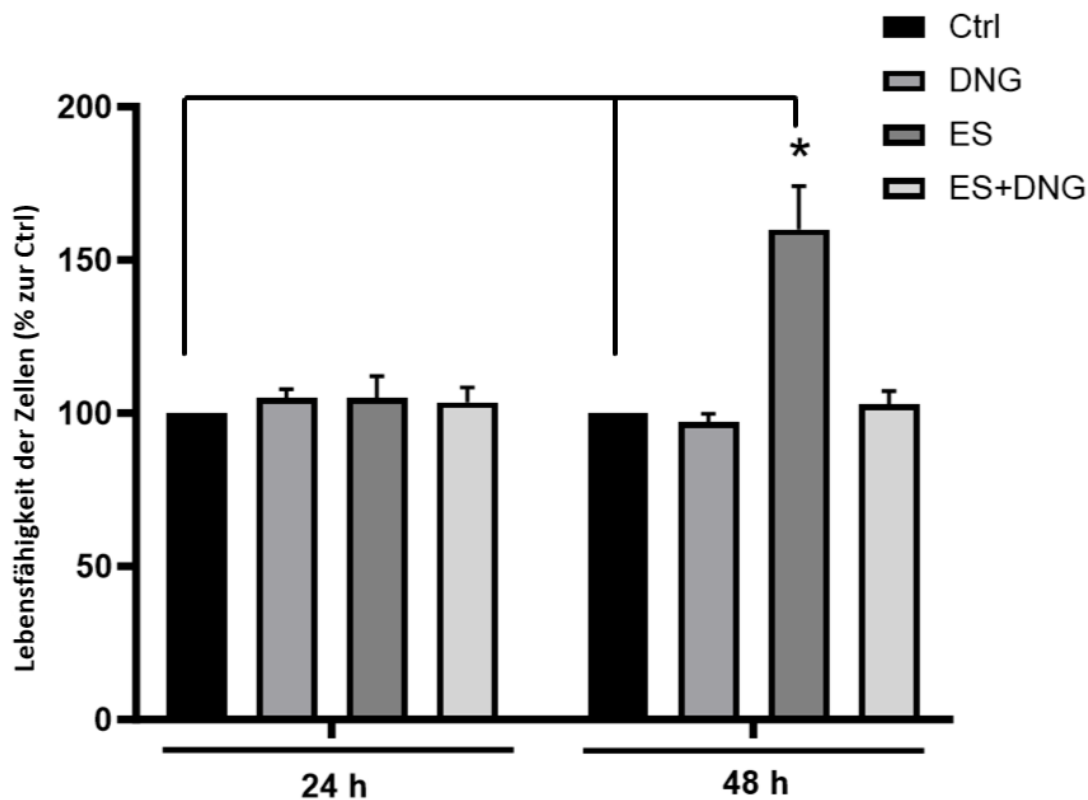


Abbildung 13: Darstellung der Lebensfähigkeit eCRC560 nach Stimulation mit Sexualhormonen in über 24 h und 48 h in indirekter Kokultur mit HPESC560; es kommt zu einer signifikanten Steigerung der Lebensfähigkeit der Zellen unter Stimulation mit E2 über 48 h, die durch Dienogest antagonisiert wird. (Ctrl = 100 %); Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ES = E2; * $P \leq 0,05$

3.7 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf die Sekretion von MMP-7 von eCRC560 in indirekter Kokultur mit HPESC560

In den letzten Jahren wurde immer wieder gezeigt, dass MMPs eine bedeutende Rolle sowohl in der Entstehung als auch in der Behandlung von Endometriose innehaben (Ke et al. 2021). Bisherige Studien zeigten ebenfalls Effekte von Sexualhormonen auf die Sekretion von MMPs (Curry und Osteen 2001; Russo et al. 2009). Um diese Effekte in primären endometrialen Epithelzellen nachzuweisen, wurde für dieses Experiment ein Antikörper gegen MMP-7 verwendet, da diese Endopeptidase ausschließlich in glandulärem und lumenalem Endometrium-Epithel vorkommt (Yokoyama et al. 2008).

Zur Detektion von MMP-7 wurde ein ELISA verwendet. Alle hierfür benötigten Überstände wurden in insgesamt sechs Experimenten gewonnen, welche derselben Versuchsreihe entstammten, die analog zu den oben bereits genannten Experimenten in indirekter Kokultur (s. **2.4.1**) mit HPESC560 durchgeführt wurden. Die Überstände wurden gesammelt und bei -20 °C gelagert. Für die anschließende Detektion wurde das ELISA Kit MMP-7 Duo Set DY907 von R&D Systems verwendet. In **Abbildung 14** ist der Mittelwert der jeweiligen MMP-7-Konzentration in pg/ml aufgezeigt.

Die Ergebnisse (**Abbildung 14**) zeigten eine abnehmende Konzentration der MMP-7-Sekretion bei Stimulation mit Sexualhormonen. Diese war, bezogen auf die Stimulation mit E2, um ca. 10 pg/ml gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe ~ 50 pg/ml) gesunken. Dieses Ergebnis war nicht signifikant. Ein hoch signifikantes Ergebnis hingegen lieferten die Zellen, die mit Dienogest stimuliert wurden. Hier kam es zu einem Abfall der MMP-7-Sekretion um ~ 20 pg/ml. Ebenfalls hoch signifikant stellte sich die MMP-7 Sekretion der Zellen dar, die mit beiden Hormonen stimuliert wurden. Die Reduktion betrug hier ~ 40 pg/ml verglichen mit den unbehandelten Zellen, was auf einen synergistischen Effekt hinweisen könnte (vgl. Diskussion).

Ergebnisse

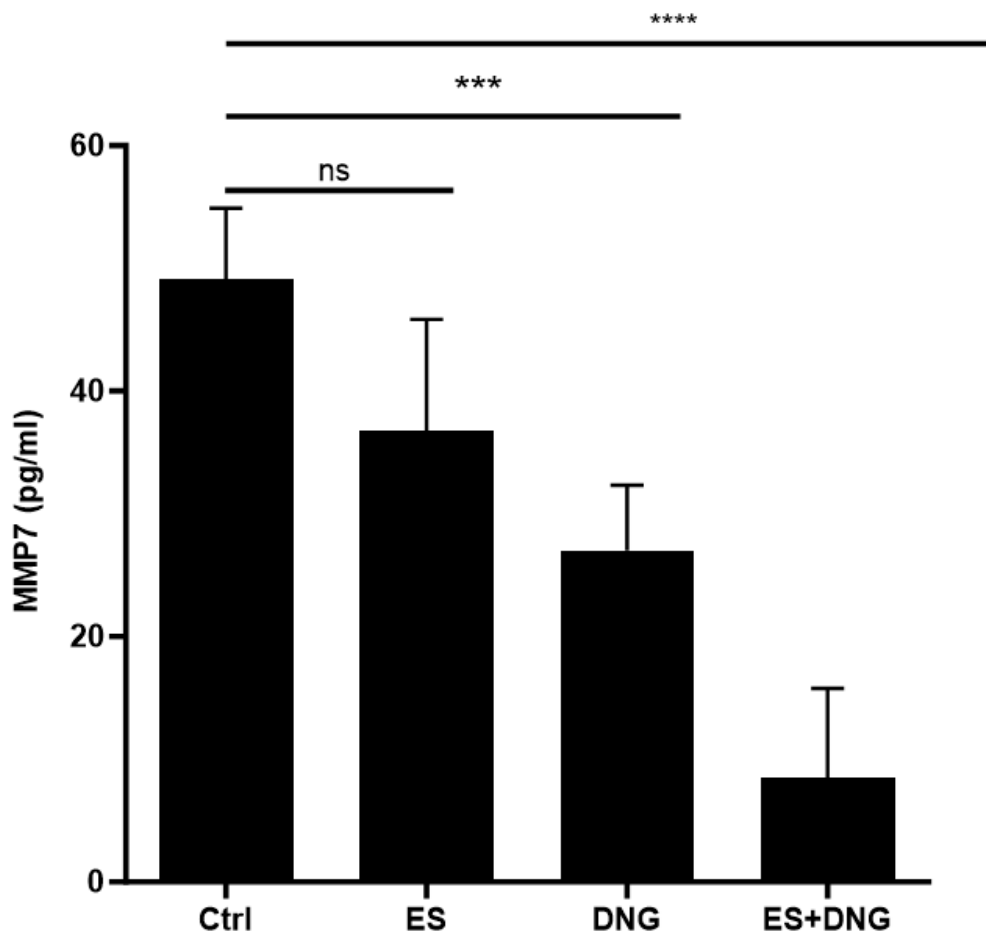


Abbildung 14: Darstellung der MMP-7 Sekretion (pg/ml) in eCRC560 nach Stimulation mit E2 und Dienogest in indirekter Kokultur mit HPESC560; die Ergebnisse zeigen eine Abnahme der MMP-7 Sekretion unter Stimulation mit beiden Hormonen, sowohl einzeln als auch in der Kombination. Den stärksten Abfall zeigt die gleichzeitige Stimulation mit E2 und Dienogest.; Ctrl = Kontrollgruppe; DNG = Dienogest; ES = E2; ns = nicht signifikant; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

3.8 Experimente zur narbenlosen Wundheilung im Rahmen der Menstruation

3.8.1 Charakterisierung der Zelllinie HPESC560

Die HPESC560 ist eine humane endometriale Stromazelllinie, die unter den gleichen Bedingungen wie die oben genannte eCRC560 gewonnen wurde. Charakterisiert wurden die Zellen anhand ihrer Morphologie, sowie mittels der Stromazell-Marker CD10 und CD248 (Mwaura et al. 2022). Die **Abbildung 15** zeigt die Zellen nach mehrtägiger Kultivierung. Es ließ sich eine vollständige Konfluenz erkennen. Ebenfalls zeigten sie eine typische Fibroblasten-Morphologie mit platten, spindelförmigen, langgezogenen Zellkörpern.

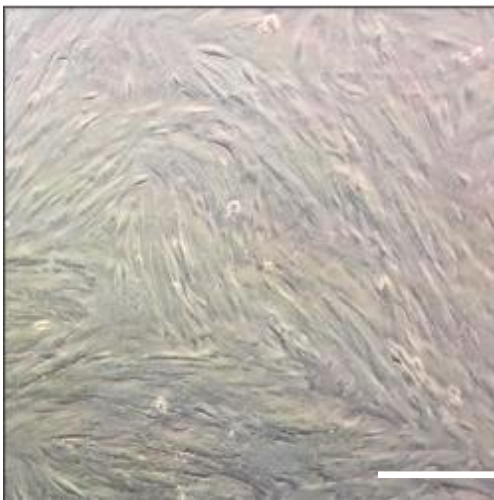


Abbildung 15: *Phasen-Kontrast-Mikroskopie kultivierter HPESC560; Maßstabsleiste 200 μ M*

3.8.2 Effekt von IL1 α auf die Expression von CD26 in HPESC560

CD26 ist ein membranständiges Glykoprotein, welches in endometrialen Drüsen vorkommt. In endometrialem Stroma hingegen wird CD26 nicht exprimiert (Kajiyama et al. 2003). Das Protein CD26 ist mit Narbenbildung assoziiert. Die Abwesenheit dieses Proteins in den stromalen Zellen des Endometriums könnte einen Grund für die narbenlose Wundheilung dieses Gewebes im Rahmen der Menstruation darstellen.

Deshalb wurde in den folgenden Experimenten versucht, eine Induktion der CD26 Expression in HPESC560 zu erzielen. In der von Nemoto et al. (1999) durchgeführten Studie zur Expression von CD26 in gingivalen Fibroblasten wurde eine Expression von CD26 durch IL1 α Stimulation erzielt.

Ergebnisse

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde deshalb im ersten Schritt eine Stimulation von CD26 negativen HPESC560 mit verschiedenen Konzentrationen an IL1 α (5, 10, 20, 50 ng/mL) durchgeführt. Die Stimulation erfolgte über 24 h oder 48 h. Die Expression von CD26 wurde anhand von Western Blots analysiert, wobei GAPDH zur Normalisierung verwendet wurde.

Die **Abbildung 16** zeigt repräsentative Western Blots und die korrespondierenden densitometrischen Auswertungen. Es ist die Expression von CD26/GAPDH als Prozentsatz der Kontrollgruppe (Ctrl = 100 %) aufgezeigt. Wie in der Grafik zu sehen, kam es zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der CD26 Expression in HPESC560 unter Stimulation mit IL1 α .

Im **Diagramm A der Abbildung 16** lässt sich die Expression von CD26 nach Stimulation mit IL1 α für 24 h ablesen. Es kam auch hier zu einer Steigerung der Expression, wobei die Konzentration von 10 ng/ml den größten Anstieg um ~ 60 % des Kontrollwertes verzeichnete. Keiner der über 24 h Stunden erzielten Werte stellte sich jedoch als statistisch signifikant dar.

Das **Diagramm B der Abbildung 16** zeigt die Expression von CD26 nach IL1 α - Stimulation über 48 h. Es kam zu statistisch sehr signifikanten Ergebnissen nach Stimulation mit 20 ng/ml und 50 ng/ml. Die Expression stieg auf das Sechsfache des Wertes der Kontrollgruppe an. Die geringeren Konzentrationen (5 ng/ml und 10 ng/ml IL1 α) verzeichneten nur einen leichten, nicht signifikanten Anstieg von 20 – 30 %.

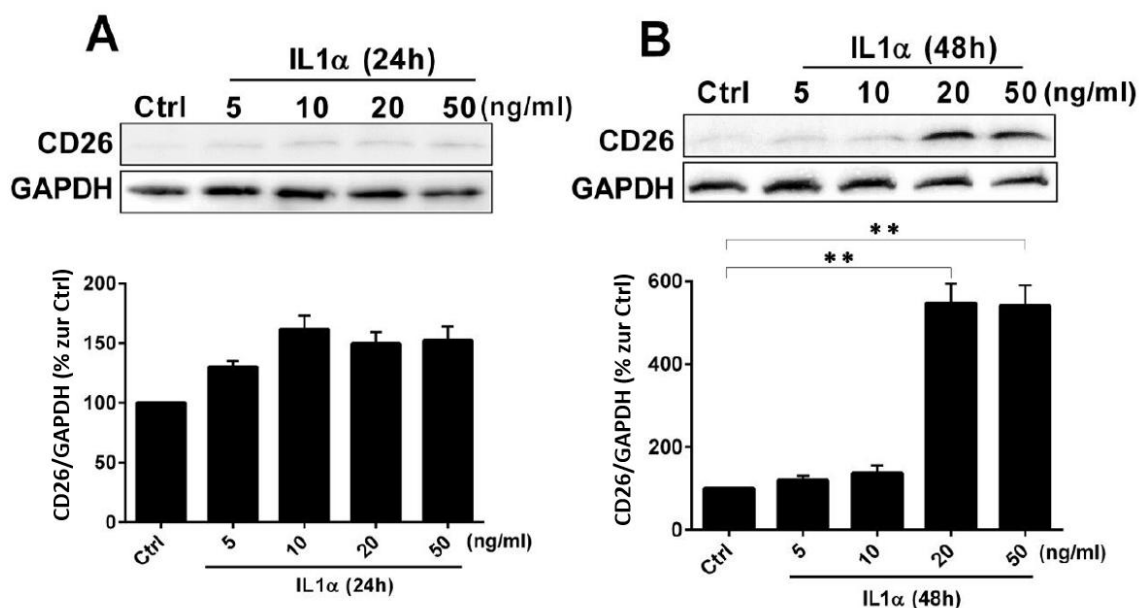


Abbildung 16: Darstellung der Expression von CD26 in HPESC560 nach Stimulation mit A) IL1α über 24h und B) IL1α über 48h (Ctrl = 100 %); die Ergebnisse zeigen eine konzentrations- und zeitabhängige Verstärkung der CD26 Expression unter Stimulation mit IL1α; Ctrl = Kontrollgruppe; ** P < 0,01; molekulares Gewicht CD26 110 kDa; GAPDH 36 kDa

3.8.3 Expression von CD26 unter Stimulation von HPESC560 mit Diprotin A und IL1α

Um den Effekt von IL1α auf die Expression von CD26 in HPESC560 zu inhibieren, wurde in den folgenden Experimenten der CD26 Inhibitor Diprotin A (DPA) verwendet.

Die HPESC560 wurden zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 10, 20, 50, 100 μM) an DPA behandelt und zusätzlich mit 20 ng/ml IL1α über 48 h stimuliert. Diese Konzentration hatte sich in den vorherigen Experimenten als statistisch signifikant erwiesen.

Die Analyse der Werte erfolgte im Western Blot, wobei GAPDH erneut zur Normalisierung verwendet wurde. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung von CD26/GAPDH als Prozentsatz zur Kontrollgruppe.

In **Abbildung 17** erkennt man einen Anstieg der CD26 Expression unter Stimulation mit IL1α, welcher durch DPA wieder aufgehoben wurde. Es zeigte sich eine sehr signifikante Erhöhung nach IL1α Stimulation ohne DPA-Behandlung. Diese betrug das Siebenfache der Kontrollgruppe. Sobald die Konzentration von DPA erhöht

Ergebnisse

wurde (10 μM oder 20 μM), kam es verglichen mit der IL1 α -Gruppe zu einem signifikanten Abfall von $\sim 500\%$. Ein Abfall um weitere $\sim 100\%$ ließ sich nach Erhöhung der DPA-Konzentration auf 50 μM und 100 μM erzielen.

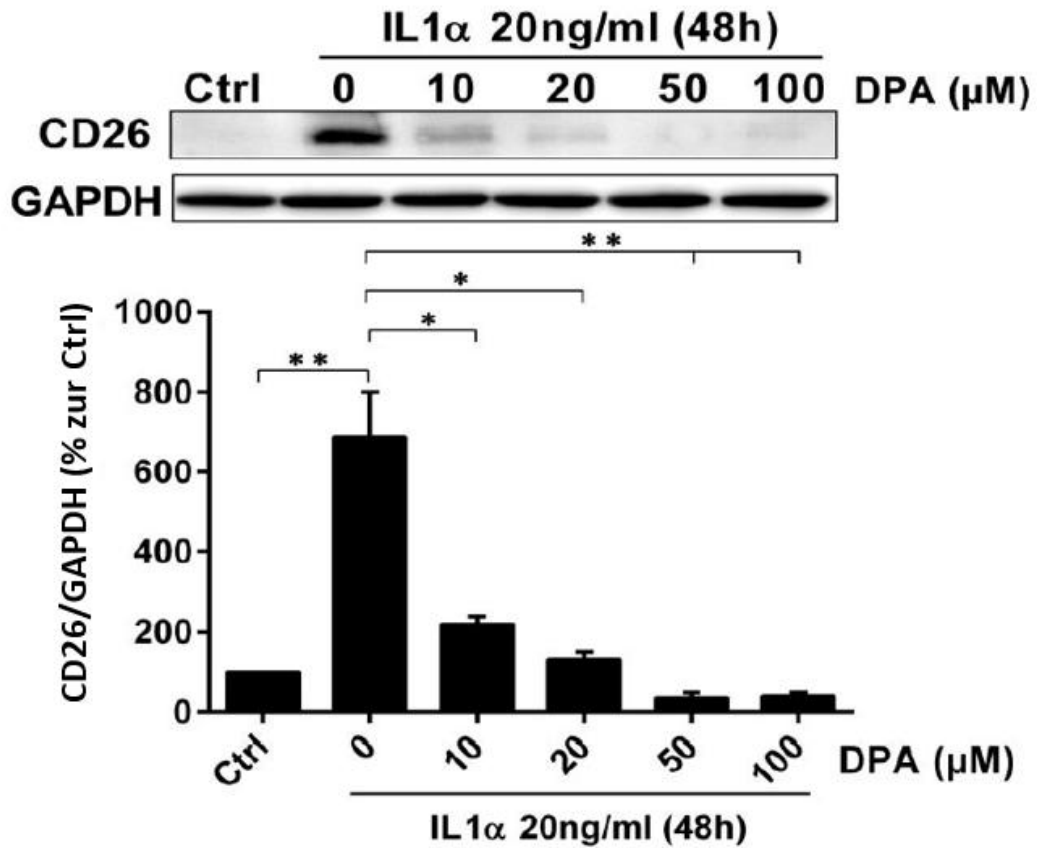


Abbildung 17: Darstellung der Expression von CD26 in HPESC560 nach Stimulation mit IL1 α und Diprotin A (DPA) über 48h (Ctrl = 100 %); die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Anstieg der CD26 Expression unter Stimulation mit IL1 α . Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit DPA kam es zu einem starken konzentrationsabhängigen Abfall der CD26 Expression. (Ctrl = 100 %) Ctrl = Kontrollgruppe; * $P \leq 0,05$; ** $P < 0,01$; molekulares Gewicht CD26: 110 kDa; GAPDH: 36 kD

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sexualhormone E2 und Dienogest (DNG) einen Einfluss auf das Verhalten von eCRC560 und HPESC560 innerhalb und außerhalb des Zellverbandes haben. Gezeigt werden konnte außerdem, dass die Sekretion von MMP7 ebenfalls durch diese Hormone beeinflusst wird.

Es wurde beobachtet, dass E2 und Dienogest die Protein-Expression des Zellkontaktproteins ZO1 in den Zellen verändern. Durch Stimulation mit E2 konnte diese signifikant verringert werden, während eine Stimulation mit Dienogest zu einer Steigerung der Expression führte. Wurden die Zellen beiden Hormonen ausgesetzt, kam es zu einem synergistischen Effekt und damit zu einer weiteren Steigerung der Expression von ZO1. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit E2 zu einer Abnahme des transepithelialen elektrischen Widerstands und eine Stimulation mit Dienogest zu einer Zunahme dessen führte. Eine Behandlung mit beiden Hormonen führte ebenfalls zu einer Zunahme des Widerstands.

Es ließ sich zudem eine verstärkte Migration der eCRC560 unter E2-Einfluss erkennen, was im Migrations-Assay gezeigt werden konnte. Dienogest wiederum führte zu einer Abnahme der Migration sowohl bei alleiniger Gabe als auch zusammen mit E2. Gleiches zeigte sich in Bezug auf die Invasivität. Auch hier konnten nach Stimulation mit E2 vermehrt invasive Zellen beobachtet werden. Dienogest führte zu einer Verringerung der Invasivität.

Zusätzlich zeigten Dienogest und E2 einen Einfluss auf die Sekretion von MMP7 durch eCRC560, die durch Dienogest signifikant gesenkt werden konnte. Eine noch größere Reduktion der MMP7-Sekretion zeigte sich unter Stimulation mit beiden Hormonen, was auf einen synergistischen Effekt hinweist.

In Bezug auf die Ergebnisse zur narbenlosen Wundheilung im Rahmen der Menstruation konnte durch die Stimulation von HPESC560 mit IL1 α eine deutliche Protein Expression von CD26 beobachtet werden. Dieser Effekt konnte vollständig durch Diprotin A aufgehoben werden.

4.1 Effekt von Östrogen und Progesteron auf den TEER in eCRC560

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass E2 zu einer Reduktion des TEERs in eCRC560 führt. Progesteron konnte diese Effekte vollständig antagonisieren und

führte sowohl bei gemeinsamer Stimulation mit Östrogen als auch bei alleiniger Gabe zu einer Erhöhung des TEERs.

Bei dem transepithelialen elektrischen Widerstand handelt es sich um einen Parameter, der genutzt wird um den parazellulären Ionenfluss der Epithelzellen darzustellen (Chen et al. 2015). Aufrechterhalten wird dieser durch die apikalen beziehungsweise basolateralen Plasmamembranen und die Zell-Zell-/Zell-Substrat-Kontakte. Es konnte gezeigt werden, dass spezifische Zellkontakt-Proteine einen großen Einfluss auf den transepithelialen Widerstand haben (Anderson 2001). Die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass eine Stimulation mit E2 zu einem Abfall des TEERs führte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Hormon Einfluss auf die Beschaffenheit und Expression bestimmter Zellkontakt-Proteine nimmt. Durch die Verringerung des TEERs kommt es zu einer Erhöhung der Permeabilität und zu einer verstärkten Ionenleitfähigkeit der Zellen (Srinivasan et al. 2015).

In der Studie von Grant-Tschudy und Wira (2004) konnte ebenfalls eine Reduktion des TEERs unter Östrogen-Einfluss in endometrialen Epithelzellen von Mäusen nachgewiesen werden. Auch zeigte sich hier ein Zusammenhang dieser Reduktion mit der Expression von MMPs. Gorodeski (2007) berichtet über ähnliche Ergebnisse. In seiner Studie konnte der TEER in hEVEC Zellen (vaginale Plattenepithelzellen der Ektozervix) durch die Stimulation mit Östrogen gesenkt werden. Zusätzlich konnte eine Reduktion des Widerstandes der Tight Junctions gezeigt werden. Die Behandlung mit extrazellulären Proteasen wie MMP-2 verringerte den TEER.

Gegenteiliges berichteten Ayejunie et al. (2015). Östrogen führte in dieser Studie, welche ebenfalls an vaginalen Epithelzellen durchgeführt wurde, zu einer Erhöhung des TEERs. Im Unterschied zu Gorodeski (2007) kam hier jedoch ein vaginales Gewebemodell zum Einsatz, welches neben Epithelzellen auch Fibroblasten enthielt.

Grant-Tschudy und Wira (2004) untersuchten neben dem Einfluss von Östrogen auf den TEER ebenfalls andere Sexualhormone wie Progesteron. Hier zeigten sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen jedoch keine Effekte auf den TEER in den untersuchten endometrialen Epithelzellen. Ein Grund hierfür könnten die in der genannten Studie nicht verwendeten Stromazellen sein, die gegebenenfalls eine Rolle in der Vermittlung des Progesteron-Effekts spielen (Kurita et al. 1998). Für Caco-2-Zellen hingegen gelang es Zhou et al. (2019) den protektiven Einfluss von

Progesteron auf den TEER zu zeigen. Dieser Effekt sei auf die vermehrte Expression des Tight Junction-Proteins Occludin zurückzuführen.

Im Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Studien zeigen sich Überschneidungen, die unsere These stützen, dass der TEER in eCRC560 durch E2 reduziert und durch Dienogest erhöht wird (Grant-Tschudy und Wira 2004; Gorodeski 2007; Zhou et al. 2019). Unterschiede lassen sich durch die verwendeten Modelle erklären, da in den meisten Studien nur Epithelzellen mit einbezogen wurden.

4.2 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf die Expression von ZO1 in eCRC560

Die eCRC560 zeigten unter Stimulation mit E2 eine Abnahme der Expression von ZO1. Es konnte sowohl eine quantitative Abnahme im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Es lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse darauf schließen, dass unter anderem die verminderte Expression von ZO1 unter E2-Einfluss zu einer Verminderung des transepithelialen elektrischen Widerstands führt.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Zhou et al. (2019). Aus der Studie geht hervor, dass die Zellkontakt-Proteine Claudin, Occludin und Zonula Occludentes (ZO1,-2,-3) eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Zellen innehaben. Auf dieser Grundlage schlussfolgern die Autoren, dass die verminderte Expression von Occludin verantwortlich für die Reduktion des TEERs in den von ihnen durchgeführten Experimenten sei.

In einer weiteren Studie desselben Autors konnte, ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, ein Effekt von Östrogen auf die Expression von ZO1 in Caco-2 Zellen und humanem Darmgewebe beobachtet werden (Zhou et al. 2017). So führte die Stimulation mit Östrogen zu einem Abfall der ZO1-Expression im Western Blot und Immunfluoreszenz. Auch kam es zu einer Inhibition der Transkription der ZO1-mRNA. Es konnte durch die Immunfluoreszenz zudem eine im Allgemeinen schwächere Expression von ZO1 in weiblichem gegenüber männlichem Darmgewebe gezeigt werden. Dieses stehe laut Zhou et al. (2017) in Zusammenhang mit erhöhten Konzentrationen an Östrogen im weiblichen Körper.

In der Studie von van der Giessen et al. (2019) wurde ebenfalls die Expression von Zellkontakt-Proteinen wie ZO1 untersucht. Die Experimente erfolgten in einem

Organoid-Modell aus humanem Darmgewebe und die Expression von ZO1 wurde mittels PCR ermittelt. Es zeigte sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine Verstärkung der ZO1 Expression unter sowohl Östrogen- als auch Progesteron-Einfluss. In den Experimenten von Zhu et al. (2022) wurden Mamma-Epithelzellen der Ziege (GMECs) untersucht. Hier führte die alleinige Stimulation mit Progesteron ebenfalls zu einer Steigerung der Expression von ZO1, Claudin-1 und Claudin-3. Östrogen führte zu einer Beschleunigung der Expression von ZO1, Claudin-1 und Claudin-3. Beide Hormone hatten also jeweils einen positiven Einfluss auf die Expression der Zellkontakt-Proteine (Zhou et al. 2017; Zhou et al. 2019; Zhu et al. 2022).

Auch in der Studie von Oh et al. (2016) zeigte sich in vaginalem Epithel von weiblichen Sprague-Dawley Ratten ein positiver Effekt von Östrogen auf die Expression von ZO1. Unter Östrogen-Deprivation der Ratten zeigte sich ein Abfall der ZO1 Expression. Nach Stimulation mit Östrogen erholte sich die Expression von ZO1 und stieg auf das Ausgangsniveau.

Diese Arbeit kommt zu ähnlichen Ergebnissen wie auch andere in Zellkultur durchgeführte Studien (Zhu et al. 2022). Wir können entsprechend davon ausgehen, dass E2 in einigen Zelllinien zu einer Verringerung der Expression von ZO1 führt. Der Umstand, dass die letztgenannte Studie von Oh et al. (2016) zu anderen Ergebnissen kam, könnte darauf hinweisen, dass *in vivo* durch den Einfluss von Östrogen Prozesse ablaufen, die in der von uns durchgeführten Zellkultur nicht dargestellt werden konnten. Andererseits könnte die Stimulation mit Östrogen in den von Oh et al. (2016) und Zhu et al. (2022) betrachteten Zellen auch andere Effekte als in den von uns untersuchten endometrialen Zellen haben. Ein Grund hierfür könnte die Existenz von drei Östrogen Rezeptoren (ERs) sein, deren Expression in den Zellen oder Gewebekulturen weder in dieser Arbeit noch in den erwähnten Studien analysiert wurde. Namentlich sind diese Rezeptoren ER α , ER β und der membranständige Rezeptor GPR30 (Katzenellenbogen et al. 2000; Dahlman-Wright et al. 2006). Endometriale Epithelzellen, wie die von uns untersuchte Zelllinie eCRC560 sind ER α ⁺ und ER β ⁻, während das von van der Giessen et al. (2019) verwendete Darmgewebe vermehrt den ER β exprimiert (www.proteinatlas.org). Auch in Mamma-Epithelzellen konnte eine verstärkte Expression von ER β gegenüber ER α gezeigt werden (Zeps et al. 1999). Somit könnten die von unseren Beobachtungen abweichenden Ergebnisse von van der

Giessen et al. (2019) und Zhu et al. (2022) auf verschiedene ER-vermittelte Östrogen-Effekte zurückzuführen sein. Die von Oh et al. (2016) verwendeten vaginalen Epithelzellen exprimieren ER α und ER β in einem ähnlichen Verhältnis wie endometriale Epithelzellen. Aus dem Protein Atlas (www.proteinatlas.org) geht jedoch nicht hervor, ob und wie stark die Expression des membranständigen ERs in vaginalen Epithelzellen ist. Sollte sich die Ausprägung dieses Rezeptors in den beiden Zelltypen unterscheiden, wäre das ebenfalls ein Hinweis auf die Ursache der voneinander abweichenden Ergebnisse.

Die Steigerung der Expression von ZO1 unter Dienogest Einfluss konnte in anderen Studien (van der Giessen et al. 2019; Zhu et al. 2022) bestätigt werden. Es lässt sich festhalten, dass ein Effekt von Dienogest und E2 auf die in dieser Arbeit untersuchte eCRC560 Zellen und auch auf andere Epithelzelltypen nachweisbar ist. Ob E2 zu einer Verstärkung oder Reduktion der Protein-Expression von ZO1 führt, könnte mit der jeweiligen Ausprägung der Östrogenrezeptoren in den beobachteten Zellen oder Geweben zusammenhängen.

4.3 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf die Migration und Invasivität von eCRC560

In unseren Experimenten konnte eine Steigerung der Migration und der Invasivität von eCRC560 unter E2-Einfluss beobachtet werden. Durch die Stimulation mit Dienogest kam es zu einer Erniedrigung beider Parameter sowohl unter alleiniger Stimulation als auch gemeinsam mit E2.

Eine verstärkte Invasivität ist sowohl für die Ausbildung von Endometriose-Herden als auch in der Tumor-Pathogenese relevant, jedoch führt sie allein weder zu einer Etablierung von Endometriose-Läsionen noch zu Metastasen. Für die Dissemination von Tumorzellen ist primär eine Degradation des Gewebes nötig. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Chemokin-vermittelten Migration der Zellen (Welch und Hurst 2019). In uterinem Gewebe kommt es jedoch in regelmäßigen Abständen physiologischerweise zu einer Dissemination. Epithelzellen lösen sich im Rahmen der Menstruation aus dem Gewebe und gelangen durch die Kontraktion des Uterus und der Eileiter in die Peritonealhöhle. Dort können die Zellen am Peritoneum adhären. Die Zellen müssen hierfür die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix des Peritoneums durchdringen (Nap et al. 2004), wofür eine gewisse Invasivität notwendig ist. Die Etablierung eines Endometriose-Herdes

erfordert, neben der Invasivität der Zellen, im Verlauf jedoch zusätzlich eine Kolonialisierung des Sekundärgewebes.

Über die gesteigerte Invasivität von Endometriose-Läsionen berichten auch Hudelist et al. (2005b), jedoch wurden hier endometriotische Zellen und keine endometrialen Zellen verwendet. Eine weitere Studie weist zusätzlich auf den Zusammenhang einer Deregulation bestimmter Zell-Zell-Adhäsions-Proteine mit der erhöhten Invasivität von Endometriose-Zellen hin (Monnin et al. 2023). Dieses steht in Einklang mit der in dieser Arbeit gezeigten Verminderung der Expression von ZO1 unter Östrogen-Einfluss. Eine Verstärkung der Invasivität und Proliferation unter Östrogen-Einfluss konnte ebenfalls in Zellen von Endometrialzell-Carcinomen beobachtet werden (Zou et al. 2011; Makker und Goel 2016). Eine vermehrte Migration und Invasion durch Östrogen zeigte sich zudem in endometrialen Stromazellen (Li et al. 2020).

Unsere Beobachtungen bezüglich der Wirkung von Dienogest auf die Migration und Invasivität in eCRC560 decken sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie. So berichteten Clemenza et al. (2023) von einer Verringerung der Invasivität von Endometriose-Läsionen unter Therapie mit synthetischem Progesteron.

Bedacht werden muss bei Interpretation unserer Ergebnisse, dass eine Stimulation mit E2 in indirekter Kokultur mit HPESC560, neben der Steigerung der Migration und Invasivität, zu einer Erhöhung der Zellzahl führte. Die Ergebnisse der Invasions- und Migrations-Assays könnten also insofern verfälscht sein, als dass die Steigerung dieser beiden Parameter vornehmlich durch eine größere Menge an Zellen hervorgerufen wurde. Es wurde jedoch zu Beginn der Assays je Gruppe dieselbe Anzahl an Zellen ausgesät. Die Zahl der Zellen hätte sich also nur noch in einem geringen Maße verändern können. Zusätzlich wurden die Zellen in nährstoffarmem Medium inkubiert, was das Wachstum dieser noch weiter reduzierte. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass das erhöhte Wachstum unter E2-Stimulation, die Migration und Invasivität beeinflusst haben könnte.

Unsere Ergebnisse und der Vergleich mit anderen Studien (Zou et al. 2011; Makker und Goel 2016; Li et al. 2020) weisen generell auf eine Erhöhung der Migration und Invasivität endometrialer Epithelzellen unter E2-Einfluss hin. Zusätzlich konnte ein möglicher Zusammenhang mit der verminderten Expression von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen aufgezeigt werden (Monnin et al. 2023). Es zeigte sich zudem in unseren

Ergebnissen und auch in der Studie von Clemenza et al. (2023), dass Progesteron die Östrogen-vermittelte Verstärkung der Migration und Invasivität inhibiert. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Progesteron ebenfalls der Progression bzw. der Entstehung der Endometriose als östrogenabhängige Erkrankung entgegenwirken könnte.

4.4 Effekt von 17- β -Estradiol und Dienogest auf die Sekretion von MMP7 in eCRC560

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von eCRC560 mit E2 in indirekter Kokultur mit HPESC560 zu einer Reduktion der MMP7-Sekretion führte. Die Stimulation mit Dienogest oder einer Kombination aus beiden Hormonen verringerte die Sekretion noch stärker. MMP7 ist eine Matrix-Metalloproteinase, die in Zusammenhang mit physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen steht. Sie ist unter anderem involviert in Wundheilung und Geburt, jedoch auch in Tumorangio-genese und Tumorzellinvasion (Singer et al. 1997; Singer et al. 2002; Hudelist et al. 2005b). Unsere Beobachtungen, bezogen auf den Effekt auf die MMP7-Sekretion unter E2-Stimulation, widersprechen dem erwarteten Ergebnis. Anders als in vorherigen Studien gezeigt (Russo et al. 2009), konnte durch E2 keine Steigerung der MMP7-Sekretion erzielt werden.

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die eCRC560 unter E2-Einfluss eine verstärkte Migration und Invasivität zeigen. Sowohl wir als auch Gorodeski (2007) konnten zudem eine Verminderung des TEERs durch Östrogen beobachten. Gorodeski (2007) zeigte außerdem, dass der Östrogen-Effekt auf den TEER in hVEEC (humanen vaginalen ekto-zervikalen Plattenepithelzellen) ebenfalls durch MMP7 vermittelt werden kann. Aufgrund dieser Vorergebnisse hätte erwartet werden können, dass sich die Sekretion der MMPs unter E2-Einfluss erhöht. Gleiches konnte auch bereits in anderen Studien gezeigt werden. So berichten Curry und Osteen (2001) von einer verstärkten MMP7 Expression im Endometrium von Nagetieren während östrogenreicher Phasen des Zyklus. Außerdem konnte, während des Anstiegs der Östrogen-Konzentration in der Proliferationsphase, eine fokal verstärkte Aktivität von MMP7 in den Drüsen des Endometriums festgestellt werden (Osteen et al. 1996; Osteen et al. 2003). Russo et al. (2009) beobachteten in Sprague Dawley Ratten ebenfalls eine Erhöhung der MMP7-Expression in uterinem Gewebe. Des Weiteren zeigte sich ein

Zusammenhang der verstärkten MMP-Expression mit der Zunahme der stromalen Kollagen-Dichte unter Östrogen-Einfluss. Bei Betrachtung der aufgezeigten Studien ist jedoch auffällig, dass ein Effekt von Östrogen auf die MMP7-Sekretion bisher nur *in vivo* gezeigt wurde. Auch Osteen et al. (1996) berichten davon, dass sie ihrerseits keinen signifikanten Effekt von Östrogen auf die Sekretion von MMPs *in vitro* beobachten konnten. Es ist zu vermuten, dass bei der Interaktion von Östrogen und endometrialen Epithelzellen weitere Faktoren eine Rolle spielen, die in unseren und in anderen Experimenten *in vitro* nicht abgebildet werden konnten.

In unseren Ergebnissen konnte eine Reduktion der MMP7-Sekretion unter Dienogest-Stimulation gezeigt werden. Es ließ sich zusätzlich ein noch stärkerer Abfall unter Stimulation mit beiden Hormonen beobachten, was auf einen synergistischen Effekt von E2 und Dienogest auf die Reduktion der MMP7-Induktion hindeutet. Osteen et al. (1994) zeigten denselben Effekt in humanem nicht menstruellem Gewebe. Auch hier potenzierte sich die inhibitorische Wirkung von Progesteron auf die MMP7-Sekretion unter zusätzlicher Östrogen-Stimulation. Östrogen allein hatte keinen Effekt auf die MMP7-Sekretion. Der stimulierende Effekt von Östrogen auf den Progesteronrezeptor-Spiegel (PR-Spiegel) in uterinem Gewebe konnte bereits von Katzenellenbogen (1980) gezeigt werden. Hierbei ist allgemein bekannt, dass das Estrogen-Response-Element (ERE) mit Östrogenrezeptoren (ERs) interagieren kann und so die Östrogen-Antwort mediiert (Zhang und Wang 2023). Über die Interaktion mit dem ER α kommt es dann zu einer verstärkten Produktion an PR (Petz et al. 2004). Dieser Mechanismus könnte im Folgenden zu einer Steigerung der Progesteron-Wirkung führen.

Eine Reduktion der MMP7-Sekretion unter alleiniger Progesteron-Stimulation zeigte sich auch bei Osteen et al. (1994). Hier konnte zusätzlich die Abhängigkeit der epithelialen MMP7-Sekretion in Anwesenheit von Stromazellen demonstriert werden. Die Inhibition der MMP7-Sekretion gelang ausschließlich in Kokultur mit Stromazellen. In Monokultur zeigten die Epithelzellen keinen Effekt auf die Progesteron-Stimulation. Osteen et al. (1994) schlussfolgerten aus diesem Grund, dass der Effekt des Progesterons durch einen löslichen Faktor seitens der Stromazellen mediiert werden müsse.

Rudolph-Owen et al. (1998) führten einen Progesteron-Entzug in Rhesusaffen durch und konnten im Anschluss eine Steigerung der MMP7-Expression feststellen. So demonstrierten sie die Inhibition der MMP7-Expression durch Progesteron.

Unsere Ergebnisse stehen zu großen Teilen in Einklang mit den Beobachtungen von Osteen et al. (1996) und Rudolph-Owen et al. (1998). Es konnte eine Reduktion der MMP7-Sekretion unter Dienogest-Einfluss und eine synergistische Wirkung in Kombination mit E2 gezeigt werden.

4.5 MMP7 in der Pathogenese der Endometriose

Es konnte in einigen Studien bereits gezeigt werden, dass es zu einer verstärkten Expression von MMP1,-2, -7 und -9 in Endometriose-Herden verglichen mit Endometrium-Gewebe gesunder Patientinnen kommt (Wenzl und Heinzl 1998; Chung et al. 2001; Sillem et al. 2001; Ria et al. 2002; Hudelist et al. 2005a). Auch das eutope Endometrium-Gewebe an Endometriose erkrankter Frauen weist eine deutlich erhöhte MMP3 und MMP7 Expression auf. Ebenso konnte eine Verminderung der TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases) festgestellt werden (Chung et al. 2001; Bruner-Tran et al. 2002), die als Gegenspieler der MMPs fungieren.

Die Rolle von MMP7 in der Endometriose konnte von Chatterjee et al. (2018) für die Pathogenese der ovariellen Endometriose demonstriert werden. In dieser Studie zeigte sich eine Assoziation ovarieller Endometriose-Herde mit epithelialer-mesenchymaler-Transition (EMT). Die Zellen verlieren hierbei typischerweise ihre Polarität und es kommt zu einer Störung der Zellkontakte (Kalluri und Weinberg 2009; Diepenbruck und Christofori 2016; Jolly et al. 2017; Dongre und Weinberg 2019; Pei et al. 2019). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die EMT-spezifischen Marker wie Vimentin und N-Cadherin in späten Stadien der ovariellen Endometriose erhöhen, während E-Cadherin vermindert exprimiert wurde. Ein Zusammenhang zwischen MMP7 und EMT konnte durch die Inaktivierung von MMP7 und der damit einhergehenden verminderten EMT gezeigt werden (Chatterjee et al. 2018). Des Weiteren führte die exogene Zugabe von MMP7 in End1/E6E7, einer epithelialen endozervikalen Zelllinie, zu einer Störung der Zell-Zell-Adhäsion und einer Erleichterung der EMT.

Vorherige Studien berichten in diesem Kontext über einen Signalweg, durch welchen die Aktivierung von MMP7 zu vermehrter partieller EMT in End1/E6E7 führt (Chatterjee et al. 2018). MMP7 sorgt in diesem Prozess für die Abspaltung von E-Cadherin und den darauffolgenden Verlust der Zell-Adhärenz. Des Weiteren kommt es außerdem zu der durch slug-mediierten transkriptionellen Aktivierung

von Vimentin und N-Cadherin, wodurch die Zellen mesenchymale Eigenschaften annehmen. Die Aktivierung von MMP7 verläuft über den EGFR-ERK1-AP1-Signalweg (Chatterjee et al. 2018). Durch Phosphorylierung von EGFR kommt es zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges, wodurch unter anderem ERK1 phosphoryliert wird. Es kommt anschließend zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Proteins AP-1, was durch die Bindung an die MMP7-Promoter-Region zu einer Hochregulierung der Transkription dieses Proteins führt (Chatterjee et al. 2018).

In einer weiteren Studie konnte zudem eine Verknüpfung dieses Signalweges mit der Rolle von Östrogen in der Endometriose geschaffen werden. Filardo (2002) berichtet von einer östrogenvermittelten Aktivierung der γ -Domäne von GPR30 (G-protein-coupled-receptor 30) und einer Kinase der SRC-Familie. Diese Aktivierung führt dazu, dass HB-EGF frei wird, an den EGF-Rezeptor bindet und somit weiterführende Signalwege ermöglicht. Östrogen führt also durch GPR30 und EGFR über den ERK1/AP-1-Signalweg zu einer vermehrten Transkription von MMP7 und so zu einer Steigerung der EMT.

Die EMT stellt jedoch keine Voraussetzung für die Dissemination endometrialer Zellen im Rahmen der Endometriose dar, da wie bereits erwähnt, physiologische Prozesse, wie die Menstruation und die Kontraktion des Uterus, für eine Ausbreitung der Zellen sorgen. Des Weiteren konnte von Konrad et al. (2020) bei dem Vergleich von mehreren Studien gezeigt werden, dass sich die epithelialen Marker endometrialer Epithelzellen in eutopem Gewebe von Frauen mit und ohne Endometriose nicht signifikant unterscheiden. Auch ein Zuwachs von mesenchymalen Markern konnte nur in wenigen Studien demonstriert werden. Hieraus konnten sie ableiten, dass der epitheliale Phänotyp der endometrialen Zellen bei Frauen mit Endometriose mit einer großen Wahrscheinlichkeit bestehen bleibt. Anders als in vorherigen Studien (Bilyk et al. 2017; Owusu-Akyaw et al. 2019) angedeutet, spielt die EMT in den frühen Phasen der Endometriose und bei dem Verlust der Zell-Zell-Kontakte keine Rolle (Konrad et al. 2020).

Andere Studien konnten außerdem zeigen, dass endometriale Stromazellen nicht aus Epithelzellen hervorgehen, da sie nicht dieselben somatischen Mutationen tragen (Noë et al. 2018; Suda et al. 2019). Die Ergebnisse dieser Studien stehen in Einklang mit den von Konrad et al. (2020) getroffenen Schlussfolgerungen. Noë et al. (2018) und Suda et al. (2019) weisen zwar auf eine geringe Steigerung

mesenchymaler Marker in ektopen Endometriose-Läsionen im Vergleich mit eutopem Endometrium-Gewebe hin, jedoch konnte keine vollständige, sondern nur eine partielle EMT endometrialer Epithelzellen nachgewiesen werden. Der epitheliale Phänotyp der Zellen bleibt dabei bestehen. Für Konrad et al. (2020) ergaben sich, mit Verweis auf die Hypothesen von Koninckx et al. (1998) und Koninckx et al. (1999), die Unterschiede der Entitäten aus der unterschiedlichen Umgebung der Zellen.

Bei Betrachtung der Wirkung von Östrogen und Progesteron auf MMP7-Sekretion und die damit einhergehende Verstärkung der EMT in Endometriose-Läsionen kommt die Frage auf, weshalb Progesteron die Sekretion von MMP7 nicht, wie in dieser Arbeit gezeigt, inhibiert.

Gestagene und damit auch Progesteron gelten als Erstlinien-Therapie für die hormonelle Behandlung der Endometriose (Dt. Gesellschaft f. Gynäkologie u. Geburtshilfe e. V. 2020). Dieses Therapieschema ist effektiv in der Behandlung von Endometriose-assoziiertem Schmerz und führt zu einer Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patientinnen (Zito et al. 2014). Jedoch zeigt die Therapie mit synthetischen Progesteron-Derivaten wie Dienogest in einem Drittel der weltweit wegen Endometriose behandelten Patientinnen keinen Erfolg. Dieser Umstand ist laut Donnez und Dolmans (2021) auf eine Progesteron-Resistenz der Endometriose-Herde zurückzuführen. Progesteron-Resistenz ist definiert als die Reaktionslosigkeit des Endometriums auf Progesteron und die damit einhergehende Dysregulation des Progesteron-Signalweges, was im Endeffekt zu einer verringerten Progesteron-Wirkung führt (MacLean und Hayashi 2022).

Die Wirkung von Progesteron im Endometrium wird über die Progesteronrezeptoren vermittelt. PR-B erhöht nach Bindung eines Liganden die durch ihn vermittelte transkriptionelle Aktivität. Diese wird von PR-A, dessen transkriptionelle Aktivität schwächer ist, unterdrückt (Bedaiwy et al. 2015). Prentice et al. (1992) sowie Bergqvist und Fernö (1993) konnten eine deutlich geringere Expression von PR in Endometriose-Herden im Vergleich zu eutopem Endometrium zeigen. Des Weiteren stellten Attia et al. (2000) und Reis et al. (2020) fest, dass das Verhältnis von PR-A zu PR-B in ektopem Endometrium-Gewebe deutlich auf der Seite von PR-A liegt. Es lässt sich auf dieser Grundlage also auf eine im Allgemeinen schwächere Wirkung von Progesteron in ektopen Läsionen schließen.

Wie bereits erwähnt kann die Synthese von PR durch die Interaktion mit ERs gesteigert werden. Hierbei spielt vor allem der Östrogenrezeptor α (ER α) eine Rolle (Petz et al. 2004).

Die Expression von ER α kann durch den Östrogenrezeptor β (ER β), welcher der vorherrschende Östrogenrezeptor in Endometriose-Läsionen ist, unterdrückt werden (Taraborrelli 2015). Trukhacheva et al. (2009) und Chen et al. (2020) gehen davon aus, dass die Dominanz des ER β in der Endometriose zu einer Inhibierung der ER α mediierten Synthese von PR führt. Die veränderte Expression oder Ansprechbarkeit von Progesteron- und Östrogenrezeptoren in den Endometriose-Herden führt also neben weiteren Faktoren zu einer geringeren Wirkung von Progesteron in diesem Gewebe. Dieser Umstand konnte ebenfalls von Flores et al. (2018) gezeigt werden. Sie demonstrierten einen engen Zusammenhang der Expression von PR in Endometriose-Läsionen und der Wirkung progesteronbasierter Therapien. Patientinnen, die nicht auf diese Therapien ansprachen, zeigten signifikant geringere PR-Spiegel als jene Patientinnen, die gut auf progesteronbasierte Präparate ansprachen. Auf dieser Grundlage gelang es Flores et al. (2018) anhand des PR-Status von Patientinnen, eine Prognose zur Wirkung von Progesteron auf Endometriose-assoziierte Beschwerden vorherzusagen. In einer weiteren Studie konnten es Flores et al. (2025) außerdem zeigen, dass ein veränderter PR-Status zu einer aggressiveren Form der Endometriose führen kann. Gegebenenfalls könnte eine Progesteron-Resistenz sogar einen stärkeren Faktor in der Entstehung und Progression von Endometriose darstellen als die Östrogendominanz.

Da die in dieser Arbeit verwendeten eCRC560 aus eutopem endometrialen Gewebe stammen, kann davon ausgegangen werden, dass sie eine physiologische Ausprägung an Steroidhormon-Rezeptoren besitzen. Eine veränderte Rezeptorausprägung konnte nur in ektopem endometrialem Gewebe gezeigt werden (Prentice et al. 1992). Die erwähnte Progesteron-Resistenz kam deshalb in den verwendeten Zellen nicht zum Tragen. Aus diesem Grund konnte, anders als in Endometriose-Läsionen, eine Inhibition der MMP7-Sekretion unter Dienogest-Einfluss und die Potenzierung dessen unter zusätzlicher Stimulation mit E2 gezeigt werden.

Ein weiterer Signalweg, welcher in der Expression von MMP7 potenziell eine Rolle spielt, verläuft über den transforming growth factor β (TGF- β). Die über diesen Liganden vermittelte Hemmung der endometrialen MMP7-Expression durch

Progesteron wurde bereits von Bruner-Tran et al. (2002) beschrieben. Angehörige der TGF- β -Superfamilie sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung normaler Zell-Funktionen (Derynck et al. 2001; Omwandho et al. 2010). Die TGF- β -Liganden binden an ihren jeweiligen Rezeptor an der Zelloberfläche und es kommt im Folgenden zu einer Phosphorylierung und Aktivierung nachgeschalteter Proteine wie SMAD3. Diese können über die Bindung an SMAD4 in den Nucleus wandern und dort die Transkription von Ziel-Genen beeinflussen (Moustakas et al. 2001). Eine Erhöhung von TGF- β s in Endometriose-Läsionen konnte bereits von Tamura et al. (1999) und Tamburro et al. (2003), sowie ebenfalls von Oosterlynck et al. (1994) und Küpker et al. (1998) in Peritonealflüssigkeit nachgewiesen werden. Die Vermutung liegt nahe, dass ein Zusammenhang der TGF- β -Expression und der Pathogenese der Endometriose bestehen könnte (Omwandho et al. 2010; Young et al. 2017). Hierauf deutet auch die Studie von Hull et al. (2012) hin, in welcher ein vermindertes Wachstum von Endometriose-Läsionen in TGF- β -null-Mäusen beobachtet wurde.

Eine Hemmung der Expression von TGF- β 1, 2 und 3 durch Progesteron konnte bereits in kultivierten Explantaten des humanen Endometriums gezeigt werden. Ebenfalls vermindert wurde die Expression von TGF- β 2 und 3 durch die gleichzeitige Stimulation mit E2 und Progesteron (Gaide Chevronnay et al. 2008). Kunzmann et al. (2018) konnten in Bezug auf die Signalweiterleitung keinen direkten Einfluss von Progesteron auf die SMAD Proteine erkennen, es zeigte sich jedoch eine Dosis-abhängige Hemmung der TGF- β 1 induzierten SMAD3-Phosphorylierung.

Auch E2 beeinflusst die SMAD-Signalkaskade. Dosisabhängig führt E2 über den ER zu einer Verringerung der transkriptionellen Aktivität von SMAD3 (Matsuda et al. 2001).

 ber zwei verschiedene Wege könnte es also sowohl E2- als auch Progesteron-vermittelt zu einer Inhibierung des TGF- β -Signalwegs kommen und so die Sekretion von MMP7 vermindert werden.

4.6 Die Expression von CD26 in HPESC560

Unsere Experimente weisen darauf hin, dass das Fehlen des Proteins CD26 in endometrialen Stromazellen mitverantwortlich für die narbenlose Wundheilung im Rahmen der Menstruation sein könnte. Um diese Annahme weiter zu untermauern,

induzierten wir die Expression von CD26 in HPESC560 durch die Stimulation mit IL1 α . Es konnte hierunter eine konzentrationsabhängige Steigerung der CD26 Expression beobachtet werden. Eine gleichzeitige Behandlung mit dem DPP4 Inhibitor Diprotin A führte zu einer Inhibition der Expression von CD26.

4.6.1 Effekt von IL1 α und Diprotin A auf die Expression von CD26 in HPESC560

In unseren Experimenten zeigte sich eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression von CD26 durch IL1 α in HPESC560.

Hauptverantwortlich für die Wundheilung sind Fibroblasten mit ihrer Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu synthetisieren (Sorrell und Caplan 2009). Sie spielen jedoch ebenfalls eine große Rolle unter anderem bei der Narbenbildung, Organ- und Gewebe-Fibrose, Arteriosklerose und systemischer Sklerose (Powell 1999; Hinz et al. 2007; Wynn 2008; Wilson und Wynn 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass die Subpopulation der CD26-positiven Fibroblasten, welche zum Beispiel in humaner adulter Haut vorkommt, an diesen Prozessen maßgeblich beteiligt ist (Rinkevich et al. 2015; Hu und Longaker 2016). Aus dem Proteinatlas (www.proteinatlas.org) geht hervor, dass sich CD26 zwar in glandulären endometrialen Epithelzellen, jedoch nicht in endometrialen Stromazellen befindet. Im Endometrium kommt es nur in Ausnahmefällen, wie dem Ashermann-Syndrom und im Rahmen von Kaiserschnitten, zur Narbenbildung, wie sich anhand des Regenerationsprozesses im Rahmen der Menstruation erkennen lässt (Liu et al. 2020; Murji et al. 2022). Die Abwesenheit des mit Narbenbildung assoziierten Proteins CD26 in den Stromazellen dieses Gewebes könnte einen Faktor hierfür darstellen.

Unsere Beobachtung, dass eine Induktion der Expression von CD26 durch das proinflammatorische Zytokin IL1 α erfolgen kann, legt nahe, dass die Expression *in vivo* auch durch Entzündungsprozesse mediiert werden könnte. In diesem Rahmen käme es ebenfalls zu einer vermehrten IL1 α -Synthese (Cavalli et al. 2021). Eine klare Identifikation des induzierten Proteins konnte durch die Inhibition der Expression mit dem CD26-Inhibitor Diprotin A erfolgen (Nemoto et al. 1999). Diprotin A ist ein Tripeptid, welches nicht durch CD26/DPP4 hydrolysiert werden kann und mit dem Substrat um die aktive Seite von CD26 konkurriert (Umezawa et al. 1984).

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit den von Nemoto et al. (1999) gemachten Beobachtungen. Sie konnten die Induktion von CD26 in gingivalen Fibroblasten ebenfalls durch eine Stimulation mit IL1 α erreichen. Es zeigte sich eine Erhöhung der Expression durch alle in der vorliegenden Studie getesteten Zytokine und bakteriellen Komponenten, jedoch kam es unter IL1 α zur stärksten Expression von CD26 an der Zelloberfläche.

Eine Assoziation von IL1 α mit Narbenbildung konnte von Dekaris et al. (2005) in kornealem Epithel gezeigt werden. Sie beobachteten eine erhöhte IL1 α -Synthese in kornealen Narben im Vergleich mit gesundem Kornea-Gewebe.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit Nemoto et al. (1999) zeigt, dass die Expression von CD26-positiven Fibroblasten sich je nach Gewebe unterscheidet. Eine Induktion dieses Proteins mittels IL1 α konnte in dieser Arbeit in endometrialen Stromazellen der Zelllinie HESC560 und von Nemoto et al. (1999) auch in gingivalen Fibroblasten gezeigt werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass IL1 α , ausgeschüttet durch pro-inflammatorische Stimuli im Rahmen von Entzündungsprozessen, *in vivo* ebenfalls zu einer verstärkten Expression von CD26 führen könnte.

Umgekehrt war eine Inhibition der CD26-Expression in den genannten Geweben durch Diprotin A möglich. Dieser Umstand gibt einen Hinweis darauf, wie eine uterine Narbenbildung bei Patienten in Zukunft verhindert werden könnte.

4.7 Stärken und Limitationen dieser Arbeit

Die Limitationen dieser Arbeit sind zu einem großen Teil auf die Durchführung der Experimente in Zellkultur zurückzuführen. Es wurde jedoch versucht, durch die Verwendung der indirekten Kokultur, möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Der Nutzen des Einsatzes der Kokultur konnte bereits von Osteen et al. (1994) gezeigt werden.

Trotz der Verwendung der Kokultur-Experimente, ließen sich viele *in vivo* ablaufende Prozesse nicht vollständig abbilden. Dieses wird bei Betrachtung unserer Experimente zur Sekretion von MMP7 in eCRC560 unter E2-Stimulation deutlich. Im Vergleich mit anderen Studien zeigte sich eine Veränderung der MMP7-Sekretion und anderer Parameter nur *in vivo* (Curry und Osteen 2001; Russo et al. 2009). Die von uns in Zellkultur erlangten Ergebnisse lassen sich also nur bedingt auf den menschlichen Körper übertragen, da in den hier gezeigten Experimenten

alle Zelltypen anderer Entitäten, wie Immunzellen oder Muskelzellen, bewusst ausgeklammert wurden. Diese Herangehensweise gab uns die Möglichkeit, die Reaktion einzelner Zelltypen auf bestimmte Stimulanzen zu beobachten, was *in vivo* nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren konnte von Henriot et al. (2002) gezeigt werden, dass Hormonkonzentrationen in Zellkultur signifikant von der applizierten Dosierung abweichen können. Als einen möglichen Grund für die veränderten Konzentrationen nennen die Autoren die Absorption der Hormone durch die Zellkultur-Schalen. In derselben Studie konnte zudem gezeigt werden, dass sich die Hormonkonzentrationen von Östrogen und Progesteron nicht in demselben Ausmaß verringerten, sondern dass es auf Seiten des Progesterons zu einem größeren Konzentrationsabfall kam. Die antizipierte Konzentration und das Verhältnis zwischen den Hormonen, konnte also unter Umständen in unseren Experimenten nicht eingehalten werden.

Jedoch muss ebenfalls bedacht werden, dass es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen um reine endometriale Epithel- und Stromazellen handelt. Im Gegensatz zu Gewebemodellen, wie sie bei Osteen et al. (1994) eingesetzt wurden, ist es möglich, diese Zellen über einen langen Zeitraum am Leben zu halten, während bei einer Gewebekultur bereits nach kurzer Zeit die Gefahr einer Nekrose besteht. Die bei einem solchen Prozess ausgeschütteten Mediatoren könnten zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen.

Auch ein Tiermodell, wie von Rudolph-Owen et al. (1998) und Curry und Osteen (2001) durchgeführt, lässt sich nicht vollständig auf den menschlichen Körper übertragen. Die in tierischen Studien gewonnenen Ergebnisse, können nur eine Annäherung an die tatsächlichen Abläufe im menschlichen Körper darstellen. Hier besteht ein Vorteil unserer Experimente darin, dass ausschließlich humane Zellen verwendet wurden.

4.8 Fazit

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass sowohl E2 als auch Dienogest einen Einfluss auf die eCRC560 haben. Es konnte eine Reduktion des TEERs und der Expression von ZO1 unter E2-Stimulation gezeigt werden. Des Weiteren führte E2 zu einer Steigerung der Migration und der Invasivität von eCRC560. Dienogest hatte einen gegenteiligen Effekt und verminderte die Wirkung

des E2s oder hob sie gänzlich auf. Dienogest führte zusätzlich zu einer Verringerung der MMP7-Sekretion, die bei gleichzeitiger Stimulation mit E2 noch weiter potenziert werden konnte, was auf einen synergistischen Effekt der beiden Hormone hinweist. Als Gründe hierfür kommen sowohl die durch E2 mediierte Induktion von Progesteronrezeptoren infrage als auch eine durch E2 und Progesteron vermittelte Störung des TGF- β -Signalwegs.

Als Faktor für die verringerte Wirkung von Dienogest auf den Progress und die Symptomatik der Erkrankung in einem Teil der Endometriose-Patientinnen konnte die Progesteron-Resistenz aufgezeigt werden.

Des Weiteren konnte mittels Western Blot bestätigt werden, dass HPESC560 kein CD26, ein mit Narbenbildung und Wundheilung assoziiertes Protein, exprimieren. Diese Arbeit zeigte jedoch, dass eine Induktion der Expression von CD26 mittels IL1 α möglich ist und durch den CD26-Inhibitor Diprotin A inhibiert werden kann. Weitere Experimente mit CD26-positiven endometrialen Stromazellen könnten Aufschluss darüber geben, inwiefern die Wundheilung dieser Zellen durch die Expression von CD26 beeinflusst wird und in Zukunft zu besseren Behandlungsmöglichkeiten von Patientinnen mit verstärkter Narbenbildung führen.

5. Zusammenfassung

Endometriose ist eine Erkrankung, die mit der Disseminierung von Endometriumgewebe in extrauterine Körperbereiche einhergeht und dort zu einer Etablierung von ektopen Endometriose-Herden führt. Die Krankheit ist östrogenabhängig und meist assoziiert mit einer Progesteron-Resistenz. Ein medikamentöser Therapieansatz, der in der Behandlung der Endometriose und assoziierter Symptome Anwendung findet, ist die Therapie mit synthetischem Progesteron wie Dienogest. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Effekte E2 und Dienogest auf humane endometriale Epithelzellen haben und inwieweit diese den Progress oder die Entstehung der Endometriose beeinflussen könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass E2 generell einen verstärkenden Einfluss auf Parameter hat, die dazu beitragen könnten, Endometriose-Herde zu etablieren. E2 führte in den vorgestellten Experimenten zu einer Verringerung des TEERs, einer geringeren Expression des Zell-Kontakt-Proteins ZO1 und zu einer vermehrten Migration und Invasivität der Zelllinie eCRC560. Dienogest hingegen reduzierte die genannten Parameter sowohl bei alleiniger Gabe als auch in Kombination mit E2.

Des Weiteren wurde die Sekretion von MMP7 untersucht, einer Matrix-Metalloproteinase, bei welcher bereits eine verstärkte Expression in Endometriose-Herden und auch in eutopem Gewebe von an Endometriose erkrankten Frauen, beobachtet werden konnte. In dieser Arbeit konnte unter Behandlung mit Dienogest eine signifikante Reduktion der MMP7-Sekretion von eCRC560 gezeigt werden. Bei zusätzlicher Stimulation mit E2 kam es zu einer weiteren Reduktion, was auf einen synergistischen Effekt der beiden Hormone hinweist. E2 allein führte ebenfalls zu einer geringen Reduktion.

Der zweite Teil dieser Arbeit bezog sich auf die Wundheilung im Uterus. Die Fibroblasten des Endometriums exprimieren physiologischerweise kein CD26/DPP4, eine Protease, die mit Narbenbildung assoziiert ist. Entsprechend kommt es auch im Endometrium nur in Ausnahmefällen zur Narbenbildung. Es konnte gezeigt werden, dass das Zytokin $IL1\alpha$, CD26 in der humanen endometrialen Stromazelllinie HPESC560 induziert. Diese Erkenntnis könnte zum besseren Verständnis der Pathogenese der Narbenbildung im Uterus beitragen.

6. Summary

Endometriosis is an estrogen-dependent disease, which is characterised by the dissemination of endometrial tissue into extrauterine regions of the body and leads to the establishment of endometrial-like lesions. Studies have found higher estrogen levels as well as a resistance to progesterone in these lesions compared to normal endometrium. An effective therapeutic strategy for the treatment of endometriosis and associated symptoms are synthetic progestones.

The goal of this study was to investigate, which effects E2 and dienogest have on human endometrial epithelial cells and whether they influence the progression or the establishment of endometriosis.

We were able to show, that E2 generally does have an amplifying effect on parameters suspected to promote endometriosis. E2 reduced the TEER, the expression of the cell-cell contact protein ZO1 and increased migration and invasiveness of HPESC560. In contrast, dienogest reduced those parameters either alone, or in combination with E2.

Additionally, this study examined secretion of matrix-metalloproteinase MMP7, which is known to be highly expressed in ectopic lesions and in eutopic tissues of women with endometriosis as well. Dienogest reduced secretion of MMP7 significantly in eCRC560. An even further reduction was achieved by stimulation with dienogest and E2 in combination, which suggested that this effect might be synergistic. E2 alone also reduced MMP7 secretion.

The second part of this thesis dealt with wound healing in the endometrium. Endometrial fibroblasts normally do not express the protease CD26/DPP4, which is associated with scar formation. Accordingly scar formation in the uterus is very rare. In this study stimulation with the cytokine IL1 α induced expression of CD26 in the human endometrial fibroblast lineage HPESC560. These observations may serve as a basis to gain more insights in the pathogenesis of scar formation in the uterus.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| AA | Acrylamid |
| ANOVA | analysis of variance |
| AP1 | Aktivierendes-Protein-1 |
| CT | Computertomografie |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPP4 | Dipeptidyl-Peptidase-4 |
| E1 | Östron |
| E2 | 17-beta-Estradiol |
| E3 | Östriol |
| eADA | ekto-Amino-Deaminase |
| ECL | Elektro-Chemilumineszenz |
| eCRC560 | ... humane endometriale konditional reprogrammierte epitheliale Zellen 560 |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| ELISA | enzyme-linked-immunoabsorbent-assay |
| EMT | epitheliale-mesenchymale-Transition |
| ER | Östrogenrezeptor |
| ERK | Extrazellulär-regulierte-Kinase |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FAP- α | Fibroblasten-aktiviertes-Protein-alpha |
| FBS | Fötales Kälberserum |
| FSH | Follikel-stimulierendes-Hormon |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GPR 30 | G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-30 |
| HAT | Histon-Acetyl-Transferase |
| HER2 | Humaner-epidermaler-Wachstumsfaktor-2 |
| HPESC560 | Humane primäre endometriale Stromazellen 560 |
| hVEEC | humane vaginale ekto-zervikale Plattenepithelzellen |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| IGFR | Insulin-like-growth-factor |
| IL | Interleukin |

| | |
|----------------------|---|
| IL1-R1 | Interleukin-1-Rezeptor-1 |
| MAPK..... | Mitogen-activated-protein-kinase |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MRT | Magnetresonanztomografie |
| NaOH..... | Natriumhydroxid |
| NF- κ B | Nukleärer-Faktor-kappa-B |
| PBS | Phosphat-gepufferte-Salzlösung |
| PR | Progesteronrezeptor |
| PRE..... | Progesteron-response-Element |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| SDS..... | Sodium-dodecyl-Phosphat |
| SHBG | Sexualhormon-bindendes-Globulin |
| SP1..... | Spezifitätsprotein-1 |
| SRE..... | Serum-response-Element |
| T-BST | Tris-buffered-saline |
| TEER..... | Transepithelialer elektrischer Widerstand |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| TIMP..... | Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinases |
| ZO1 | Zonula occludens-1 |

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| <i>Abbildung 1: Darstellung der Strukturformeln von 17-β-Estradiol, Östriol und Östron</i> | 4 |
| <i>Abbildung 2: Aufbau der indirekten Kokultur aus eCRC560 und HPESC560</i> | 22 |
| <i>Abbildung 3: Phasen-Kontrast-Mikroskopie kultivierter eCRC560</i> | 31 |
| <i>Abbildung 4: Repräsentative Immunfluoreszenz von Claudin-1 und Cytokeratin-19</i> | 32 |
| <i>Abbildung 5: Darstellung des Transepithelialen elektrischen Widerstands in eCRC560</i> | 33 |
| <i>Abbildung 6: Darstellung der Expression von ZO1 mittels Western Blot und dessen densitometrischer Auswertung nach Stimulation mit 17-β-Estradiol</i> | 36 |
| <i>Abbildung 7: Darstellung der Expression von ZO1 mittels Western Blot und dessen densitometrischer Auswertung nach Stimulation mit Dienogest</i> | 37 |
| <i>Abbildung 8: Darstellung der Expression von ZO1 mittels Western Blot und dessen densitometrischer Auswertung nach Stimulation mit 17-β-Estradiol und Dienogest</i> | 38 |
| <i>Abbildung 9: Darstellung der Expression von ZO1 mit Immunfluoreszenz nach Stimulation mit Sexualhormonen</i> | 40 |
| <i>Abbildung 10: Auswertung der Immunfluoreszenz von ZO1 mittels ImageJ</i> | 41 |
| <i>Abbildung 11: Darstellung der Menge migrierter eCRC560 nach Stimulation mit 17-β-Estradiol und Dienogest</i> | 43 |
| <i>Abbildung 12: Darstellung der Menge invasiver eCRC560 nach Stimulation mit 17-β-Estradiol und Dienogest</i> | 45 |
| <i>Abbildung 13: Darstellung der Lebensfähigkeit eCRC560 nach Stimulation mit 17-β-Estradiol und Dienogest</i> | 46 |
| <i>Abbildung 14: Darstellung der MMP-7 Sekretion (pg/ml) in eCRC560 nach Stimulation 17-β-Estradiol und Dienogest</i> | 48 |
| <i>Abbildung 15: Phasen-Kontrast-Mikroskopie kultivierter HPESC560</i> | 49 |
| <i>Abbildung 16: Darstellung der Expression von CD26 in HPESC560 nach Stimulazion mit IL1α</i> | 51 |
| <i>Abbildung 17: Darstellung der Expression von CD26 in HPESC560 nach Stimulation mit IL1α und Diprotin A</i> | 52 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| <i>Tabelle 1</i> <i>Verwendete Chemikalien</i> | 15 |
| <i>Tabelle 2</i> <i>Verwendete Geräte</i> | 16 |
| <i>Tabelle 3</i> <i>Verwendete Zellkulturreagenzien</i> | 17 |
| <i>Tabelle 4</i> <i>Verwendete primäre Antikörper</i> | 18 |
| <i>Tabelle 5</i> <i>Verwendete sekundäre Antikörper</i> | 18 |
| <i>Tabelle 6</i> <i>Verwendete sekundäre Immunfluoreszenz-Antikörper</i> | 19 |
| <i>Tabelle 7</i> <i>Verwendete Stimulanzien und Inhibitoren</i> | 19 |
| <i>Tabelle 8</i> <i>Verwendete ELISA Sets</i> | 19 |
| <i>Tabelle 9</i> <i>Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung</i> | 19 |

10. Literaturverzeichnis

- Adachi, Y.; Yamamoto, H.; Itoh, F.; Hinoda, Y.; Okada, Y.; Imai, K. (1999): Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers; *Gut* 45 (2), 252–258. DOI: 10.1136/gut.45.2.252.
- Alifano, M.; Trisolini, R.; Cancellieri, A.; Regnard, J. F. (2006): Thoracic endometriosis: current knowledge; *Ann Thorac Surg* 81 (2), 761–769. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2005.07.044.
- Anderson, J. M. (2001): Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport; *News Physiol Sci* 16, 126–130. DOI: 10.1152/physiologyonline.2001.16.3.126.
- Attia, G. R.; Zeitoun, K.; Edwards, D.; Johns, A.; Carr, B. R.; Bulun, S. E. (2000): Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis; *J Clin Endocrinol Metab* 85 (8), 2897–2902. DOI: 10.1210/jcem.85.8.6739.
- Ayehunie, S.; Islam, A.; Cannon, C.; Landry, T.; Pudney, J.; Klausner, M.; Anderson, D. J. (2015): Characterization of a hormone-responsive organotypic human vaginal tissue model: morphologic and immunologic effects; *Reprod Sci* 22 (8), 980–990. DOI: 10.1177/1933719115570906.
- Bain, D. L.; Franden, M. A.; McManaman, J. L.; Takimoto, G. S.; Horwitz, K. B. (2000): The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural analysis and the influence of the DNA binding domain; *J Biol Chem* 275 (10), 7313–7320. DOI: 10.1074/jbc.275.10.7313.
- Balda, M. S.; Anderson, J. M. (1993): Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms; *Am J Physiol* 264 (4 Pt 1), C918–C924. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.264.4.c918.
- Ballard, K. D.; Seaman, H. E.; Vries, C. S. de; Wright, J. T. (2008): Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study--Part 1; *BJOG* 115 (11), 1382–1391. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2008.01878.x.
- Bártek, J.; Bártková, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Rejthar, A.; Kovarík, J.; Lukás, Z.; Vojtěšek, B. (1986): Differential expression of keratin 19 in normal

- human epithelial tissues revealed by monospecific monoclonal antibodies; *Histochem J* 18 (10), 565–575. DOI: 10.1007/BF01675198.
- Beckenkamp, A.; Davies, S.; Willig, J. Biz; Buffon, A. (2016): DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy?; *Tumour Biol* 37 (6), 7059–7073. DOI: 10.1007/s13277-016-5005-2.
- Bedaiwy, M. A.; Dahoud, W.; Skomorovska-Prokvolit, Y.; Yi, L.; Liu, J. H.; Falcone, T.; Hurd, W. W.; Mesiano, S. (2015): Abundance and localization of progesterone receptor isoforms in endometrium in women with and without endometriosis and in peritoneal and ovarian endometriotic implants; *Reprod Sci* 22 (9), 1153–1161. DOI: 10.1177/1933719115585145.
- Bergqvist, A.; Fernö, M. (1993): Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison according to localization and recurrence; *Fertil Steril* 60 (1), 63–68.
- Bersudsky, M.; Luski, L.; Fishman, D.; White, R. M.; Ziv-Sokolovskaya, N.; Dotan, S.; Rider, P.; Kaplanov, I.; Aychek, T.; Dinarello, C. A.; Apte, R. N.; Voronov, E. (2014): Non-redundant properties of IL-1 α and IL-1 β during acute colon inflammation in mice; *Gut* 63 (4), 598–609. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303329.
- Bilyk, O.; Coatham, M.; Jewer, M.; Postovit, L.-M. (2017): Epithelial-to-mesenchymal transition in the female reproductive tract: from normal functioning to disease pathology; *Front Oncol* 7, 145. DOI: 10.3389/fonc.2017.00145.
- Brosens, I.; Gargett, C. E.; Guo, S.-W.; Puttemans, P.; Gordts, S.; Brosens, J. J.; Benagiano, G. (2016): Origins and progression of adolescent endometriosis; *Reprod Sci* 23 (10), 1282–1288. DOI: 10.1177/1933719116637919.
- Bruner-Tran, K. L.; Eisenberg, E.; Yeaman, G. R.; Anderson, T. A.; McBean, J.; Osteen, K. G. (2002): Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice; *J Clin Endocrinol Metab* 87 (10), 4782–4791. DOI: 10.1210/jc.2002-020418.

- Buck Louis, G. M.; Hediger, M. L.; Peterson, C. Matthew; Croughan, M.; Sundaram, R.; Stanford, J.; Chen, Z.; Fujimoto, V. Y.; Varner, M. W.; Trumble, A.; Giudice, L. C. (2011): Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study; *Fertil Steril* 96 (2), 360–365. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.087.
- Bulun, S. E.; Cheng, Y.-H.; Pavone, M. Ellen; Yin, P.; Imir, G.; Utsunomiya, H.; Thung, S.; Xue, Q.; Marsh, E. E.; Tokunaga, H.; Ishikawa, H.; Kurita, T.; Su, E. J. (2010): 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 deficiency and progesterone resistance in endometriosis; *Semin Reprod Med* 28 (1), 44–50. DOI: 10.1055/s-0029-1242992.
- Bulun, S. E.; Fang, Z.; Imir, G.; Gurates, B.; Tamura, M.; Yilmaz, B.; Langoi, D.; Amin, S.; Yang, S.; Deb, S. (2004): Aromatase and endometriosis; *Semin Reprod Med* 22 (1), 45–50. DOI: 10.1055/s-2004-823026.
- Cavalli, G.; Colafrancesco, S.; Emmi, G.; Imazio, M.; Lopalco, G.; Maggio, M. Cristina; Sota, J.; Dinarello, C. A. (2021): Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases; *Autoimmun Rev* 20 (3), 102763. DOI: 10.1016/j.autrev.2021.102763.
- Chapron, C.; Marcellin, L.; Borghese, B.; Santulli, P. (2019): Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis; *Nat Rev Endocrinol* 15 (11), 666–682. DOI: 10.1038/s41574-019-0245-z.
- Chatterjee, K.; Jana, S.; DasMahapatra, P.; Swarnakar, S. (2018): EGFR-mediated matrix metalloproteinase-7 up-regulation promotes epithelial-mesenchymal transition via ERK1-AP1 axis during ovarian endometriosis progression; *FASEB J* 32 (8), 4560–4572. DOI: 10.1096/fj.201701382rr.
- Chen, H.; Malentacchi, F.; Fambrini, M.; Harrath, A. Halim; Huang, H.; Petraglia, F. (2020): Epigenetics of estrogen and progesterone receptors in endometriosis; *Reprod Sci* 27 (11), 1967–1974. DOI: 10.1007/s43032-020-00226-2.
- Chen, S.; Einspanier, R.; Schoen, J. (2015): Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial

- cells cultured on filter supports; *Histochem Cell Biol* 144 (5), 509–515. DOI: 10.1007/s00418-015-1351-1.
- Cheng, H.-C.; Abdel-Ghany, M.; Pauli, B. U. (2003): A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis; *Biol Chem* 278 (27), 24600–24607. DOI: 10.1074/jbc.M303424200.
- Chitadze, G.; Wehkamp, U.; Janssen, O.; Brüggemann, M.; Lettau, M. (2021): The serine protease CD26/DPP4 in non-transformed and malignant T cells; *Cancers (Basel)* 13 (23), Artikel 5947. DOI: 10.3390/cancers13235947.
- Chung, H. W.; Wen, Y.; Chun, S. H.; Nezhat, C.; Woo, B. H.; Lake Polan, M. (2001): Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness; *Fertil Steril* 75 (1), 152–159. DOI: 10.1016/s0015-0282(00)01670-8.
- Clemenza, S.; Capezzuoli, T.; Eren, E.; Garcia Garcia, J. M.; Vannuccini, S.; Petraglia, F. (2023): Progesterone receptor ligands for the treatment of endometriosis; *Minerva Obstet Gynecol* 75 (3), 288–297. DOI: 10.23736/s2724-606x.22.05157-0.
- Cleve, A.; Fritzscheier, K.-H.; Haendler, B.; Heinrich, N.; Möller, C.; Schwede, W.; Wintermantel, T. (2012): Pharmacology and clinical use of sex steroid hormone receptor modulators; *Handb Exp Pharmacol* (214), 543–587. DOI: 10.1007/978-3-642-30726-3_24.
- Cordero, O. J.; Salgado, F. J.; Nogueira, M. (2009): On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients; *CII* 58 (11), 1723–1747. DOI: 10.1007/s00262-009-0728-1.
- Critchley, H. O. D.; Maybin, J. A.; Armstrong, G. M.; Williams, A. R. W. (2020): Physiology of the endometrium and regulation of menstruation; *Physiol Rev* 100 (3), 1149–1179. DOI: 10.1152/physrev.00031.2019.
- Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R. A. (2017): Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases; *Prog Mol Biol Transl Sci* 147, 1–73. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.

- Curry, T. E.; Osteen, K. G. (2001): Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus; *Biol Reprod* 64 (5), 1285–1296. DOI: 10.1095/biolreprod64.5.1285.
- Dahlman-Wright, K.; Cavailles, V.; Fuqua, S. A.; Jordan, V. Craig; Katzenellenbogen, J. A.; Korach, K. S.; Maggi, A.; Muramatsu, M.; Parker, M. G.; Gustafsson, J.-A. (2006): International union of pharmacology. LXIV. estrogen receptors; *Pharmacol Rev* 58 (4), 773–781. DOI: 10.1124/pr.58.4.8.
- Dang, N. H.; Torimoto, Y.; Sugita, K.; Daley, J. F.; Schow, P.; Prado, C.; Schlossman, S. F.; Morimoto, C. (1990): Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation; *Immunol* 145 (12), 3963–3971.
- Dekaris, I.; Gabrić, N.; Bosnar, D.; Gagro, A.; Markotić, A.; Lazić, R. (2005): Interleukin-1 α production in human corneal scars; *Coll Antropol* 29 Suppl 1, 81–84.
- Derynck, R.; Akhurst, R. J.; Balmain, A. (2001): TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression; *Nat Genet* 29 (2), 117–129. DOI: 10.1038/ng1001-117.
- Diepenbruck, M.; Christofori, G. (2016): Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?; *Curr Opin in Cell Biol* (43), 7–13. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.06.002.
- Dinarello, C. A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family; *Annu Rev Immunol* (27), 519–550. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
- Dinarello, C. A. (2018): Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity; *Immunol Rev* 281 (1), 8–27. DOI: 10.1111/imr.12621.
- Dmello, C.; Srivastava, S. S.; Tiwari, R.; Chaudhari, P. R.; Sawant, S.; Vaidya, M. M. (2019): Multifaceted role of keratins in epithelial cell differentiation and transformation; *J Biosci* 44 (2), 1–16. DOI: 10.1007/s12038-019-9864-8.
- Dong, R. P.; Kameoka, J.; Hegen, M.; Tanaka, T.; Xu, Y.; Schlossman, S. F.; Morimoto, C. (1996): Characterization of adenosine deaminase binding to

- human CD26 on T cells and its biologic role in immune response; *J Immunol* 156 (4), 1349–1355. DOI: 10.4049/jimmunol.156.4.1349.
- Dongre, A.; Weinberg, R. A. (2019): New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer; *Nat Rev Mol Cell Biol* 20 (2), 69–84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- Donnez, J.; Dolmans, M.-M. (2021): Endometriosis and medical therapy: from progestogens to progesterone resistance to GnRH antagonists: a review; *J Clin Med* 10 (5). DOI: 10.3390/jcm10051085.
- Dt. Gesellschaft f. Gynäkologie u. Geburtshilfe e. V. (2020): S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose. 4. Aufl., 01.09.2020.
- Dyson, M. T.; Kakinuma, T.; Pavone, M. Ellen; Monsivais, D.; Navarro, A.; Malpani, S. S.; Ono, M.; Bulun, S. E. (2015): Aberrant expression and localization of deoxyribonucleic acid methyltransferase 3B in endometriotic stromal cells; *Fertil Steril* 104 (4), 953-963.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.046.
- Ebert, A. D. (2019): Endometriose. Ein Wegweiser für die Praxis, 1-6; 39-43. 5. Aufl.: De Gruyter.
- Eisenberg, V. H.; Weil, C.; Chodick, G.; Shalev, V. (2018): Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members; *BJOG* 125 (1), 55–62. DOI: 10.1111/1471-0528.14711.
- Ferrier, C.; Bendifallah, S.; Suisse, S.; Dabi, Y.; Touboul, C.; Puchar, A.; Zarca, K.; Durand Zaleski, I. (2023): Saliva microRNA signature to diagnose endometriosis: A cost-effectiveness evaluation of the Endotest®; *BJOG* 130 (4), 396–406. DOI: 10.1111/1471-0528.17348.
- Filardo, E. J. (2002): Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer; *J Steroid Biochem Mol Biol* 80 (2), 231–238. DOI: 10.1016/s0960-0760(01)00190-x.

- Flores, V. A.; Vanhie, A.; Dang, T.; Taylor, H. S. (2018): Progesterone receptor status predicts response to progestin therapy in endometriosis; *J Clin Endocrinol Metab* 103 (12), 4561–4568. DOI: 10.1210/jc.2018-01227.
- Gaide Chevronnay, H. P.; Cornet, P. B.; Delvaux, D.; Lemoine, P.; Courtoy, P. J.; Henriët, P.; Marbaix, E. (2008): Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium; *Endocrinol* 149 (3), 1015–1025. DOI: 10.1210/en.2007-0849.
- Gaire, M.; Magbanua, Z.; McDonnell, S.; McNeil, L.; Lovett, D. H.; Matrisian, L. M. (1994): Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin; *J Biol Chem* 269 (3), 2032–2040. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)42131-4.
- Gargett, C. E.; Schwab, K. E.; Brosens, J. J.; Puttemans, P.; Benagiano, G.; Brosens, I. (2014): Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis; *Mol Hum Reprod* 20 (7), 591–598. DOI: 10.1093/molehr/gau025.
- Garlanda, C.; Dinarello, C. A.; Mantovani, A. (2013): The interleukin-1 family: back to the future; *Immunity* 39 (6), 1003–1018. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.
- Garry, R.; Hart, R.; Karthigasu, K. A.; Burke, C. (2009): A re-appraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: a hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study; *Hum Reprod* 24 (6), 1393–1401. DOI: 10.1093/humrep/dep036.
- Gorodeski, G. I. (2007): Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodeling of occludin; *Endocrinol* 148 (1), 218–231. DOI: 10.1210/en.2006-1120.
- Grant-Tschudy, K. S.; Wira, C. R. (2004): Effect of estradiol on mouse uterine epithelial cell transepithelial resistance (TER); *Am J Reprod Immunol* 52 (4), 252–262. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2004.00218.x.
- Guo, S.-W. (2009): Recurrence of endometriosis and its control; *Hum Reprod Update* 15 (4), 441–461. DOI: 10.1093/humupd/dmp007.

- Hall, J. E. (2011): Guyton and Hall textbook of medical physiology, 1034-1035. 12. Aufl. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier.
- Halme, J.; Becker, S.; Wing, R. (1984): Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis; *AJOG* 148 (1), 85–90. DOI: 10.1016/s0002-9378(84)80037-x.
- Henriet, P.; Cornet, P. B.; Lemoine, P.; Galant, C.; Singer, C. F.; Courtoy, P. J.; Eeckhout, Y.; Marbaix, E. (2002): Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs); *Ann N Y Acad Sci* (955), 119-138; 157-158; 396-406. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02773.x.
- Hinz, B.; Phan, S. H.; Thannickal, V. J.; Galli, A.; Bochaton-Piallat, M.-L.; Gabbiani, G. (2007): The myofibroblast: one function, multiple origins; *Am J Pathol* 170 (6), 1807–1816. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070112.
- Hoyos, L. R.; Johnson, S.; Puscheck, E. (2017): Endometriosis and imaging; *Clin Obstet Gynecol* 60 (3), 503–516. DOI: 10.1097/GRF.0000000000000305.
- Hu, M. S.; Longaker, M. T. (2016): Dipeptidyl peptidase-4, wound healing, scarring and fibrosis; *Plast Reconstr Surg* 138 (5), 1026–1031. DOI: 10.1097/PRS.00000000000002634.
- Hudelist, G.; Lass, H.; Keckstein, J.; Walter, I.; Wieser, F.; Wenzl, R.; Mueller, R.; Czerwenka, K.; Kubista, E.; Singer, C. F. (2005a): Interleukin 1alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis; *Hum Reprod* 20 (6), 1695–1701. DOI: 10.1093/humrep/deh794.
- Hudelist, G.; Singer, C. F.; Keckstein, J. (2005b): Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Bedeutung für die Menstruation und Endometriose; *Zentralbl Gynakol* 127 (5), 320–324. DOI: 10.1055/s-2005-836864.
- Huhtinen, K.; Desai, R.; Ståhle, M.; Salminen, A.; Handelsman, D. J.; Perheentupa, A.; Poutanen, M. (2012): Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels; *J Clin Endocrinol Metab* 97 (11), 4228–4235. DOI: 10.1210/jc.2012-1154.

- Hull, M. Louise; Johan, M. Zahied; Hodge, W. L.; Robertson, S. A.; Ingman, W. V. (2012): Host-derived TGFB1 deficiency suppresses lesion development in a mouse model of endometriosis; *Am J Pathol* 180 (3), 880–887. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.013.
- Ii, M.; Yamamoto, H.; Adachi, Y.; Maruyama, Y.; Shinomura, Y. (2006): Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis; *Exp Biol Med (Maywood)* 231 (1), 20–27. DOI: 10.1177/153537020623100103.
- Inamoto, T.; Yamada, T.; Ohnuma, K.; Kina, S.; Takahashi, N.; Yamochi, T.; Inamoto, S.; Katsuoka, Y.; Hosono, O.; Tanaka, H.; Dang, N. H.; Morimoto, C. (2007): Humanized anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors; *Clin Cancer Res* 13 (14), 4191–4200. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-07-0110.
- Javert (1952): The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement; *AJOG* 64 (4), 780–806. DOI: 10.1016/s0002-9378(16)38796-8.
- Jia, M.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J.-Å. (2015): Estrogen receptor alpha and beta in health and disease; *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29 (4), 557–568. DOI: 10.1016/j.beem.2015.04.008.
- Jolly, M. Kumar; Ware, K. E.; Gilja, S.; Somarelli, J. A.; Levine, H. (2017): EMT and MET: necessary or permissive for metastasis?; *Mol Oncol* 11 (7), 755–769. DOI: 10.1002/1878-0261.12083.
- Jung, S. Keun; Lee, K. Won; Kim, H. Young; Oh, M. Hyun; Byun, S.; Lim, S. Hwan; Heo, Y.-S.; Kang, N. Joo; Bode, A. M.; Dong, Z.; Lee, H. Joo (2010): Myricetin suppresses UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by inhibiting Raf; *Biochem Pharmacol* 79 (10), 1455–1461. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.01.004.
- Kajiyama, H.; Kikkawa, F.; Ino, K.; Shibata, K.; Mizutani, S. (2003): Expression of CD26/dipeptidyl peptidase IV in endometrial adenocarcinoma and its negative correlation with tumor grade; *Adv Exp Med Biol* (524), 245–248. DOI: 10.1007/0-306-47920-6_29.

- Kalluri, R.; Weinberg, R. A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition; *J Clin Invest* 119 (6), 1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Kato, S.; Endoh, H.; Masuhiro, Y.; Kitamoto, T.; Uchiyama, S.; Sasaki, H.; Masushige, S.; Gotoh, Y.; Nishida, E.; Kawashima, H.; Metzger, D.; Chambon, P. (1995): Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase; *Science* 270 (5241), 1491–1494. DOI: 10.1126/science.270.5241.1491.
- Katzenellenbogen, B. S. (1980): Dynamics of steroid hormone receptor action; *Annu Rev Physiol* 42, 17–35. DOI: 10.1146/annurev.ph.42.030180.000313.
- Katzenellenbogen, B. S.; Montano, M. M.; Ediger, T. R.; Sun, J.; Ekena, K.; Lazennec, G.; Martini, P. G.; McInerney, E. M.; Delage-Mourroux, R.; Weis, K.; Katzenellenbogen, J. A. (2000): Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology; *Recent Prog Horm Res* (55), 163-193; 194-195.
- Ke, J.; Ye, J.; Li, M.; Zhu, Z. (2021): The role of matrix metalloproteinases in endometriosis: a potential target; *Biomol* (11). DOI: 10.3390/biom11111739.
- Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z. (2010): Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment; *Cell* 141 (1), 52–67. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- Kim, B.; Lee, Y.; Kim, E.; Kwak, A.; Ryoo, S.; Bae, S. Hyeon; Azam, T.; Kim, S.; Dinarello, C. A. (2013): The interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines; *Front. Immunol.* 4, 391. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00391.
- Kirschner, N.; Rosenthal, R.; Furuse, M.; Moll, I.; Fromm, M.; Brandner, J. M. (2013): Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes; *J Invest Dermatol* 133 (5), 1161–1169. DOI: 10.1038/jid.2012.507.
- Kitawaki, J.; Noguchi, T.; Amatsu, T.; Maeda, K.; Tsukamoto, K.; Yamamoto, T.; Fushiki, S.; Osawa, Y.; Honjo, H. (1997): Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human

- endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium; *Biol Reprod* 57 (3), 514–519. DOI: 10.1095/biolreprod57.3.514.
- Koninckx, P. R.; Barlow, D.; Kennedy, S. (1999): Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory; *Gynecol Obstet Invest* 47 Suppl 1 (Suppl. 1), 3-9; 9-10. DOI: 10.1159/000052853.
- Koninckx, P. R.; Kennedy, S. H.; Barlow, D. H. (1998): Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid; *Hum Reprod Update* 4 (5), 741–751. DOI: 10.1093/humupd/4.5.741.
- Koninckx, P. R.; Ussia, A.; Adamyan, L.; Wattiez, A.; Gomel, V.; Martin, D. C. (2019): Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory; *Fertil Steril* 111 (2), 327–340. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.013.
- Konrad, L.; Dietze, R.; Riaz, M. A.; Scheiner-Bobis, G.; Behnke, J.; Horné, F.; Hoerscher, A.; Reising, C.; Meinhold-Heerlein, I. (2020): Epithelial-mesenchymal transition in endometriosis-when does it happen?; *J Clin Med* 9 (6). DOI: 10.3390/jcm9061915.
- Konrad, L.; Fruhmann Berger, L. M.; Maier, V.; Horné, F.; Neuheisel, L. M.; Laucks, E. V.; Riaz, M. A.; Oehmke, F.; Meinhold-Heerlein, I.; Zeppernick, F. (2023): Predictive model for the non-nvasive diagnosis of endometriosis based on clinical parameters; *J Clin Med* (12). DOI: 10.3390/jcm12134231.
- Kunzmann, S.; Ottensmeier, B.; Speer, C. P.; Fehrholz, M. (2018): Effect of progesterone on Smad signaling and TGF- β /Smad-regulated genes in lung epithelial cells; *PLoS One* 13 (7), e0200661. DOI: 10.1371/journal.pone.0200661.
- Küpker, W.; Schultze-Mosgau, A.; Diedrich, K. (1998): Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis; *Hum Reprod Update* 4 (5), 719–723. DOI: 10.1093/humupd/4.5.719.
- Kurita, T.; Lee, K. J.; Cooke, P. S.; Lydon, J. P.; Cunha, G. R. (2000): Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus; *Biol Reprod* 62 (4), 831–838. DOI: 10.1095/biolreprod62.4.831.

- Kurita, T.; Young, P.; Brody, J. R.; Lydon, J. P.; O'Malley, B. W.; Cunha, G. R. (1998): Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis; *Endocrinol* 139 (11), 4708–4713. DOI: 10.1210/endo.139.11.6317.
- Leyendecker, G.; Kunz, G.; Herbertz, M.; Beil, D.; Huppert, P.; Mall, G.; Kissler, S.; Noe, M.; Wildt, L. (2004): Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis; *Ann N Y Acad Sci* 1034, 338–355. DOI: 10.1196/annals.1335.036.
- Li, Q.; Li, N.; Liu, H.; Du, Y.; He, H.; Zhang, L.; Liu, Y. (2020): Estrogen-decreased hsa_circ_0001649 promotes stromal cell invasion in endometriosis; *Reprod* 160 (4), 511–519. DOI: 10.1530/REP-19-0540.
- Lippert, Hans; Altmann, Silke (Hg.) (2012): *Wundatlas. Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG (Thieme E-Book Kollektion Klinik & Praxis).
- Liu, D.; Wang, J.; Zhao, G.; Jiang, P.; Song, M.; Ding, H.; Wang, Z.; Lv, H.; Hu, Y. (2020): CSF1-associated decrease in endometrial macrophages may contribute to Asherman's syndrome; *Am J Reprod Immunol* 83 (1), Artikel e13191. DOI: 10.1111/aji.13191.
- Lo, C. M.; Keese, C. R.; Giaever, I. (1999): Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters; *Exp Cell Res* 250 (2), 576–580. DOI: 10.1006/excr.1999.4538.
- MacLean, J. A.; Hayashi, K. (2022): Progesterone actions and resistance in gynecological disorders; *Cells* 11 (4), 647. DOI: 10.3390/cells11040647.
- Makker, A.; Goel, M. Mati (2016): Tumor progression, metastasis, and modulators of epithelial-mesenchymal transition in endometrioid endometrial carcinoma: an update; *Endocr Relat Cancer* 23 (2), R85-R111. DOI: 10.1530/ERC-15-0218.

- Malik, A.; Kanneganti, T.-D. (2018): Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer; *Immunol Rev* 281 (1), 124–137. DOI: 10.1111/imr.12615.
- Marbaix, E.; Kokorine, I.; Moulin, P.; Donnez, J.; Eeckhout, Y.; Courtoy, P. J. (1996): Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases; *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (17), 9120–9125. DOI: 10.1073/pnas.93.17.9120.
- Matsuda, T.; Yamamoto, T.; Muraguchi, A.; Saatcioglu, F. (2001): Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3; *J Biol Chem* 276 (46), 42908–42914. DOI: 10.1074/jbc.M105316200.
- McGuire, J. K.; Li, Q.; Parks, W. C. (2003): Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium; *Am J Pathol* 162 (6), 1831–1843. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64318-0.
- Meyer, R. (1924): Zur Frage der heterotopen Epithelwucherung, insbesondere des Peritonealepithels und in den Ovarien; *Virchows Arch* 250 (3), 595–610.
- Molgora, M.; Supino, D.; Mantovani, A.; Garlanda, C. (2018): Tuning inflammation and immunity by the negative regulators IL-1R2 and IL-1R8; *Immunol Rev* 281 (1), 233–247. DOI: 10.1111/imr.12609.
- Moll, R.; Franke, W. W.; Schiller, D. L.; Geiger, B.; Krepler, R. (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells; *Cell* 31 (1), 11–24. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90400-7.
- Monnin, N.; Fattet, A. Julie; Koscinski, I. (2023): Endometriosis: update of pathophysiology, (epi) genetic and environmental involvement; *Biomedicines* 11 (3), 978. DOI: 10.3390/biomedicines11030978.
- Morissette, M.; Le Saux, M.; D'Astous, M.; Jourdain, S.; Al Sweidi, S.; Morin, N.; Estrada-Camarena, E.; Mendez, P.; Garcia-Segura, L. Miguel; Di Paolo, T. (2008): Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain; *J Steroid Biochem Mol Biol* 108 (3-5), 327–338. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2007.09.011.

- Morita-Takemura, S.; Nakahara, K.; Tatsumi, K.; Okuda, H.; Tanaka, T.; Isonishi, A.; Wanaka, A. (2016): Changes in endothelial cell proliferation and vascular permeability after systemic lipopolysaccharide administration in the subfornical organ; *J Neuroimmunol* 298, 132–137. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.06.011.
- Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R. (1996): ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor; *FEBS Lett* 392 (1), 49–53. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00782-x.
- Moustakas, A.; Souchelnytskyi, S.; Heldin, C. H. (2001): Smad regulation in TGF-beta signal transduction; *J Cell Sci* 114 (Pt 24), 4359–4369. DOI: 10.1242/jcs.114.24.4359.
- Muller, D.; Quantin, B.; Gesnel, M. C.; Millon-Collard, R.; Abecassis, J.; Breathnach, R. (1988): The collagenase gene family in humans consists of at least four members; *Biochem J* 253 (1), 187–192. DOI: 10.1042/bj2530187.
- Murji, A.; Sanders, A. P.; Monteiro, I.; Haiderbhai, S.; Matelski, J.; Walsh, C.; Abbott, J. A.; Munro, M. G.; Maheux-Lacroix, S. (2022): Cesarean scar defects and abnormal uterine bleeding: a systematic review and meta-analysis; *Fertil Steril* 118 (4), 758–766. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2022.06.031.
- Mwaura, A. N.; Riaz, M. A.; Maoga, J. B.; Mecha, E.; Omwandho, C. O. A.; Scheiner-Bobis, G.; Meinhold-Heerlein, I.; Konrad, L. (2022): Activin A modulates betaglycan shedding via the ALK4-SMAD3-dependent pathway in endometriotic cells; *Biomol* 12 (12), 1749. DOI: 10.3390/biom12121749.
- Nap, A. W.; Groothuis, P. G.; Demir, A. Y.; Evers, J. L. H.; Dunselman, G. A. J. (2004): Pathogenesis of endometriosis; *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18 (2), 233–244. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2004.01.005.
- Nemoto, E.; Sugawara, S.; Takada, H.; Shoji, S.; Horiuchi, H. (1999): Increase of CD26/dipeptidyl peptidase IV expression on human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial components; *Infect Immun* 67 (12), 6225–6233. DOI: 10.1128/iai.67.12.6225-6233.1999.

- Noë, M.; Ayhan, A.; Wang, T.-L.; Shih, I.-M. (2018): Independent development of endometrial epithelium and stroma within the same endometriosis; *J Pathol* 245 (3), 265–269. DOI: 10.1002/path.5082.
- Ogawa, Rei (2020): Mechanobiology of cutaneous scarring. In: *Textbook on Scar Management: State of the Art Management and Emerging Technologies*, Kapitel 2.
- Oh, K.-J.; Lee, H.-S.; Ahn, K.; Park, K. (2016): Estrogen modulates expression of tight junction proteins in rat vagina; *Biomed Res Int* 2016. DOI: 10.1155/2016/4394702.
- Omwandho, C. O. A.; Konrad, L.; Halis, G.; Oehmke, F.; Tinneberg, H.-R. (2010): Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis; *Hum Reprod* 25 (1), 101–109. DOI: 10.1093/humrep/dep382.
- Oosterlynck, D. J.; Lacquet, F. A.; Waer, M.; Koninckx, P. R. (1994): Lymphokine-activated killer activity in women with endometriosis; *Gynecol Obstet Invest* 37 (3), 185–190. DOI: 10.1159/000292556.
- Orchard, M. D.; Murphy, C. R. (2002): Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat; *Acta Histochem* 104 (2), 149–155. DOI: 10.1078/0065-1281-00644.
- Osteen, K. G.; Bruner, K. L.; Sharpe-Timms, K. L. (1996): Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis; *Semin Reprod Endocrinol* 14 (3), 247–255. DOI: 10.1055/s-2007-1016334.
- Osteen, K. G.; Rodgers, W. H.; Gaire, M.; Hargrove, J. T.; Gorstein, F.; Matrisian, L. M. (1994): Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium; *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (21), 10129–10133. DOI: 10.1073/pnas.91.21.10129.
- Osteen, K. G.; Yeaman, G. R.; Bruner-Tran, K. L. (2003): Matrix metalloproteinases and endometriosis; *Semin Reprod Med* 21 (2), 155–164. DOI: 10.1055/s-2003-41322.
- Owusu-Akyaw, A.; Krishnamoorthy, K.; Goldsmith, L. T.; Morelli, S. S. (2019): The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function; *Hum Reprod Update* 25 (1), 114–133. DOI: 10.1093/humupd/dmy035.

- Pei, D.; Shu, X.; Gassama-Diagne, A.; Thiery, J. Paul (2019): Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming; *Nat Cell Biol* 21 (1), 44–53. DOI: 10.1038/s41556-018-0195-z.
- Petz, L. N.; Ziegler, Y. S.; Schultz, J. R.; Kim, H.; Kemper, J. Kim; Nardulli, A. M. (2004): Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites; *J Steroid Biochem Mol Biol* 88 (2), 113–122. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2003.11.008.
- Powell, D. W. (1999): Water transport revisited; *J Physiol* 514 (Pt 1), 1. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.001af.x.
- Prentice, A.; Randall, B. J.; Weddell, A.; McGill, A.; Henry, L.; Horne, C. H.; Thomas, E. J. (1992): Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: endometrium and peritoneal mesothelium; *Hum Reprod* 7 (9), 1318–1325. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137848.
- Rassow, J.; Netzker, R.; Hauser, K. (2022): *Biochemie*, 652-654. 5. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, Germany: Thieme (Duale Reihe).
- Reis, F. M.; Coutinho, L. M.; Vannuccini, S.; Batteux, F.; Chapron, C.; Petraglia, F. (2020): Progesterone receptor ligands for the treatment of endometriosis: the mechanisms behind therapeutic success and failure; *Hum Reprod Update* 26 (4), 565–585. DOI: 10.1093/humupd/dmaa009.
- Ria, R.; Loverro, G.; Vacca, A.; Ribatti, D.; Cormio, G.; Roccaro, A. M.; Selvaggi, L. (2002): Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas; *Eur J Clin Invest* 32 (3), 199–206. DOI: 10.1046/j.1365-2362.2002.00960.x.
- Riaz, M. Assad; Kary, F. Louisa; Jensen, A.; Zeppernick, F.; Meinhold-Heerlein, I.; Konrad, L. (2024): Long-term maintenance of viable human endometrial epithelial cells to analyze estrogen and progestin effects; *Cells* 13 (10), 811. DOI: 10.3390/cells13100811.
- Rider, P.; Kaplanov, I.; Romzova, M.; Bernardis, L.; Braiman, A.; Voronov, E.; Apte, R. N. (2012): The transcription of the alarmin cytokine interleukin-1

alpha is controlled by hypoxia inducible factors 1 and 2 alpha in hypoxic cells; *Front Immunol* 3, 290. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00290.

Rinkevich, Y.; Walmsley, G. G.; Hu, M. S.; Maan, Z. N.; Newman, A. M.; Drukker, M.; Januszyk, M.; Krampitz, G. W.; Gurtner, G. C.; Lorenz, H. Peter; Weissman, I. L.; Longaker, M. T. (2015): Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential; *Science* 348 (6232), aaa2151. DOI: 10.1126/science.aaa2151.

Rodriguez, R.; Lopez-Carrasco, A.; Antolin, E.; Herrero, B.; Duyos, I.; Bartha, J. L. (2017): EP26.02: Ultrasound accuracy of transvaginal ultrasound compared with magnetic resonance image in deep infiltrating endometriosis; *Ultrasound Obstet Gynecol* 50, 381. DOI: 10.1002/uog.18745.

Rolla, E. (2019): Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment; *F1000Res* 8, 529. DOI: 10.12688/f1000research.14817.1.

Rudolph-Owen, L. A.; Slayden, O. D.; Matrisian, L. M.; Brenner, R. M. (1998): Matrix metalloproteinase expression in *Macaca mulatta* endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients; *Biol Reprod* 59 (6), 1349–1359. DOI: 10.1095/biolreprod59.6.1349.

Russo, L. A.; Peano, B. J.; Trivedi, S. P.; Cavalcanto, T. D.; Olenchock, B. A.; Caruso, J. A.; Smolock, A. R.; Vishnevsky, O.; Gardner, R. M. (2009): Regulated expression of matrix metalloproteinases, inflammatory mediators, and endometrial matrix remodeling by 17beta-estradiol in the immature rat uterus; *Reprod Biol Endocrinol* 7, 124. DOI: 10.1186/1477-7827-7-124.

Samimi, M.; Pourhanifeh, M. Hossein; Mehdizadehkashi, A.; Eftekhari, T.; Asemi, Z. (2019): The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis in the pathophysiology of endometriosis: Basic science and new insights based on gene expression; *J Cell Physiol* 234 (11), 19384–19392. DOI: 10.1002/jcp.28666.

Sampson (1927): Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation; *Am. J. Pathol.* 3, 93.

- Sasson, I. E.; Taylor, H. S. (2008): Stem cells and the pathogenesis of endometriosis; *Ann N Y Acad Sci* 1127, 106–115. DOI: 10.1196/annals.1434.014.
- Saville, B.; Wormke, M.; Wang, F.; Nguyen, T.; Enmark, E.; Kuiper, G.; Gustafsson, J. A.; Safe, S. (2000): Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements; *J Biol Chem* 275 (8), 5379–5387. DOI: 10.1074/jbc.275.8.5379.
- Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (Hg.) (2017): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie : mit Online-Repetitorium*, 983-985. Springer-Verlag GmbH. Sonderausgabe der 31. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://www.springer.com/>.
- Shakiba, K.; Bena, J. F.; McGill, K. M.; Minger, J.; Falcone, T. (2008): Surgical treatment of endometriosis: a 7-year follow-up on the requirement for further surgery; *Obstet Gynecol* 111 (6), 1285–1292. DOI: 10.1097/aog.0b013e3181758ec6.
- Signorile, P. G.; Baldi, F.; Bussani, R.; Viceconte, R.; Bulzomi, P.; D'Armiento, M.; D'Avino, A.; Baldi, A. (2012): Embryologic origin of endometriosis: analysis of 101 human female fetuses; *J Cell Physiol* 227 (4), 1653–1656. DOI: 10.1002/jcp.22888.
- Sillem, M.; Prifti, S.; Koch, A.; Neher, M.; Jauckus, J.; Runnebaum, B. (2001): Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis; *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95 (2), 167–174. DOI: 10.1016/s0301-2115(00)00415-2.
- Singer, C. F.; Kronsteiner, N.; Marton, E.; Kubista, M.; Cullen, K. J.; Hirtenlehner, K.; Seifert, M.; Kubista, E. (2002): MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions; *Breast Cancer Res Treat* 72 (1), 69–77. DOI: 10.1023/a:1014918512569.
- Singer, C. F.; Rasmussen, A.; Lippman, M. E.; Cullen, K. J. (1997): Coexpression of stromelysin-3 and insulin-like growth factor II in tumors of ectodermal,

- mesodermal, and endodermal origin: indicator of a fetal cell phenotype; *J Clin Endocrinol Metab* 82 (6), 1917–1922. DOI: 10.1210/jcem.82.6.4023.
- Smikle, C.; Yarrarapu, S. Naga S.; Khetarpal, S. (2023): StatPearls. Asherman Syndrome. Treasure Island (FL).
- Sorrell, J. Michael; Caplan, A. I. (2009): Fibroblasts-a diverse population at the center of it all; *Int Rev Cell Mol Biol* 276, 161–214. DOI: 10.1016/S1937-6448(09)76004-6.
- Srinivasan, B.; Kolli, A. Reddy; Esch, M. Brigitte; Abaci, H. Erbil; Shuler, M. L.; Hickman, J. J. (2015): TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems; *J Lab Autom* 20 (2), 107–126. DOI: 10.1177/2211068214561025.
- Suda, K.; Nakaoka, H.; Yoshihara, K.; Ishiguro, T.; Adachi, S.; Kase, H.; Motoyama, T.; Inoue, I.; Enomoto, T. (2019): Different mutation profiles between epithelium and stroma in endometriosis and normal endometrium; *Hum Reprod* 34 (10), 1899–1905. DOI: 10.1093/humrep/dez155.
- Tamburro, S.; Canis, M.; Albuissou, E.; Dechelotte, P.; Darcha, C.; Mage, G. (2003): Expression of transforming growth factor beta1 in nerve fibers is related to dysmenorrhea and laparoscopic appearance of endometriotic implants; *Fertil Steril* 80 (5), 1131–1136. DOI: 10.1016/s0015-0282(03)01182-8.
- Tamura, M.; Fukaya, T.; Enomoto, A.; Murakami, T.; Uehara, S.; Yajima, A. (1999): Transforming growth factor-beta isoforms and receptors in endometriotic cysts of the human ovary; *Am J Reprod Immunol* 42 (3), 160–167. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1999.tb00480.x.
- Taraborrelli, S. (2015): Physiology, production and action of progesterone; *Acta Obstet Gynecol Scand* 94 (S161), 8–16. DOI: 10.1111/aogs.12771.
- Toivola, D. M.; Boor, P.; Alam, C.; Strnad, P. (2015): Keratins in health and disease; *Current Opinion in Cell Biology* 32, 73–81. DOI: 10.1016/j.ceb.2014.12.008.
- Trukhacheva, E.; Lin, Z.; Reierstad, S.; Cheng, Y.-H.; Milad, M.; Bulun, S. E. (2009): Estrogen receptor (ER) beta regulates ERalpha expression in stromal

- cells derived from ovarian endometriosis; *J Clin Endocrinol Metab* 94 (2), 615–622. DOI: 10.1210/jc.2008-1466.
- Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Ogawa, K.; Naganawa, H.; Hamada, M.; Takeuchi, T. (1984): Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria; *J Antibiot (Tokyo)* 37 (4), 422–425. DOI: 10.7164/antibiotics.37.422.
- van der Giessen, J.; van der Woude, C.; Peppelenbosch, M.; Fuhler, G. (2019): A direct effect of sex hormones on epithelial barrier function in inflammatory bowel disease models; *Cells* 8 (3), 261. DOI: 10.3390/cells8030261.
- Vercellini, P.; Viganò, P.; Somigliana, E.; Fedele, L. (2014): Endometriosis: pathogenesis and treatment; *Nat Rev Endocrinol* 10 (5), 261–275. DOI: 10.1038/nrendo.2013.255.
- Viganò, P.; Parazzini, F.; Somigliana, E.; Vercellini, P. (2004): Endometriosis: epidemiology and aetiological factors; *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18 (2), 177–200. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007.
- Vrtačnik, P.; Ostanek, B.; Mencej-Bedrač, S.; Marc, J. (2014): The many faces of estrogen signaling; *Biochem Med (Zagreb)* 24 (3), 329–342. DOI: 10.11613/BM.2014.035.
- Wang, W.-S.; Chen, P.-M.; Wang, H.-S.; Liang, W.-Y.; Su, Y. (2006): Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma; *Carcinogenesis* 27 (5), 1113–1120. DOI: 10.1093/carcin/bgi351.
- Welch, D. R.; Hurst, D. R. (2019): Defining the hallmarks of metastasis; *Cancer Res* 79 (12), 3011–3027. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0458.
- Wenzl, R. J.; Heinzl, H. (1998): Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants; *Gynecol Obstet Invest* 45 (4), 253–257. DOI: 10.1159/000009978.
- Wilson, M. S.; Wynn, T. A. (2009): Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation; *Mucosal Immunol* 2 (2), 103–121. DOI: 10.1038/mi.2008.85.

- Wu, Y.; Strawn, E.; Basir, Z.; Halverson, G.; Guo, S.-W. (2006): Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis; *Epigenetics* 1 (2), 106–111. DOI: 10.4161/epi.1.2.2766.
- Wynn, T. A. (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis; *J Pathol* 214 (2), 199–210. DOI: 10.1002/path.2277.
- Yazdi, A. S.; Ghoreschi, K. (2016): The Interleukin-1 Family; *Adv Exp Med Biol* 941, 21–29. DOI: 10.1007/978-94-024-0921-5_2.
- Yokoyama, Y.; Grünebach, F.; Schmidt, S. M.; Heine, A.; Häntschel, M.; Stevanovic, S.; Rammensee, H.-G.; Brossart, P. (2008): Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells; *Clin Cancer Res* 14 (17), 5503–5511. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4041.
- Young, V. J.; Ahmad, S. F.; Duncan, W. Colin; Horne, A. W. (2017): The role of TGF- β in the pathophysiology of peritoneal endometriosis; *Hum Reprod Update* 23 (5), 548–559. DOI: 10.1093/humupd/dmx016.
- Young, V. J.; Brown, J. K.; Saunders, P. T. K.; Horne, A. W. (2013): The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis; *Hum Reprod Update* 19 (5), 558–569. DOI: 10.1093/humupd/dmt024.
- Yovich, J. L.; Rowlands, P. K.; Lingham, S.; Sillender, M.; Srinivasan, S. (2020): Pathogenesis of endometriosis: Look no further than John Sampson; *Reprod Biomed Online* 40 (1), 7–11. DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.10.007.
- Zeitoun, K. M.; Bulun, S. E. (1999): Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target; *Fertil Steril* 72 (6), 961–969. DOI: 10.1016/S0015-0282(99)00393-3.
- Zeps, N.; Bentel, J. M.; Papadimitriou, J. M.; Dawkins, H. J. (1999): Murine progesterone receptor expression in proliferating mammary epithelial cells during normal pubertal development and adult estrous cycle. Association with α and β status; *J Histochem Cytochem* 47 (10), 1323–1330. DOI: 10.1177/002215549904701012.

- Zhang, P.; Wang, G. (2023): Progesterone resistance in endometriosis: current evidence and putative mechanisms; *Int J Mol Sci* 24 (8), 6992. DOI: 10.3390/ijms24086992.
- Zheng, Y.; Humphry, M.; Maguire, J. J.; Bennett, M. R.; Clarke, M. C. H. (2013): Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation; *Immunity* 38 (2), 285–295. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.01.008.
- Zhou, Z.; Bian, C.; Luo, Z.; Guille, C.; Ogunrinde, E.; Wu, J.; Zhao, M.; Fitting, S.; Kamen, D. L.; Oates, J. C.; Gilkeson, G.; Jiang, W. (2019): Progesterone decreases gut permeability through upregulating occludin expression in primary human gut tissues and Caco-2 cells; *Sci Rep* 9 (1), 8367. DOI: 10.1038/s41598-019-44448-0.
- Zhou, Z.; Zhang, L.; Ding, M.; Luo, Z.; Yuan, S.; Bansal, M. B.; Gilkeson, G.; Lang, R.; Jiang, W. (2017): Estrogen decreases tight junction protein ZO-1 expression in human primary gut tissues; *Clin Immunol* 183, 174–180. DOI: 10.1016/j.clim.2017.08.019.
- Zhu, H.; Jia, Q.; Zhang, Y.; Liu, D.; Yang, D.; Han, L.; Chen, J.; Ding, Y. (2022): Regulation of tight junctions by sex hormones in goat mammary epithelial cells; *Animals (Basel)* 12 (11), 1404. DOI: 10.3390/ani12111404.
- Zito, G.; Luppi, S.; Giolo, E.; Martinelli, M.; Venturin, I.; Di Lorenzo, G.; Ricci, G. (2014): Medical treatments for endometriosis-associated pelvic pain; *Biomed Res Int* 2014, Artikel 191967. DOI: 10.1155/2014/191967.
- Zondervan, K. T.; Becker, C. M.; Koga, K.; Missmer, S. A.; Taylor, R. N.; Viganò, P. (2018): Endometriosis; *Nat Rev Dis Primers* 4 (1), 9. DOI: 10.1038/s41572-018-0008-5.
- Zou, L.-B.; Zhang, R.-J.; Tan, Y.-J.; Ding, G.-L.; Shi, S.; Zhang, D.; He, R.-H.; Liu, A.-X.; Wang, T.-T.; Leung, P. C. K.; Sheng, J.-Z.; Huang, H.-F. (2011): Identification of estrogen response element in the aquaporin-2 gene that mediates estrogen-induced cell migration and invasion in human endometrial carcinoma; *J Clin Endocrinol Metab* 96 (9), E1399-E1408. DOI: 10.1210/jc.2011-0426.

11. Publikationsverzeichnis

Riaz, M. Assad; **Kary, F. Louisa**; Jensen, A.; Zeppernick, F.; Meinhold-Heerlein, I.; Konrad, L. (2024): Long-term maintenance of viable human endometrial epithelial cells to analyze estrogen and progestin effects; *Cells* 13 (10), 811.

Riaz M. Assad; Pecher, C. Marie; **Kary, F. Louisa**, Maoga, J. Bosibori; Dietze, R.; Zeppernick, F.; Meinhold-Heerlein, I.; Konrad, L. (2025): The contribution of CD26-negative fibroblasts to endometrial scarring. *Biomolecules* 15 (10), 1433.

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Es gibt viele Menschen, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen. Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Lutz Konrad dafür danken, dass ich als Doktorandin Teil seiner Arbeitsgruppe sein durfte. Er stand mir außerdem vor allem im Schreibprozess, jederzeit mit konstruktiver Kritik zur Seite.

Eine weitere Person, der ich zu großem Dank verpflichtet bin, ist Dr. Muhammad A. Riaz. Er hat mich in die Welt der Zellkultur eingeführt und war bei jedem Problem für mich da. Mit seinem Lebensmotto „Alles wird gut.“ hat er mich aus so manchem Tief geholt und mir immer wieder Mut zugesprochen, wenn es mit den Zellen oder den Western Blots mal nicht ganz so rund lief. Assad hat so viel mehr für mich getan als selbstverständlich gewesen wäre und das Füttern meiner Zellen über die Weihnachtsfeiertage ist nur ein Beispiel davon.

Viel Unterstützung, vor allem in Bezug auf die Durchführung der Western Blots, habe ich auch von Ebru Erdogan erhalten, wofür ich ihr ebenfalls sehr dankbar bin.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern Sissi Kary und Bernd Fickert danken. Sie unterstützen mich in allen meinen Vorhaben und versuchen mir alles zu ermöglichen. Auch, dass ich für diese Doktorarbeit zwei Freisemester nehmen konnte, habe ich ihnen zu verdanken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freundinnen, bezogen auf diese Doktorarbeit, vor allem meiner Mitdoktorandin Laura Neuheisel, die mir den Kontakt zu Dr. Konrad vermittelt hat und Clara Pecher. Die Tage im Labor wären ohne euch und den „Kuchenmittwoch“ nicht dieselben gewesen. Auch Vanessa Sterzbecher und Julia Schirmer waren nicht nur während der Doktorarbeit, sondern über das gesamte Studium immer für mich da. Ebenfalls bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Partner Peter Basten, der mir über die letzten Jahre viel Halt und Kraft gegeben hat und mit dem ich im Prozess des Schreibens dieser Arbeit viel gemeinsame Zeit in der Bibliothek verbracht habe.