

Das Expressionsprofil von Semenogelin2 und Calponin1 im humanen Uterus
Untersuchungen im Rahmen von Endometriose und Adenomyose

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

vorgelegt von
Höll, Matthias Leonhard Erwin
aus Gießen

Gießen, 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Gutachter: PD Dr. L. Konrad

Gutachter: Prof. Dr. A. Menke

Tag der Disputation:
20.05.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition der Endometriose und Adenomyose	1
1.2	Epidemiologie der Endometriose und Adenomyose.....	1
1.3	Ätiologie und Pathogenese der Endometriose und Adenomyose	2
1.3.1	Transplantationstheorie nach Sampson	2
1.3.2	Metaplasietheorie nach Meyer	2
1.3.3	Invaginationstheorie nach Cullen.....	2
1.3.4	Ursachen für eine eingeschränkte Fertilität bei Endometriose	3
1.4	Klinik der Endometriose und Adenomyose	3
1.5	Diagnostik der Endometriose und Adenomyose.....	4
1.6	Therapie der Endometriose und Adenomyose	5
1.7	Das Seminalplasma-Protein Semenogelin2	7
1.8	Das Aktinfilament-assoziierte Protein Calponin1	10
1.9	Die Marker CD10 und Claudin3	11
1.10	Fragestellung und Zielsetzung bei SEMG2.....	12
1.11	Fragestellung und Zielsetzung bei CNN1.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material	14
2.1.1	Gewebeproben für die SEMG2 Immunhistochemie	14
2.1.2	Mukusproben für die SEMG2 Untersuchung.....	15
2.1.3	Gewebeproben für die CNN1 Immunhistochemie	19
2.1.4	Puffer und Chemikalien.....	21
2.1.5	Antikörper für die Immunhistochemie	22
2.1.6	ELISA Kit für die SEMG2 Bestimmung.....	22
2.1.7	Geräte und weitere Materialien.....	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Anfertigung der Paraffinschnitte für die Immunhistochemie.....	23
2.2.2	Immunhistochemie	24
2.2.3	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay	28
2.2.4	Endometriumdatierung	31
2.3	Statistik	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Die SEMG2-Expression im luminalen Epithel.....	34
3.2	Die SEMG2-Expression im glandulären Epithel	36

3.3	Quantifizierung der SEMG2-Expression in den Drüsen	38
3.4	Die SEMG2-Expression im Stroma	39
3.5	Die SEMG2-Expression in Lymphozyten-Aggregaten	41
3.6	Die SEMG2-Expression bei EMCs und im Endozervix	41
3.7	Zusammenfassung der SEMG2-Ergebnisse im Endometrium	42
3.8	Charakteristika der Probandinnen für die SEMG2-Bestimmungen in Mukusproben	43
3.9	Der SEMG2-Gehalt in endozervikalen Mukusproben	45
3.10	Sonderfälle bei der Untersuchung des endozervikalen SEMG2-Gehalts	48
3.11	Zusammenfassung der SEMG2-Untersuchung in Mukusproben	48
3.12	Die CNN1-Expression im Uterus	49
3.13	Die CNN1-Expression im luminalen Epithel und der Funktionalis	49
3.14	Die CNN1-Expression in der Basalis	50
3.15	Die CNN1-Expression am endomyometrialen Übergang	51
3.16	Die CNN1-Expression in Adenomyose-Herden	53
3.17	CNN1-Expression in Sonderfällen	56
3.18	Zusammenfassung der CNN1-Untersuchung im Uterusgewebe	57
4	Diskussion	58
4.1	Probandinnenkollektiv für die SEMG2-Immunhistochemie	58
4.2	Analyse der SEMG2-Expression im humanen Uterusgewebe	58
4.2.1	SEMG2-Expression im luminalen Epithel	58
4.2.2	SEMG2-Expression im glandulären Epithel	59
4.2.3	Quantifizierung der SEMG2-Expression in den Drüsen	60
4.2.4	SEMG2-Expression im Stroma	60
4.2.5	SEMG2-Expression in Lymphozyten-Aggregaten	60
4.3	SEMG2-Expression bei EMCs und im Endozervix	60
4.4	Probandinnenkollektiv für den SEMG2-ELISA	61
4.5	Analyse der SEMG2-Konzentration in endozervikalen Mukusproben	62
4.6	Probandinnenkollektiv für die CNN1-Immunhistochemie	64
4.7	Analyse der CNN1-Expression im humanen Uterusgewebe	65
4.7.1	CNN1-positive Myofibroblasten	65
4.7.2	CNN1 in der Funktionalis und unterhalb des luminalen Epithels	66
4.7.3	CNN1 in der Basalis	67
4.7.4	CNN1 im endomyometrialen Übergang	68
4.7.5	CNN1 in Adenomyose-Herden	70
4.7.6	CNN1 in weiteren uterinen Gewebekomponenten	71

4.7.7	CNN1 in Sonderfällen	72
5	Zusammenfassung	73
6	Summary	74
7	Abkürzungsverzeichnis	75
8	Tabellenverzeichnis	79
9	Abbildungsverzeichnis	80
10	Literaturverzeichnis	81
11	Ehrenwörtliche Erklärung	95
12	Danksagung	96

1 Einleitung

1.1 Definition der Endometriose und Adenomyose

Endometriose (EM) ist definiert als das Vorkommen Endometrium-artiger Zellverbände außerhalb des Cavum uteri [1]. Die ektopen Erkrankungsherde können mit Entzündungsreaktionen und Fibrosierung einhergehen [2]. Im Beckenperitoneum werden *peritoneal superfizielle*, *ovarielle* und *tief infiltrierende Endometriose (TIE)* als drei Entitäten voneinander abgegrenzt [1]. Ovarielle EM-Herde werden auch als Endometriome oder Schokoladenzysten bezeichnet [3].

Es gibt die Auffassung, dass EM keine einheitliche Erkrankung, sondern ein Syndrom ist und als solches Adenomyose (AM) beinhaltet [1, 3]. Im deutschsprachigen Raum existieren die Bezeichnungen *Endometriosis genitalis interna* für AM, *genitalis externa* für die drei erwähnten EM-Entitäten und *extragenitalis* für extraperitoneale Läsionen. In diesem Kontext werden EM und AM eher als zwei Subtypen und nicht als strikt voneinander trennbare Erkrankungen begriffen [4].

AM ist definiert als die Anwesenheit von endometrialen Drüsen und Stroma in oft hypertroph-hyperplastisch verändertem Myometrium [5]. Bei der histopathologischen Befundung ist ein willkürlich festgelegter Mindestabstand von 2,5mm zwischen dem oberflächlichsten AM-Herd und der endomyometrialen Grenze gebräuchlich [6].

1.2 Epidemiologie der Endometriose und Adenomyose

Die EM-Prävalenz bei Frauen im reproduktiven Alter liegt bei 2-10% [7]. Genauere Angaben werden erst mithilfe eines zuverlässigen, nicht-invasiven EM-Biomarker möglich sein [8]. Deutlich höher ist die Prävalenz bei Frauen mit Schmerzen, eingeschränkter Fertilität oder beidem [9]. So sind 30-50% der EM-Patientinnen infertil, mit einer reduzierten monatlichen Fertilitätsrate [10]. Die Erkrankung hat eine hohe ökonomische Relevanz, da sie mit schmerzbedingter Arbeitsunfähigkeit und Subfertilität einhergehen kann [11].

Die AM-Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung liegt bei 20-25% und hängt von der Anzahl befundeter Uterusschnitte ab. AM hat eine hohe Leiomyom- und EM-Koinzidenz und tritt bei chronischen Schmerz- und Infertilitätspatientinnen häufiger auf. Insbesondere über 40-jährige Multipara sind betroffen, aber durch Einsatz bildgebender Verfahren wurde gezeigt, dass die Erkrankung bereits zwischen der 2. und 3. Lebensdekade auftreten kann [12].

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Endometriose und Adenomyose

1.3.1 Transplantationstheorie nach Sampson

Die auf Sampson zurückgehende Theorie über die Implantation von Endometrium-Fragmenten in das Peritoneum durch retrograde Menstruation wird favorisiert [9]. Sie macht EM-Risikofaktoren wie Fehlbildungen des genitalen Ausflusstrakts, Zervixverschluss (Cerclage), Nulliparität, frühe Menarche, Hyper- und Polymenorrhö nachvollziehbar [4, 13]. Ein hohes retrogrades Menstruationsvolumen und viele Regelblutungen können die Implantationswahrscheinlichkeit erhöhen [14]. Alleingegenommen ist eine retrograde Menstruation für die Erkrankungsentstehung jedoch nicht ausreichend. Sie tritt bei 90% der Frauen auf, aber deutlich weniger entwickeln eine EM, sodass weitere Faktoren beteiligt sein müssen, z.B. eine peritoneale Barrierestörung und ein dysfunktionales Immunsystem, das nicht in der Lage ist die ektopen Zellfragmente zu beseitigen [4, 15]. Der Hauptausbreitungsweg verläuft transtubar, aber bereits Sampson beschrieb die Möglichkeit einer hämatogenen Dissemination [16, 17]. Auf diese Weise, und durch iatrogene Verschleppung bei OPs, könnten beckenferne Organe von den EM-Zellen erreicht werden [18, 19].

1.3.2 Metaplasietheorie nach Meyer

Die Metaplasietheorie nach Meyer besagt, dass eine Differenzierung von Peritoneumzellen in Endometrium-artige Zellen stattfindet. Der Auslöser für einen solchen Vorgang ist nicht bekannt. Die Theorie wurde v.a. als Erklärung für EM und AM-ähnliche Befunde bei Patientinnen mit Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) - Syndrom angeführt, einer Uterusaplasie ohne funktionsfähiges Endometrium [4]. I.d.R. existieren in diesen Fällen aber Endometrium-Reste, sodass ein nicht-endometrialer EM-Ursprung angezweifelt wird und nicht sehr wahrscheinlich ist [20].

1.3.3 Invaginationstheorie nach Cullen

Die Invaginationstheorie nach Cullen zur AM-Entstehung ist weit verbreitet [21]. Das basale Endometrium wird als Ausgangspunkt der Erkrankung angenommen. Von dort könnte Schleimhaut in das Myometrium einwachsen. Gestützt wird die Theorie durch Kontinuitätsnachweise zwischen Basalis- und AM-Drüsen und identische Genmutationen als Indiz für eine klonale Verwandtschaft [22–24].

1.3.4 Ursachen für eine eingeschränkte Fertilität bei Endometriose

Bei EM-assoziiierter Infertilität wird eine multifaktorielle Genese vermutet. Es ist noch unklar, wie sich die EM-Herde auf die Fertilität auswirken [25]. In 20% der EM-positiven Infertilitätsfälle ist die eingeschränkte Fruchtbarkeit auf makroskopisch sichtbare Veränderungen wie Adhäsionen zurückzuführen. Aber auch bei weniger fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ohne Adhäsionen kann eine Infertilität vorliegen [4]. Eine proinflammatorisch veränderte Peritonealflüssigkeit hat einen negativen Einfluss auf das Tubenmilieu, da eine offene Verbindung zwischen Peritoneum und ampullärem Tubenabschnitt existiert [25]. Auf diese Weise können Tuben-, Eizell- und Spermienfunktionen beeinträchtigt werden. EM-positive Spendereizellen hatten bei In-vitro-Fertilisationen (IVF) eine schlechtere Erfolgsrate, während der Empfängerstatus nicht entscheidend für den IVF-Erfolg war [26]. Daraus wurde abgeleitet, dass die Fertilität bei EM v.a. durch die Eizellqualität und weniger durch andere Faktoren wie die Rezeptivität des Endometriums beeinflusst wird [27]. Auch die Pinopoden-Entwicklung als morphologisches Rezeptivitätskriterium im Endometrium war normal [28]. Andererseits stellten einige Autoren eine abweichende Expression von Rezeptivitätsmarkern fest [29–31]. Zudem liegt in EM-positivem Endometrium eine Progesteron-Resistenz vor, die unvorteilhaft für die Implantation sein könnte [10]. Zervixschleim-Konsistenz und -Proteom sind verändert, was die Spermien-Aszension erschweren könnte [32].

1.4 Klinik der Endometriose und Adenomyose

Die EM deckt ein breites Symptomspektrum ab, von asymptomatisch bis hin zu unerträglichen, chronifizierten Schmerzen [33]. Die Symptomvielfalt wird durch zahlreiche Lokalisationen, die Infiltrationstiefe, Herdaktivität und Begleitadhäsionen bedingt [34]. Schmerzen und Infertilität schränken die Lebensqualität ein [35]. Häufig liegt eine Dysmenorrhö vor, die kurz vor der Menstruation einsetzt und sich im Zyklusverlauf bessert [13]. EM-spezifische Schmerzsymptome lassen Rückschlüsse auf die Herdlokalisation zu. Beispielsweise liegt eine Dyschezie oft bei Darmbefall vor und Dysurie bei Beteiligung des ableitenden Harnsystems [36]. Trotzdem bleibt das Schmerzempfinden immer subjektiv und erfahrungsabhängig. Eine Nullipara wird eine andere Vorstellung vom stärksten Schmerz haben, als eine Patientin mit Z.n. vaginaler Entbindung [37]. Bei Chronifizierung ist EM oft mit Depressionen assoziiert [3].

Die AM verläuft in ca. 1/3 der Fälle asymptomatisch [12]. Es gibt keine AM-spezifischen Symptome, da es oft Überschneidungen mit anderen gynäkologischen Erkrankungen wie EM gibt [38]. AM ist als PALM-COEIN-Entität mit abnormen uterinen Blutungen (AUB) assoziiert [39], weiterhin mit Infertilität und Schwangerschaftskomplikationen wie

Frühgeburtlichkeit und Präeklampsie [38]. Kontrovers ist, ob histologische Parameter wie die Eindringtiefe mit der Symptomintensität korrelieren [40]. Die oberflächliche AM soll eher mit Blutungsstörungen einhergehen, während tiefe, Serosa-nahe AM-Herde mit TIE-ähnlichen Symptomen und somit stärkeren Schmerzen in Verbindung gebracht wurden [41].

1.5 Diagnostik der Endometriose und Adenomyose

Bei EM kann eine sorgfältige Anamneseerhebung helfen die lange Latenzzeit vom Auftreten erster Symptome bis zur endgültigen Diagnosesicherung zu verkürzen und Ausmaß und Lokalisation der Erkrankung einzugrenzen [42]. Ein Fragebogen, der EM-spezifische Parameter erfasst, kann als Vorhersagemodell und zur perioperativen Verlaufskontrolle genutzt werden [43]. Zur Erfassung der Schmerzsymptome kommt häufig eine Numerische Analogskala (NRS) zum Einsatz. Sie ist hochsensitiv und einfach verständlich, was die Kooperation der Patientinnen fördert und Mehrfacherhebungen erleichtert. EM-spezifische Schmerzskalen sind bei fehlender Akzeptanz nicht gebräuchlich. Das Miterfassen der Lebensqualität ist sinnvoll [37].

Eine körperliche Untersuchung ist bei EM zu ungenau. Weitere Diagnoseschritte sind notwendig. Gegenwärtig kommt kein Biomarker für den Klinikalltag in Frage [7]. Transvaginaler Ultraschall (TVUS) und Magnetresonanztomographie (MRT) sind gleichwertig in Bezug auf Sensitivität und Spezifität, aber TVUS ist mehr von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Beide Verfahren können die peritoneale EM nicht ausreichend erkennen [1, 36]. Sie können die Latenzzeit verkürzen, aber Vorteile durch eine frühzeitigere EM-Diagnostik sind nicht belegt [7]. Goldstandard bei EM bleibt die Probenentnahme mit histologischer Diagnosesicherung [1]. Aber auch hier kann ein negativer Histologiebefund die Erkrankung nicht endgültig ausschließen [7]. Intraoperativ wird zeitgleich eine Stadieneinteilung vorgenommen. Weltweit etabliert hat sich die revidierte ASRM-Klassifikation (rASRM) [44]. Sie erfasst die Herdausdehnung, -form und -farbe inklusive Adhäsionen und teilt die Erkrankung in vier Schweregrade (minimal, mild, moderat, schwer) ein. Nicht dokumentiert werden die Infiltrationstiefe, AM und EM extragenitalis. Deswegen wurde im deutschsprachigen Raum zusätzlich die ENZIAN-Klassifikation für die TIE ausgearbeitet unter Mitberücksichtigung von AM und uterusfernen EM-Herden [45]. Kritisiert wird der einseitige Fokus der Klassifikationen auf das makroskopische Erscheinungsbild und die begrenzte prognostische Aussagekraft. Unklar ist auch, wann eine Stadieneinteilung erfolgen sollte, um eine Herdmaskierung im Rahmen einer Hormontherapie (HT) zu vermeiden [46].

Der Endometriose-Fertilitäts-Index (EFI) kann Auskunft über Schwangerschaftschancen geben. Er berücksichtigt den rASRM-Score und anamnestische Informationen zu Alter,

Dauer des unerfüllten Kinderwunsches und früheren Schwangerschaften [27]. Bei EM-assoziiierter Infertilität sollte zudem die ovarielle Reserve, der Tubenfaktor und die Fertilität des Partners abgeklärt werden [25].

Ein AM-Verdacht kann sich bei Symptompersistenz nach EM-Sanierung ergeben. Die Erkrankung kann durch eine Myometriumbiopsie nicht ausgeschlossen werden. Typisch ist eine verbreiterte Junktionszone (JZ) im MRT oder TVUS. Bildgebung und histopathologischer Befund korrelieren oft nicht. Ein bildgebend oder histologisch mehrheitlich akzeptiertes Klassifikationssystem existiert bei AM nicht [12, 21].

1.6 Therapie der Endometriose und Adenomyose

Bei EM ist oft ein dauerhafter Therapieansatz in Form einer Nebenwirkungs-armen, Langzeit-Therapie notwendig, da es sich um eine chronische Erkrankung handeln kann [11]. Die Therapie sollte symptomorientiert und nicht auf eine alleinige Verbesserung des rASRM-Stadiums ausgerichtet sein [37]. Bereits während der histologischen Diagnosesicherung wird eine Herdsanierung empfohlen [4]. Wiederholte operative Eingriffe können zu Verwachsungen mit Schmerzexazerbation führen und bei Endometriomen zu einer reduzierten ovariellen Reserve. Bei über der Hälfte der Patientinnen wird nach sieben Jahren eine Re-OP notwendig [13]. NSAR werden bei EM-assoziierten Schmerzen oft verschrieben [3]. Hormontherapie (HT) und operative Therapie sind bei der Schmerzbehandlung gleichwertig. Durch Kombination beider Therapiemodalitäten können die besten Ergebnisse erreicht werden [13].

Ziel der HT ist es eine EM-Progression zu verhindern, bei signifikanter Reduktion der Schmerzen und Rezidivrate. Wird ein hypoöstrogener Zustand erreicht, kommt es zu Herdatrophie, Reduktion der Entzündungsreaktion und Amenorrhö ohne retrograde Menstruationen. Die HT ist nicht kurativ. Eine präoperative HT hat keine Vorteile und könnte die EM-Herde maskieren. Dagegen sollte eine postoperative HT jeder Patientin ohne unmittelbaren Kinderwunsch empfohlen werden. Erste Wahl im klinischen Alltag sind kombinierte orale Kontrazeptiva (KOK) und Gestagene wie Dienogest, da sie ein gutes Nebenwirkungsprofil bei vergleichbarer Wirksamkeit haben [11]. KOK im Langzyklus sind einer zyklischen Einnahme überlegen [47, 48]. Zweite Wahl sind Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten (GnRHa) wie Leuprorelinacetat [11, 49]. Sie kommen bei Therapieversagen oder refraktären Beschwerden zum Einsatz und werden subkutan injiziert. Nach sechs Monaten sollte die GnRHa-Therapie durch ein Add-back-Verfahren ergänzt werden. Dabei handelt es sich um eine osteoprotektive Nebenwirkungsprophylaxe [11]. In Deutschland sind für die EM-Therapie Dienogest und Leuprorelinacetat zugelassen. In den USA hat der GnRH-Antagonist Elagolix seit 2018 eine Zulassung bei fortgeschrittenen EM-Stadien. Im Vergleich zu GnRHa bleibt ein

initialer Flare-up mit verzögertem Wirkeintritt aus [13, 50]. Bei chronischen Schmerzen ist eine psychosomatische Mitbetreuung hilfreich, da es zu Depressionen und Partnerschaftskonflikten kommen kann [51].

Bei peritonealer EM empfiehlt die ESHRE eine Exzision vor Ablation, während die DGGG keinen Unterschied zwischen den beiden OP-Techniken macht [7]. Bei TIE ist eine Komplettierungs-OP in einem EM-Zentrum sinnvoll [52]. Eine Hysterektomie wird als ultima ratio, v.a. bei abgeschlossener Familienplanung, durchgeführt [4]. Dennoch kann auch bei diesem Eingriff ein Rezidiv, z.B. aufgrund mikroskopischer EM-Herde, nicht komplett ausgeschlossen werden [53].

Bei EM-assoziiierter Infertilität ist eine HT kontraproduktiv, weil sie i.d.R. keine Fertilitätsverbesserung bewirkt und wertvolle Zeit für effektivere, nicht-kontrazeptive Maßnahmen verloren geht [10]. Eine EM-Sanierung bei rASRM I-II erhöht die Chancen für eine Spontankonzeption signifikant [54]. Diese sollte direkt nach der OP angestrebt werden, noch bevor es zu einem Rezidiv kommt. In fortgeschrittenen Erkrankungsstadien wird ein operativer Ansatz zunehmend hinterfragt. Es müssen 7,7 OPs durchgeführt werden, um eine zusätzliche Schwangerschaft zu ermöglichen. Bereits ein IVF-Versuch ist vergleichbar effektiv [10, 54]. Eine ART sollte bei höherem Alter, langandauernder Infertilität, vorangegangenen OPs, reduzierter ovarieller Reserve, schlechtem EFI-Score und Spermiogramm eingesetzt werden. Intrauterine Inseminationen (IUI) mit oder ohne ovarielle Stimulation kommen bei niedrigeren rASRM-Stadien und Tubendurchgängigkeit in Frage. Die IVF ist bei Therapieversagen, männlichem Faktor und Tubenfaktor die effektivste Methode [27].

Bei AM ist die EM-spezifische HT vergleichbar effektiv [1]. Mithilfe eines Levonorgestrel-Intrauterinsystems kann lokal eine höhere Hormonkonzentration, JZ-Dickenabnahme, Schmerzreduktion und verbesserte Lebensqualität erreicht werden [55]. Organerhaltende OPs sind aufgrund der oft diffusen Herdverteilung, hohen Rezidivraten und Perforationsrisiken schwierig. Beispielsweise gibt es die Möglichkeit fokale Herde hysteroskopisch zu entfernen oder eine radikale Exzision nach Osada durchzuführen. AM-Herde können nicht wie Leiomyome ausgeschält werden [56, 57]. Die endgültige Therapieoption ist eine Hysterektomie [58].

1.7 Das Seminalplasma-Protein Semenogelin2

Semenogelin (SEMG) 1 und 2 sind multifunktionale Proteine im menschlichen Körper [59]. Der Genlokus befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 20 [60]. Die Gensequenzen für beide Proteine ähneln sich. 78% der Aminosäure-Sequenz sind identisch, sodass ein gemeinsamer Ursprung von einem Vorläufergen angenommen wird [61]. Der Hauptunterschied zwischen beiden Proteinen ist das Ausmaß der Glykosylierung. SEMG2 hat zusätzliche Glykosylierungsstellen und somit ein größeres Molekulargewicht. Es liegt häufig in einer 71 und 76kDa schweren Form vor [60].

Im Gegensatz zu SEMG1 wurde SEMG2 deutlich weniger erforscht, aber beide SEMGs haben vergleichbare Eigenschaften [62, 63]. Sie wurden in den 1980ern im menschlichen Seminalplasma als gelformierende Proteine identifiziert und dementsprechend benannt [64]. Sie interagieren mit vielen Proteinen [65]. SEMGs werden im männlichen Reproduktionstrakt v.a. im Zytoplasma des Bläschendrüsens-Epithels exprimiert. Sie wurden auch im luminalen Epididymis- und Vas deferens-Epithel nachgewiesen [66, 67]. Sie sind spermienbindende Proteine. Die Adsorption an die Spermienmembran erfolgt über die epididymalen Oberflächenrezeptoren *epididymal peptidase inhibitor* (EPPIN) und CD52 in der Cauda epididymis sowie während der Ejakulation [68]. Bei dieser kommen SEMGs als Bläschendrüsens-Sekretionsprodukt mit spermienhaltiger Nebenhodenflüssigkeit und Sekreten aus anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen in Kontakt [64]. Auch ionische Wechselwirkungen bedingen SEMG-Spermien-Bindungen. Die basischen SEMGs interagieren mit ihren negativen Oberflächenladungen mit positiv geladenen Sialinsäuren auf der Spermienoberfläche [65].

Die SEMGs machen mit 20-50% den mengenmäßig größten Anteil an ejakuliertem Protein aus, was auf eine wichtige Rolle im Rahmen der Fortpflanzung hinweist [64]. Als Seminalplasma-koagulierende Proteine bilden sie über nicht-kovalente Bindungen ein gelartiges Netzwerk. Darin eingeschlossen befinden sich immobilisierte, über CD52 verankerte Spermien [68]. Dadurch wird ein übermäßiger Spermienverlust durch vaginalen Ausfluss verhindert [59]. Eine progressive Spermienfreisetzung setzt innerhalb von 15min im Rahmen der Ejakulat-Verflüssigung ein [64]. Dabei werden die hochmolekularen, unlöslichen SEMG-Komplexe durch prostatitisches Prostataspezifisches Antigen (PSA) bzw. Kallikrein3 (KLK3) in lösliche SEMG-Fragmente gespalten, sodass sich das Gel auflöst. Der Prozess setzt bereits während der Ejakulation bei Durchmischung des Prostata- und Bläschendrüsens-Sekrets ein und ist ein selbstlimitierendes System. PSA wird durch freies Zn^{2+} inhibiert. SEMGs haben eine hohe Zn^{2+} -Bindungskapazität und leiten dadurch den eigenen Abbau ein. Durch den

Konzentrationsabfall des ungebundenen Zn^{2+} wird eine proteolytische Kaskade in Gang gesetzt, PSA wird aktiviert und allmählich wieder inhibiert, da bei der SEMG-Spaltung PSA-inhibierendes Zn^{2+} freigesetzt wird. Auf diese Weise wird eine übermäßige, Spermien-schädigende Proteolyse vermieden [59, 63]. Eine abweichende Ejakulat-Verflüssigung kann zu hyperviskösem Sperma und Subfertilität mit eingeschränkter Spermienprogression führen. In diesem Sinne ist die SEMG-Konzentration bei Asthenospermie erhöht [69].

Die SEMGs sind reversible Spermien-Motilitätsinhibitoren. Das SEMG-Netzwerk bewirkt eine mechanische Immobilisierung frisch ejakulierter Spermien. Zudem führt eine direkte SEMG-Spermien-Interaktion zum Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit komplettem Arrest der Flagellen-Bewegung. Gewaschene und somit *in vitro* von SEMG befreite Spermien erlangen ihre Beweglichkeit wieder [59, 70]. Das Protein ist ein Spermien-benetzendes Antigen, das großflächig auf der Spermienoberfläche verteilt ist und auf diese Weise bis zum Eileiter gelangen kann [71]. Immunzytochemisch wurde die stärkste Immunreaktivität im Spermien-Mittelteil nachgewiesen, der die für Stoffwechsel und Motilität wichtigen Mitochondrien beinhaltet [66]. Die temporäre Immobilisierung im Ejakulat ist eine Energiesparmaßnahme und ein Selektionsmechanismus, da eine vorzeitige energetische Verausgabung der Spermien verhindert wird und ungeeignete Spermien ihre Beweglichkeit nicht wiedererlangen. Außerdem können in dieser Zeit verschiedene, für die Spermien-Aszension wichtige Seminalplasma-Bestandteile an die Spermienmembran adsorbieren. Auch SEMG-Spaltprodukte wie der 18kDa schwere Seminalplasmainhibitor SPMI wirken vorübergehend motilitätsinhibierend, bevor diese Wirkung durch PSA aufgehoben wird [59]. Ein höherer Anteil SPMI-gebundener Spermien ist mit einer reduzierten Spermienmotilität assoziiert. Die durchschnittliche SEMG-Konzentration im Seminalplasma liegt bei $19 \pm 13 \text{ mg/ml}$ mit einer Spannbreite von $4\text{--}68 \text{ mg/dl}$ [72]. In Proteom-Analysen war die SEMG-Expression bei infertilen Männern und IVF-Versagern höher [73].

SEMG und SEMG-Spaltprodukte sind Dekapazitationsfaktoren. Eine vorzeitige Spermienreifung wird durch Inhibition der Superoxidanion-generierenden Spermienoxidase verhindert. Bereits $1/300$ der Seminalplasma-Konzentration von SEMG ist dafür ausreichend [74]. SEMG-inkubierte Spermien entwickeln das Kapazitation-typische, hyperaktivierte Bewegungsmuster nicht. Die Kapazitation ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Spermien-Eizell-Fusion, aber ein frühzeitiges Einsetzen dieses posttestikulären Spermienreifungsprozesses ist mit Infertilität assoziiert [63]. Bei Mäusen ist das SEMG-Homologon Semenoclotin 2 (SVS2) als Dekapazitationsfaktor essentiell für das intrauterine Spermienüberleben und bietet Schutz vor uterinen Zytotoxinen [59, 75, 76].

Intaktes und fragmentiertes SEMG hat antibakterielle Eigenschaften. Diese schützen aufsteigende Spermien auf dem Weg in das keimarme Uteruscavum vor Laktobazillen und potentiellen Pathogenen im Vaginalkanal. Die antibakterielle Aktivität ist nach der Ejakulat-Verflüssigung am höchsten. Zu diesem Zeitpunkt geht die gelförmige Schutzbarriere verloren und die Spermien sind dem vaginalen Milieu direkt ausgesetzt. Durch Spermien-gebundene SEMG-Fragmente wird das Risiko einer Pathogen-Verschleppung in den oberen Genitaltrakt der Frau reduziert [76].

SEMG wird auch außerhalb des männlichen Genitaltrakts exprimiert. Es kommt in Zn^{2+} -reichen Umgebungen vor, wie der Prostata oder dem Pigmentepithel der Retina und reguliert Zn^{2+} -abhängige Proteasen sowie die extrazelluläre Zn^{2+} -Konzentration. Ein SEMG-Molekül kann bis zu zehn Zn^{2+} -Ionen sequestrieren [77]. Als Zn^{2+} -Speicher könnte es das Voranschreiten der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) verlangsamen und Tumorzellen vor einer zytotoxischen Zn^{2+} -Wirkung abschirmen [59, 78]. SEMGs wurden in Zellen aller Keimblätter nachgewiesen und sind nicht auf Epithelzellen beschränkt. Die Proteine kommen in Trachea, Brust- und Speicheldrüsen, Skelettmuskulatur, Nierentubuli sowie vereinzelt in ZNS-Neuronen vor. SEMG2 ist ein autosomales Cancer Testis Antigen (CTA), da es im Hoden exprimiert und in Neoplasien reexprimiert wird. CTAs sind Trigger der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT), einem Prozess bei dem Epithelzellen im Kontext von Wundheilung, Fibrose und Metastasierung mesenchymale Eigenschaften erlangen. Die SEMG-Funktion in Tumorzellen ist widersprüchlich. Es könnte als Motilitätsinhibitor tumorsuppressive und als Fänger von freien Zinkionen und freien Sauerstoffradikalen (ROS) onkogene Eigenschaften besitzen [70]. Unklar ist, ob diese reproduktiven SEMG-Funktionen auf Tumorgewebe übertragbar sind.

1.8 Das Aktinfilament-assoziierte Protein Calponin1

Calponin1 (CNN1) ist ein Aktinfilament-assoziiertes, regulatorisches Protein. Es wird im menschlichen Körper v.a. in glatten Muskelzellen, aber auch in Myofibroblasten und anderen Stromazellen exprimiert [79]. Das CNN1-Gen auf Chromosom 19 kodiert das 34kDa schwere, basische Protein [80]. Es existieren drei Calponin-Isoformen, die in der mittleren Region zwei konservierte Aktinbindungsstellen haben sowie ein gemeinsames N-terminales Sequenzmotiv. Dieses wird als *Calponin Homologie (CH-) Region* bezeichnet und kommt auch bei anderen Aktin-bindenden Proteinen vor [81]. CNN1 bindet über die CH-Region an eine für die Zellproliferation und -adhäsion wichtige *mitogenaktivierte Proteinkinase* (MAPK), nicht aber Aktin [82]. Eine variable C-terminale Region bedingt Größen-, Ladungs- und wahrscheinlich auch Funktionsunterschiede zwischen den Calponin-Isoformen [81].

CNN1 wurde in den 1980ern in glatten Muskelzellen des Hühnermagens entdeckt [83]. Eine inhibitorische Funktion, vergleichbar zu der von Troponin T in quergestreifter Muskulatur, wurde vermutet. CNN1 reguliert aber nicht nur die kontraktilen Aktin-Myosin-Filamente, sondern auch das nicht-kontraktile Aktin-Zytoskelett [79]. Als Bestandteil des kontraktilen Systems in glatten Muskelzellen und Myofibroblasten ist es für die Muskelkontraktion aber nicht essenziell. So blieben CNN1-Knockout-Mäuse überlebensfähig und fertil [84]. CNN1 ist auf Aktinfilamenten lokalisiert und inhibiert die Myosin ATPase, sodass keine Aktinbewegung über die immobilisierten Myosinköpfe stattfindet [85]. Die Inhibition kann durch Phosphorylierung aufgehoben werden. Dabei löst sich CNN1 von den Aktinfilamenten, aber diese Dissoziation ist *in vivo* nicht nachweisbar. Möglicherweise wird phosphoryliertes CNN1 direkt abgebaut [86]. Die CNN1-Expression in glatten Muskelzellen variiert, da das Protein insbesondere in ausdifferenzierten Muskelzellen vorkommt [81]. CNN1 interagiert mit vielen anderen zytoskelettalen Proteinen. Zu den CNN1-Bindungspartnern zählen Calmodulin, Tropomyosin, Myosin, Desmin, Tubulin und Phospholipide [79]. Die Funktion dieser Interaktionen ist bisher nicht geklärt.

CNN1 stabilisiert Aktin-Stressfasern, kann diese durch Quervernetzung bündeln und somit die zytoskelettale Spannung reduzieren [81]. Es wird *transforming growth factor beta* (TGF-beta) -induziert in pulmonalen Myofibroblasten exprimiert, die in einem EMT-ähnlichen Prozess bei Lungenfibrose aus humanen Pleuramesothelzellen (HPMCs) hervorgehen. CNN1 erleichtert die Stressfaserformation und ist mit ventralen Stressfasern assoziiert, die mechanisch auf die Extrazellulärmatrix (EZM) einwirken. Auf diese Weise könnte das Protein die zelluläre Motilität regulieren und eine Zellmigration verhindern [87].

CNN1 wird auch in glatten Muskelzellen und Myofibroblasten des Uterus exprimiert. Es inhibiert die glattemuskuläre Zellproliferation im Myometrium und in Leiomyomen [88]. Eine CNN1-Überexpression in Zellkulturen mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten ging mit einer reduzierten Proliferationsrate einher [89]. Im Gegensatz dazu war das Protein in glatten Muskelzellen herunterreguliert, die von der G₀- in die G₁-Zellzyklusphase bzw. Proliferation übergehen [90].

CNN1 wurde in EM-Läsionen identifiziert. Bei EM-positiven Pferden wurde es in Drüsen und Stroma des Endometrium nachgewiesen. Die glanduläre CNN1-Expression wurde als unvollständige myoepitheliale Differenzierung gewertet. Als Regulator der zellulären Kontraktilität, Proliferation, Migration und Differenzierung könnte das Protein in der EM-Pathogenese involviert sein [91].

CNN1 kommt u.a. bei Hepatozellulärem Karzinom (HCC) und in Nieren- und Brustkrebsarten vor. Eine reduzierte CNN1-Expression in Tumorzellen geht mit zytoskelettalen Veränderungen einher [81]. Bei Fibro- und Leiomyosarkomen wirkt es als Tumorsuppressor und die Proteinkonzentration ist in diesen Fällen positiv mit der Prognose korreliert [92].

1.9 Die Marker CD10 und Claudin3

CD10 ist eine Zn²⁺-abhängige Endopeptidase, die an Stammzellformierung und Tumorprogression beteiligt ist [93]. Das Protein wird Zyklusphasen-unabhängig in Stromazellen des humanen Endometrium exprimiert und ist wichtig für die endometriale Regenerationsfähigkeit [94]. Als spezifischer EM-Marker ist es hilfreich bei der Detektion von EM-Herden, da ektopes Stroma i.d.R. CD10-positiv ist [95].

Claudin3 ist als Tight Junction-Komponente wichtig für die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten und hat eine Barrierefunktion. Das Protein hemmt die EMT und die Zellmigration und -invasion beim kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC). Als Transmembranprotein wird es apikolateral in Epithel- und Endothelzellen exprimiert [96]. Nahezu 100% der luminalen und glandulären Epithelzellen im Endometrium sind Claudin3-positiv. Es kommt ebenfalls in EM-Drüsen unabhängig von der EM-Entität vor [97].

Beide Proteine wurden in eutopem und ektopem Endometrium charakterisiert [94, 97], sodass sie als CNN1-Vergleichsmarker in uterinen Serienschnitten geeignet sind.

1.10 Fragestellung und Zielsetzung bei SEMG2

Weltweit gibt es ca. 140 Mio. infertile Menschen, mit steigender Tendenz [98]. Infertile EM-Patientinnen müssen häufig mehrere IVF-Zyklen durchlaufen und invasive EM-Sanierungen haben oft nur einen moderaten Effekt auf die Fertilität [3]. Ein detaillierteres reproduktionsphysiologisches Verständnis ist angesichts steigender Infertilitätszahlen von elementarer Bedeutung und würde langfristig eine bessere Therapie bei EM-assoziiierter Infertilität ermöglichen. So werden Interaktionen zwischen Seminalplasma-Bestandteilen, aufsteigenden Spermien und Sekretionsprodukten des weiblichen Reproduktionstrakts zu wenig beachtet, da sie bei der IVF umgangen werden und deshalb irrelevant erscheinen. Sie tragen aber dazu bei, dass für eine erfolgreiche, natürliche Eizellbefruchtung einige wenige, natürlich selektierte Spermien ausreichen, während bei der IVF mehrere Tausend benötigt werden [99]. Einige Seminalplasma-Proteine werden auch im weiblichen Genitaltrakt exprimiert [100]. Bei SEMGs als mengenmäßig wichtigsten Seminalplasma-Proteinbestandteilen ist dies weitestgehend unerforscht. Bekannt ist, dass SEMG-Fragmente Spermien-gebunden bis in das Uteruscavum gelangen können und dort eine Spermien-protective Wirkung haben und, dass das im Mäuseuterus exprimierte SEMG-Homologon SVS2 wichtig für das intrauterine Spermien-Überleben ist [71, 75].

Vor diesem Hintergrund soll immunhistochemisch untersucht werden, ob SEMG2 im humanen Uterus und insbesondere im Endometrium vorkommt. Eine entscheidende Frage ist, ob weibliches SEMG2 vergleichbare Funktionen wie Spermien-gebundene SEMG-Fragmente aus dem männlichen Genitaltrakt haben. Als uterines Sekretionsprodukt könnte es mit aufsteigenden Spermien interagieren. Denkbar ist auch, dass die uterine SEMG2-Expression bei Endometriose und im Laufe des Menstruationszyklus, insbesondere in der zweiten Zyklushälfte verändert ist. In diesem Zeitraum ist der weibliche Reproduktionstrakt für männliche Keimzellen zugänglich [101]. Zur Klärung dieser Fragen und Hypothesen wird ein uterines Expressionsprofil des Proteins qualitativ und quantitativ erfasst.

Bis zu 8% der weiblichen Infertilitätsfälle sind auf eine abweichende Zervixschleim-Produktion zurückzuführen [101]. Durch Gegenüberstellung infertiler und fertiler Mukusproben aus dem Endozervix wird mittels ELISA untersucht, ob der SEMG2-Gehalt bei Infertilität abweicht; weiterhin, ob die SEMG2-Konzentration durch Zyklusphase, EM oder HT beeinflusst wird. Vergleichbare Tendenzen bei den Faktoren Zyklusphase und EM könnten ein Indiz auf eine ähnliche Funktion des Proteins in Endozervix und Endometrium sein.

1.11 Fragestellung und Zielsetzung bei CNN1

Die AM ist im Vergleich zur EM ein vernachlässigtes Erkrankungsbild, für das es keine einheitliche histopathologische oder bildgebende Definition gibt. Stattdessen existieren widersprüchliche Aussagen zum prognostischen Wert einzelner Klassifikationssysteme [12, 41]. Auch gibt es im Gegensatz zur EM keine AM-spezifische medikamentöse Therapie. Diese Probleme könnten durch ein besseres pathogenetisches AM-Verständnis leichter bewältigt werden. Haupttheorie zur AM-Entstehung ist eine vom basalen Endometrium ausgehende Myometriums-Invasion. Hierbei könnten auch Myofibroblasten eine Rolle spielen [102].

In dieser Arbeit werden CNN1-Expressionsmuster in Uterusproben von Probandinnen mit AM analysiert. Somit wird auch die Rolle von Myofibroblasten bei AM untersucht, da CNN1 auch in diesen Zellen exprimiert wird [79]. Zur Analyse der CNN1-Expression in Uteri mit AM wurde das Gewebe in mehrere Abschnitte unterteilt. Glanduläres Epithel (GE) und Stroma werden jeweils separat untersucht. Bei CNN1-positiven Drüsen und CNN1-positivem Stroma werden Folgeschnitte mit Claudin3 bzw. CD10 angefertigt, um die immunreaktiven Zellen genauer zu charakterisieren. Verschiedene stromale Expressionsmuster und ihre Häufigkeitsverteilung könnten Rückschlüsse zum Ursprung der CNN1-positiven Zellen ermöglichen. CNN1-positive und negative Drüsen werden bezüglich verschiedener Probandinnenmerkmale verglichen.

Ein Zusammenhang zwischen AM und EM wird vermutet. Dies verdeutlichen Begriffe wie *Endometriosis interna* und auch die ICD-10-WHO führt AM als *Endometriose des Uterus* auf [103, 104]. Bei der immunhistochemischen Untersuchung AM-haltiger Uterusproben wird deswegen auf Hinweise für Gemeinsamkeiten zwischen beiden Erkrankungen geachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die Studien zu SEMG2 und CNN1 wurden an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt und von der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin genehmigt (95/09). Die Uterus- und Mukusproben stammten aus dem Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Gießen. Alle Studienteilnehmerinnen hatten eine schriftliche Einverständniserklärung für die Probenentnahme und Erhebung klinischer Daten zu Forschungszwecken abgegeben. Die uterinen Gewebeproben wurden am pathologischen Institut der Universitätsklinik makro- und mikroskopisch untersucht. Gewebeteilstücke wurden archiviert und zusammen mit den Mukusproben aus dem Mukus-Gewebe-Archiv der Arbeitsgruppe Konrad bezogen. Ausschlusskriterien waren Langzeitzyklus-Gewebeproben, Infektionen des weiblichen Reproduktionstrakts, Malignome, Menopause und laborchemisch gesicherte Schwangerschaften.

2.1.1 Gewebeproben für die SEMG2 Immunhistochemie

Die für SEMG2 ausgewählten uterinen Gewebeproben wurden im Rahmen von Hysterektomien und Abrasionen zwischen Juni 2010 und März 2018 entnommen (Abb. 1). Indikationen für den operativen Eingriff waren Leiomyome, Endometriose, Unterbauchschmerzen und abnorme uterine Blutungen (AUB). Untersucht wurden 35 Uterusproben von Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 39 Jahren.

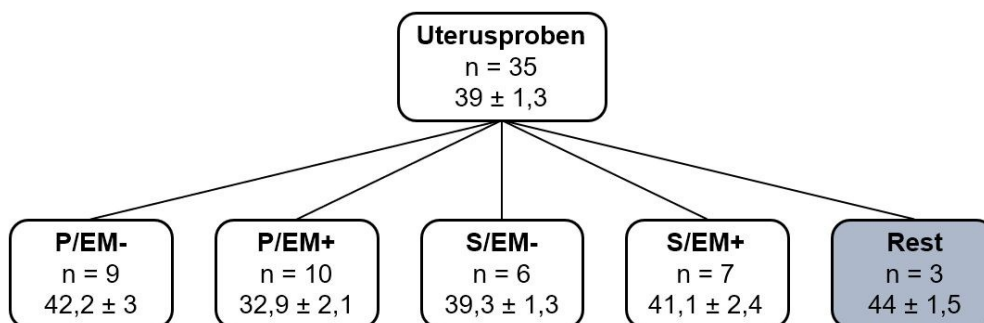


Abbildung 1: Einteilung der SEMG2-Gewebeproben für die immunhistochemische Analyse anhand von Zyklusphase und EM-Erkrankung. Das Alter wurde als Mittelwert $\pm$ Standardfehler für alle Gruppen angegeben. P = proliferativ, S = sekretorisch, EM- = Endometriose-negativ, EM+ = Endometriose-positiv, Rest = nicht-datierbare Gruppe.

Es wurden vier Vergleichsgruppen mit proliferativen und sekretorischen Proben von Endometriose-negativen und -positiven Probandinnen gebildet. Die Erkrankungsherde waren an unterschiedlichen Stellen im Bauchraum lokalisiert. Peritoneale, ovarielle und TIE waren vertreten. Die Uterusproben von drei der 35 Probandinnen bildeten das normale Zyklusgeschehen nicht ab und wurden in einer separaten Gruppe untersucht.

Sie setzte sich aus zwei Proben mit Metaplasie-artigen epithelialen Veränderungen (EMCs) [105] sowie einer Endozervix-Probe zusammen. Die zyklusphasen-gerechte Einteilung der Gewebe basierte auf der Anamnese der Patientinnen sowie der histomorphologischen Auswertung des pathologischen Instituts der Universitätsklinik. Letztere wurde zusätzlich von einem unabhängigen Untersucher der Laborgruppe verifiziert, entsprechend den Datierungskriterien von Noyes [106]. Sieben der 38 Proben waren Abradate und beinhalteten kein Myometrium.

2.1.2 Mukusproben für die SEMG2 Untersuchung

Der SEMG2 Gehalt wurde in 134 zervikalen Mukusproben aus dem Zeitraum von November 2014 bis April 2019 analysiert. Je eine Probe wurde pro Probandin zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Menstruationszyklus entnommen. Mukus wurde aus dem Zervikalkanal und Scheidengewölbe mithilfe eines Wattetupfers bei SpekulumEinstellung unter Sicht gewonnen. Das Probenmaterial wurde direkt vor Ort in ein eisgekühltes Gemisch aus PBS-Puffer und Protease-Inhibitor-Cocktail-Lösung (P1860, Sigma) transferiert. Anschließend wurde es im Labor bei 1000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und auf maximal vier Eppendorf Hütchen aliquotiert. Diese wurden bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert. Alle 134 Probandinnen hatten die Endometriose-Sprechstunde der gynäkologischen Poliklinik aufgesucht und den Endometriosefragebogen ausgefüllt [43]. Ausgewertet wurden Angaben zu Fertilität, Alter, Zyklustag und -länge sowie zu Endometriose-typischen Symptomen, Medikationen und Operationen. Probandinnen mit unvollständigen Fragebogenangaben wurden bei der Auswertung des jeweiligen Merkmals nicht berücksichtigt. Konsultationsgründe waren Endometrioseverdacht, unerfüllter Kinderwunsch, Operationsplanung und Verlaufskontrollen unter medikamentöser Therapie sowie nach operativer Sanierung von Endometrioseherden. Eingeschlossen wurden Patientinnen im reproduktiven Alter, darunter zwei Sonderfälle mit blind endendem Zervixstumpf bei Zustand nach laparoskopischer suprazervikaler Hysterektomie (LASH). Auch bei diesen beiden Probandinnen war eine Entnahme von endozervikalem Mukus möglich.

Die 134 Probandinnen wurden entsprechend der Anamnese in eine fertile und infertile Gruppe aufgeteilt (Abb. 2).

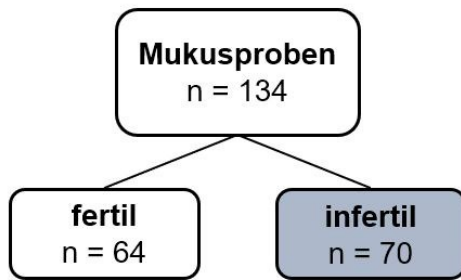


Abbildung 2: Aufteilung der Mukusproben für den SEMG2 ELISA. Die Proben wurden entsprechend der Fertilität der Probandinnen gruppiert. Die Angaben stammten aus dem jeweiligen Fragebogen in Übereinstimmung mit der Patientenakte.

Alle unfruchtbaren Probandinnen hatten einen unerfüllten Kinderwunsch, trotz ungeschützten, regelmäßigen Geschlechtsverkehrs über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr. Frauen mit primärer und sekundärer Sterilität wurden zusammengefasst. Bei primärer Sterilität tritt keine Schwangerschaft ein. Bei sekundärer Sterilität war die betroffene Frau bereits mindestens einmal schwanger, unabhängig davon, ob diese Schwangerschaft erfolgreich ausgetragen wurde oder im Abort endete. Vor der Studienteilnahme kamen bei sieben Probandinnen assistierte Reproduktionsmaßnahmen in Form von intrauteriner Insemination und in-vitro-Fertilisations-Versuchen (IUI, IVF) erfolglos zum Einsatz.

Sterilitätsfaktoren waren Endometriose, Myome, eingeschränkte Tubendurchgängigkeit, Ovarialinsuffizienz bei Polyzystischem Ovarialsyndrom (PCOS), *premature ovarian failure* (POF) sowie Hyperprolaktinämie. In 17 Fällen waren die zugrundeliegenden Ursachen für die Fertilitätsstörung unbekannt (Abb. 3). An Endometriose Erkrankte waren auch in der fertilen Gruppe vertreten.

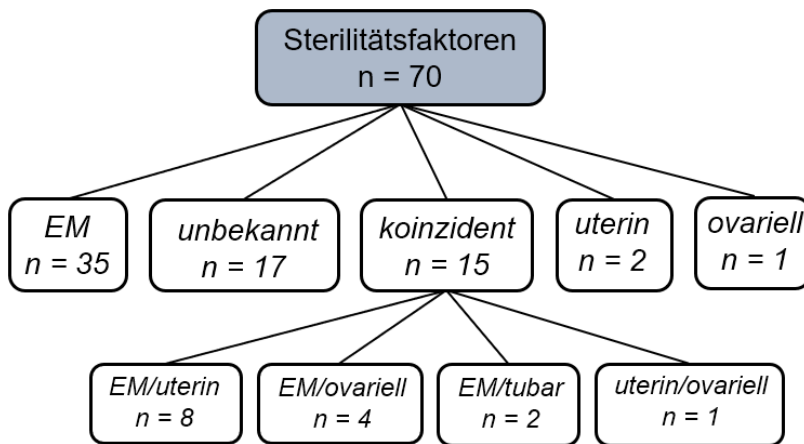


Abbildung 3: Sterilitätsfaktoren der infertilen Probandinnen. In der infertilen Gruppe wurden 70 Probandinnen mit verschiedenen Sterilitätsfaktoren zusammengefasst, darunter uterine (Myome), ovarielle (Ovarialinsuffizienz), tubare (Tubendurchgängigkeit ↓) sowie Endometriose (EM). Am häufigsten war Endometriose, gefolgt von Myomen, ovariellen und Tubenfaktoren vertreten. In 15 Fällen lagen jeweils zwei Unfruchtbarkeitsursachen gleichzeitig vor (koinzident). Bei 17 Probandinnen war der zugrundeliegende Sterilitätsfaktor unbekannt.

Weiterhin wurden die 134 Probandinnen in eine proliferative und sekretorische Gruppe eingeteilt (Abb. 4). Die Gruppenzugehörigkeit konnte anhand der Fragebogenangaben zu den Zyklustagen und -längen ermittelt werden. 90 der 134 Frauen konnten Zyklusphasen-gerecht zugeordnet werden. Nicht möglich war dies bei Probandinnen im Langzeitzyklus und nach suprazervikaler Hysterektomie. Vier Probandinnen mit Amenorrhö wurden ebenfalls ausgeschlossen (Abb. 4).

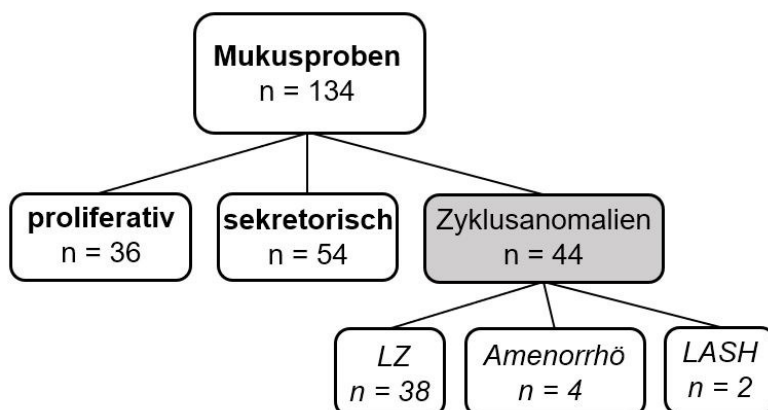


Abbildung 4: Einteilung der Mukusproben anhand des Menstruationszyklus. 90 Probandinnen konnten einer Zyklushälfte zugeordnet werden. Vom Zyklusphasen Vergleich ausgeschlossen waren Probandinnen im Langzeitzyklus (LZ), mit Amenorrhö sowie nach laparoskopisch assistierter suprazervikaler Hysterektomie (LASH).

Zudem wurde eine Aufteilung in eine Endometriose-negative ($n = 45$) und -positive ($n = 89$) Gruppe vorgenommen (Kap. 3.8). Alle Endometriose-positiven Probandinnen hatten eine histologisch gesicherte Diagnose und befanden sich in unterschiedlichen Erkrankungsstadien (Abb. 5): Bei Erst- und Rezidiv-diagnostizierten Patientinnen (21%) bestätigte sich die Endometriose nachträglich. Sie wurden im Anschluss an die Fragebogen-Erhebung laparoskopiert. Dabei konnten Endometriose-verdächtige Herde entfernt und histopathologisch verifiziert werden. Alle anderen Endometriose-positiven Patientinnen (79%) hatten bereits eine oder mehrere operative Endometriose-Sanierungen vor Fragebogen-Teilnahme mit Mukusproben-Entnahme. Sie stellten sich in der Endometriose-Sprechstunde im Rahmen eines postoperativen Kontrolltermins sowie bei klinisch-anamnestischem oder bildgebendem Rezidiv-Verdacht vor. Dieser wurde in der Sprechstunde bestätigt (46%) oder als unwahrscheinlich diagnostiziert (33%).

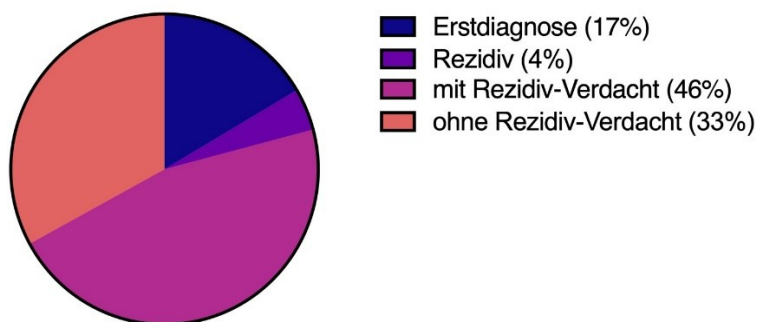


Abbildung 5: Zusammensetzung der Endometriose-positiven Probandinnen. Als Endometriose-positiv wurden Frauen mit histologisch gesicherter Diagnose vor oder unmittelbar nach Probeentnahme in unterschiedlichen Erkrankungsstadien gewertet.

Endometriose-negative Probandinnen hatten, abgesehen von einer Ausnahme, einen initialen Endometriose-Verdacht. Dieser bestätigte sich im weiteren Verlauf nicht. Ursachen für die Schmerzsymptomatik waren Myome, symptomatische Ovarialzysten, postoperative Adhäsionen, rezidivierende Harnwegsinfekte, Obstipation sowie ein disloziertes Intrauterinsystem. Bei allen Endometriose-negativen und -positiven Probandinnen wurden die Endometriose-spezifischen Symptome Dysmenorrhö, chronischer Unterbauchschmerz, Dysurie, Dyschezie und Dyspareunie erfasst.

Die Probandinnen wurden auch in Nicht-Hormontherapierte ($n = 67$) und Hormontherapierte ($n = 67$) aufgeteilt (Kap. 3.8). Als *hormontherapiert* wurden alle Probandinnen gewertet, die Hormonpräparate verwendeten, darunter Kontrazeptiva (Mikro-, Minipillen, Lenovorgestrel-haltige Intrauterinsysteme) und Hormontherapeutika mit Zulassung für die Endometriose-Therapie (Dienogest und Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten).

111 der 134 Probandinnen machten Angaben zum Gebrauch von Schmerzmitteln, darunter v.a. NSAR, seltener Paracetamol, Metamizol und Butylscopolamin als Spasmoanalgetikum sowie in acht Fällen Opioide. Ca. die Hälfte der Frauen waren bereits in einer anderen Frauenklinik operiert worden, bevor sie die Endometriose-Sprechstunde des UKGM aufsuchten.

2.1.3 Gewebeproben für die CNN1 Immunhistochemie

Die für CNN1 ausgewählten uterinen Gewebeproben wurden im Rahmen von Hysterektomien zwischen Oktober 2010 und März 2018 entnommen. Die OP-Indikationen waren Leiomyome, Endometriose, Adenomyose und Descensus uteri. Insgesamt wurden 31 prämenopausale Probandinnen mit einem durchschnittlichen Alter von 42 Jahren in die Studie einbezogen (Tab. 1). Im archivierten Probenmaterial von vier Probandinnen mit gesicherter Adenomyose waren keine Erkrankungsherde identifizierbar. Sie wurden weiterhin als Adenomyose-positiv gewertet, da in der Pathologie das andere Gewebeteilstück positiv befundet war. In sechs Fällen konnte die Erkrankung nachträglich festgestellt werden. Somit waren alle 31 Probandinnen AM-positiv. Sie hatten eine 48%ige (15/31) Endometriose- und 52%ige (16/31) Uterusmyom-Komorbidität.

Die 31 Uterusproben umfassten unterschiedliche Gewebebereiche (Tab. 1). Bevorzugt untersucht wurde Probenmaterial, das Basalis, endomyometrialen Übergang und mehrere adenomyotische Läsionen enthielt. Ein intaktes oder vorhandenes Endometrium war nicht bei allen Proben erforderlich. Luminale Epithel war auf sieben CNN1-Proben sichtbar. Bei annähernd der Hälfte aller Gewebeschnitte (45%) fehlte das Endometrium. Sie bestanden aus Myometrium mit ektopen Schleimhautinseln. Diese waren, mit ausreichend großem Abstand zu den Resektionsrändern, zweifelsfrei adenomyotisch. Am häufigsten wurde die Lokalisation von CNN1 in den AM-Läsionen untersucht, gefolgt von den darüberliegenden Gewebeabschnitten endomyometrialer Übergang, Basalis, Funktionalis und lumbinales Epithel. Bei positiver Immunfärbung für CNN1 wurden Folgeschnitte analysiert, die nahezu identische Gewebebereiche derselben Uterusprobe aufwiesen. Bei einer CNN1-Expression im Stroma kam CD10 zum Einsatz. CNN1-positives Drüsenepithel wurde mit Claudin3 nachuntersucht. Zeigte sich eine Immunreaktivität in beiden Gewebekomponenten, wurden jeweils CD10- und Claudin3-Serienschnitte angefertigt.

Tabelle 1: Uterusproben für CNN1 und Folgefärbungen mit CD10 und Claudin3

Abschnitte	LE – AM	LE – Ü	F – AM	B – AM	B – Ü	Ü – AM	AM
%	16,1%	6,5%	3,2%	19,4%	6,5%	3,2%	45,2%
(n/N)	(5/31)	(2/31)	(1/31)	(6/31)	(2/31)	(1/31)	(14/31)
Regionen	LE	F	B	JZ	AM		
%	22,6%	25,8%	51,6%	54,8%	87,1%		
(n/N)	(7/31)	(8/31)	(16/31)	(17/31)	(27/31)		

Eine Probengruppierung gemäß enthaltener Uterusabschnitte wurde durchgeführt. Die prozentualen und relativen (n/N) Häufigkeiten der Einzelgruppen wurden angegeben. LE = luminales Epithel und angrenzender Funktionalis-Bereich, F = Funktionalis, B = Basalis, Ü = endomyometrialer Übergang, AM = Adenomyose-Läsion.

Zur besseren Vergleichbarkeit der uterinen CNN1-Expression wurden die Uterusproben in Abschnitte eingeteilt (Abb. 6). Die Adenomyose wurde entsprechend der S2k-Endometrioseleitlinie definiert. Eine Erkrankung lag vor, wenn sich zwischen der tiefsten Stelle der Junktionszone und dem oberflächlichsten ektopen Schleimhautherd eine mindestens 2,5 mm breite Muskelschicht befand. Dieser Abstand ist allerdings willkürlich (von Pathologen) festgelegt.

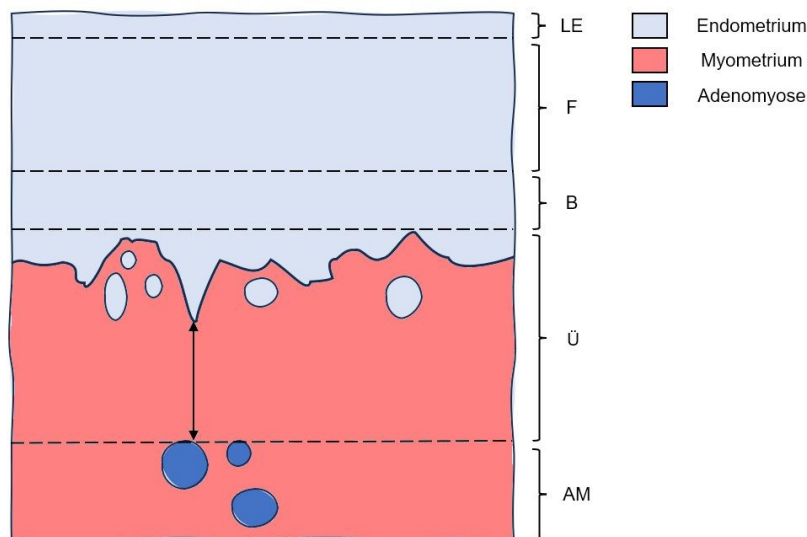


Abbildung 6: Schematische Darstellung der uterinen Gewebeabschnitte. Adenomyotische Läsionen waren definitionsgemäß erst ab einer Eindringtiefe von mindestens 2,5 mm identifizierbar (Doppelpfeil). Die Legende zeigt die einzelnen Gewebetypen farbkodiert an. LE = luminales Epithel und angrenzender Funktionalis-Bereich, F = Funktionalis, B = Basalis, Ü = endomyometrialer Übergang, AM = Adenomyose-Läsion.

2.1.4 Puffer und Chemikalien

Während einige der Lösungen gebrauchsfertig waren, mussten andere erst angesetzt werden (Tab. 2). Hergestellt wurde die Alkoholreihe aus >99,6%-Ethanol, Citratpuffer (pH 6,0) aus Citronensäure und Natriumcitrat in jeweils 1000ml Aqua dest., PBS-Puffer (0,02 M) mit PBS-Tabletten, 3%-Wasserstoffperoxid/Methanol-Lösung aus 30%-Wasserstoffperoxid und Methanol. Der BSA/Triton-Puffer wurde aus proteasefreier Albuminfraktion V, Triton-X100 sowie PBS-Puffer angesetzt. Die Primärantikörper wurden mit *Real Antibody Diluent* verdünnt. Die DAB-Lösung setzte sich aus Substratpuffer und Chromogen zusammen.

Tabelle 2: Puffer und Chemikalien

Reagenzien	Anfertigung	Hersteller
Antikörper-Diluent	gebrauchsfertig	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Bouin'sche Lösung	gebrauchsfertig	Morphisto, Frankfurt
BSA-Puffer	1g BSA (Fraktion V) in 70ml PBS-Puffer, mit 21µl Triton X-100	C. Roth, Karlsruhe Gibco, Waltham, USA Merck, Darmstadt
Citratpuffer (pH 6,0)	A: 29,4g Natriumcitrat in Aqua dest. (0,1M) B: 21g Zitronensäure in Aqua dest. (0,1M) Lösung A + B auf pH=6,0 eingestellt	Merck, Darmstadt
DAB-Lösung	1 Tropfen DAB pro ml Substratpuffer	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Ethanol	Ethanol (>99,6%) in Aqua dest.	O. Fischar, Saarbrücken
Eukitt	gebrauchsfertig	Sigma, St. Louis, USA
Hämatoxylin (nach Mayer)	gebrauchsfertig	Morphisto, Frankfurt
H ₂ O ₂ /Methanol- Lösung	5ml H ₂ O ₂ (30%) in 45ml Methanol (-20°C)	C. Roth, Karlsruhe Sigma, St. Louis, USA
Neo-Clear	gebrauchsfertig	Merck, Darmstadt
PBS-Puffer	2 Tabletten in 1l Aqua dest. (0,02M)	Gibco, Waltham, USA
Xylol	gebrauchsfertig	C. Roth, Karlsruhe

2.1.5 Antikörper für die Immunhistochemie

Für die Immunmarkierung wurden mono- und polyklonale Primärantikörper eingesetzt (Tab. 3).

Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Nachweise

Protein	Firma	Artikel-nummer	Klonalität	Spezies	Lagerung	Verdünnung	DAB-Zeit
SEMG2	Novus	HPA-042835	polyklonal	Kaninchen	-20°C	1:1000	25 s
CNN1	Millipore	04-589	polyklonal	Kaninchen	+4°C	1:200	30 s
Claudin-3	Invitrogen	34-1700	polyklonal	Kaninchen	-20°C	1:100	60 s
CD 10	DAKO	M7308	monoklonal	Maus	+4°C	1:100	2 min
Anti-Maus/ Kaninchen EnVision+ HRP	DAKO	K4001/3	IgG	Ziege	+4°C	gebrauchsfertig	-

HRP = Meerrettichperoxidase, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, s = Sekunden, min = Minuten.

2.1.6 ELISA Kit für die SEMG2 Bestimmung

Zur Bestimmung der SEMG2-Konzentration in humanen, endozervikalen Mukusproben sowie einer humanen Serumprobe kam der *Human SEMG2 ELISA Kit* der Firma MyBiosource (San Diego, USA) gemäß der Bandbreite und weiteren Angaben des Herstellers zum Einsatz.

2.1.7 Geräte und weitere Materialien

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte, Softwareprogramme sowie weitere Materialien aufgeführt.

Tabelle 4: Laborgeräte, Softwareprogramme und weitere Materialien

Gerät	Hersteller
Aqua dest. Anlage Elix 3	Merck Millipore, Darmstadt
Dako-Pen S 2002	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen
Eismaschine Flake line	Wessamat, Kaiserslautern
ELISA-Plattenreader Tecan infinite M200	TECAN, Crailsheim
Feuchte Kammern	
Glasküvetten nach Hellendahl	C. Roth, Karlsruhe
Gourmetgarer MultiGourmet plus FS20R	Braun, Kronberg im Taunus
Inkubatoren:	
Hera Therm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kendro UT12 Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	C. Roth, Karlsruhe
Mikroskope:	
Dialux 20	Leitz, Wetzlar
DM 2000 LED mit Kamera MC 170 HD	Leica Biosystem, Wetzlar
Laborlux S	Leica, Wetzlar
Magnetheizrührer RH digital KT	IKA, Staufen im Breisgau
Objektträger SuperFrost Plus	Langenbrinck, Emmendingen

Material und Methoden

Paraffineinbettungsautomat TP1050	Leica Biosystems, Wetzlar
pH-Meter CG 841	Schott, Mainz
Software:	
Adobe Reader	Adobe, San José, USA
GraphPad Prism X	GraphPad Software, La Jolla, USA
Leica Application Suite 4.9.0	Leica Microsystems, Wetzlar
Microsoft 365	Microsoft, Redmond, USA
Pipetten:	
Research Plus (1-Kanal)	Eppendorf, Hamburg
Transferpipette-8 (8-Kanal)	Brand, Wertheim
Finnpipette (8-Kanal)	ThermoScientific, Waltham, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rotationsmikrotom mit Wasserbad	Leica Biosystems, Wetzlar
Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttler VIBRAX-VXR	IKA, Staufen im Breisgau
Timer	TFA Dostmann, Wertheim
Vortexmischer Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage 1219 MP	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
Rotanta/RPC	Hettich, Tuttlingen
Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung der Paraffinschnitte für die Immunhistochemie

Die uterinen Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme im Operationssaal in Bouin'sche Lösung überführt, einem Fixiergemisch aus Pikrinsäure, Formaldehyd und Eisessig. Durch Bewegung auf einem Rollenapparat wurde eine gleichmäßige Gewebepenetration mit dem Fixiermittel sichergestellt. Die Fixierzeit betrug 48 Stunden, danach wurde die Bouin'sche Lösung in Ethanol (70 Vol.-%) ausgespült. Dieser Vorgang wurde dreimal an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt bis keine gelben, pikrinsäurehaltigen Schlieren mehr sichtbar waren. Die Paraffineinbettung erfolgte in einem Einkammer-Einbettautomaten des veterinäranatomischen Instituts der JLU Gießen. Dafür wurden die Proben in beschriftete Einbettkassetten gelegt. Das Einbettprotokoll ist in Tabelle 5 aufgelistet. Die Gewebeteilstücke für die Pathologie wurden in Formalin fixiert.

Tabelle 5: Protokoll des Einkammer-Einbettautomaten unter Vakuum

Arbeitsschritt	Medium	Anzahl	Zeit	Temperatur
Dehydrierung	80% Ethanol	1x	2 h	RT
	96% Ethanol	1x	2 h	RT
	100% Ethanol	3x	3 h	RT
Klärung	100% Xylol	1x	1 h	RT
	100% Xylol	2x	45 min	RT
Infiltration	Paraffin	3x	40 min	59°C

RT = Raumtemperatur

Zunächst wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, um es an das hydrophobe Einbettmedium Paraffin anzupassen. Danach wurde eine Klärung mit dem Intermedium Xylol durchgeführt, welches Ethanol-Reste aus dem Gewebe verdrängte und als Lösungsmittel für Paraffin fungierte. Zuletzt erfolgte die Gewebeeinfiltration mit flüssigem Paraffin. Anschließend wurden die Deckel der Einbettkassetten verworfen und die eingebetteten Gewebeproben in Ausgießformen platziert. Die ausgegossenen Paraffinblöcke wurden auf einer Kühlplatte rasch ausgehärtet. Für eine bessere Schneidbarkeit wurden sie für 24 Stunden im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Mithilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 5µm dünne Serienschnitte aus dem Paraffinblock angefertigt. Dabei diente der Kassettenboden jeweils als Blockhalterung. Die Schnitte wurden dann in einem auf 45°C temperierten Aqua dest.-Wasserbad geglättet, auf speziell beschichtete Adhäsionsobjektträger aufgezogen, in einem Wärmeschrank bei 37°C für weitere 24 Stunden angetrocknet und für die Immunhistochemie archiviert.

2.2.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) macht den Nachweis von Proteinen wie SEMG2 und CNN1 in Gewebeproben möglich. Das Verfahren basiert auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen, die anschließend mithilfe eines Detektionssystems visualisiert werden. Auf der Moleküloberfläche des gesuchten Antigens beziehungsweise Proteins befinden sich bestimmte Aminosäure-Sequenzen, die auch als antigene Determinanten oder Epitope bezeichnet werden. An diese binden strukturkomplementäre Antikörper hochaffin im Sinne eines Schlüssel-Schloss-Prinzips. Der entstandene Immunkomplex wird auf direkte oder indirekte Weise sichtbar gemacht. Meistens werden hierfür enzymgekoppelte Antikörper eingesetzt. Die Enzyme setzen ein farbloses Chromogen zu einem Farbstoff um und markieren somit den Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei der direkten Methode ist das Enzym an den Primärantikörper konjugiert, der direkt

an das Epitop gebunden ist. Im Gegensatz dazu erfolgt der Proteinnachweis bei der indirekten Methode über einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper, der gegen das F_c-Fragment des antigengebundenen Primärantikörpers gerichtet ist. Dies erhöht die Sensitivität des Verfahrens, weil mehrere markierte Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können. Amplifikationssysteme ermöglichen eine weitere Steigerung der Signalintensität, indem sie die Enzymdichte vor Ort weiter erhöhen. In dieser Arbeit wurde das polymerbasierte EnVision+™ System der Firma Dako eingesetzt. Bei diesem sind die Sekundärantikörper und eine große Anzahl von Meerrettichperoxidase-Enzymen (HRP) an Dextran-Polymergerüste konjugiert, wodurch die Amplifikation verursacht wird (Abb. 7).

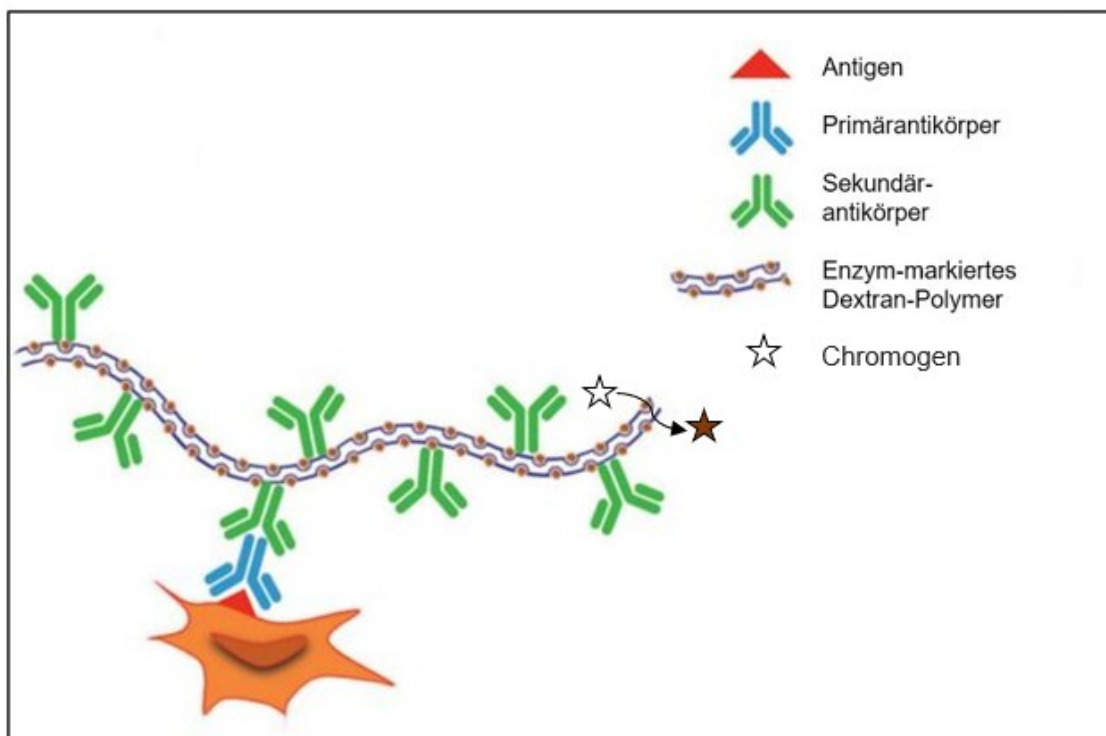


Abbildung 7: Polymerbasiertes EnVision+ Detektionssystem. Die Zweischríttmethode ermöglicht eine indirekte Immunmarkierung. Gewebegebundene Primärantikörper werden von HRP-markierten Dextran-Polymeren mit konjugierten Sekundärantikörpern lokalisiert. Modifiziert nach Streckfus (2020) [107].

Vor jeder immunhistochemischen Untersuchung erfolgt eine Gewebepreparation. Die eingebetteten Gewebeschnitte müssen entparaffiniert und rehydriert werden. Dadurch wird das Gewebe für die Immunmarkierung zugänglich gemacht und an die wässrigen Reagenzien der Folgeschritte angepasst. Fixierbedingte Veränderungen der nativen Proteinkonformation im Gewebe erschweren die Bindung des Primärantikörpers an das gesuchte Epitop. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das standardisierte Hitze-induzierte Verfahren HIER zur Freilegung der Epitope angewendet. Die

Hintergrundfärbung wird durch Waschschritte und das Abdecken hydrophober Gewebebereiche minimiert. Diese sind für unspezifische Bindungen prädestiniert. Auch die Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität ist für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis essenziell. Somit oxidieren nur die zugesetzten HRP-Enzyme das farblose 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu einem braunen, Xylol- und wasserunlöslichen Endprodukt. Die optimale Färbezeit wird für jeden Antikörper bestimmt. Anschließend wird mit Hämatoxylin gegengefärbt, um auch die übrigen nicht-immungefärbten Strukturen darzustellen und einen Gewebekontrast zu erzeugen. Dies führt insgesamt zu einer besseren Beurteilbarkeit der Proteinexpression im Gewebe.

Protokoll der SEMG2- und CNN1-Immunhistochemie

Detaillierte Angaben zu den einzelnen Schritten der indirekten Immunmarkierung sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von uterinen Gewebeschnitten

Arbeitsschritte	
Fixierung	Bouin'sche-Lösung
Einbettung	Paraffin-Einbettautomat
Schnitt-Anfertigung	Rotationsmikrotom mit Wasserbad, Adhäsionsobjektträger
Entparaffinierung	Neo-Clear: 1 x 20 min bei 40°C, 2 x 20 min bei Raumtemperatur
Rehydrierung	absteigende Alkoholreihe: je 2 x 5 min in 100%-, 96%-, 70%-Ethanol Aqua dest.: 1 x 5 min unter Schütteln
Antigen-Demaskierung	Elektrischer Dampfgerar mit Citratpuffer (pH 6): 20 min Erhitzen bei 100°C, 20 min Abkühlen PBS-Puffer (0,02 M): 3 x 5 min unter Schütteln
Block endogener Peroxidasen	3%- H_2O_2 /Methanol-Lösung: 1 x 30 min unter Schütteln PBS-Puffer (0,02 M): 3 x 5 min unter Schütteln
Block unspezifischer Bindungen	BSA/Triton-Puffer: 1 x 20 min unter Schütteln
Inkubation mit Primärantikörper	100 µl pro Gewebeschnitt in optimaler Verdünnung über Nacht bei 4°C in Feuchtkammer, dann Abkippen auf Zellstoff
Waschen	PBS-Puffer (0,02 M): 3 x 5 min unter Schütteln
Inkubation mit Sekundärantikörper	3 Tropfen pro Gewebeschnitt für 30 min bei Raumtemperatur in Feuchtkammer, dann Abkippen auf Zellstoff
Waschen	PBS-Puffer (0,02 M): 3 x 5 min unter Schütteln
Substratreaktion und Stopp	DAB-Lösung: 3 Tropfen pro Gewebeschnitt (für die Antikörper-adaptierte Färbezeit) Aqua dest.: 3 x 5 min unter Schütteln

Material und Methoden

Gegenfärben	Hämatoxylin nach Mayer: 3 Tropfen pro Gewebeschnitt für 5 min unter fließendem Leitungswasser: Bläuen für 10 min
Dehydrierung	aufsteigende Alkoholreihe: je 2 x 2 min in 70%-, 96%-, 100%-Ethanol Xylol: 2 x 2 min
Eindecken	Eukitt, Deckgläser

Aqua dest. = destilliertes Wasser, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, H₂O₂ = Wasserstoffperoxid, BSA = Bovines Serumalbumin, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin.

Aus dem Gewebearchiv entnommene uterine Gewebeschnitte (2.2.1) wurden mit Histoclear entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe und mit destilliertem Wasser rehydriert. Zur Freilegung der Epitope wurde Citratpuffer (pH 6,0) angesetzt und im Dampfgarer vorgewärmt. Die entparaffinierten Schnitte wurden in die heiße Pufferlösung gestellt, in dieser erhitzt und abgekühlt. Nach der Hitze-induzierten Antigen-Demaskierung wurden sie auf einem Schüttler in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Vor der Immunmarkierung folgten zwei Blockierungsschritte, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Ein Wasserstoffperoxid/Methanol-Gemisch blockierte endogene Peroxidasen. Dies ermöglichte im weiteren Verlauf die Verwendung von Meerrettichperoxidase (HRP) zur Detektion. Nach erneutem Waschen der Präparate wurde Rinderserumalbumin-Puffer (BSA) mit einem Detergens-Zusatz hinzugegeben, zur Reduktion unspezifischer Bindungen und der Oberflächenspannung. Die BSA/Triton-benetzten Gewebeschnitte wurden mit einem hydrophoben Stift umrandet. Der optimal verdünnte Primärantikörper wurde hinzugegeben, ohne vom Gewebe abzulaufen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Im Rahmen von Vorversuchen wurden die bestmöglichen Färbezeiten für die jeweiligen Primärantikörper ermittelt (Tab. 3). Nach durchlaufener Inkubationszeit wurde der Primärantikörper auf Zellstoff abgeklopft und überschüssige Reste durch Waschen entfernt. Zur Detektion der Immunmarkierung kam das hochsensitive EnVison+ (DAKO)-System zum Einsatz (Abb. 7). Die Schnitte wurden mit diesen Konjugaten für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Der Überschuss wurde in gleicher Weise durch Abschütten und Waschen entfernt. Danach wurde frisch angesetzte Reaktionslösung auf die Proben getropft. Die Lösung enthielt das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Substratpuffer mit Peroxid, das durch die HRP zu einem sichtbar braunen Niederschlag umgesetzt wird. Die Reaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt und die Schnitte mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Sie wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol getaucht und mit Eukitt eingedeckt. Zum Ausschluss falsch-positiver Farbsignale wurden Negativkontrollen mit *Antikörper-Diluent* anstelle der Antikörper durchgeführt. Die immungefärbten Gewebeproben wurden unter dem Mikroskop mäanderförmig

durchgemustert. Das Proteinexpressionsmuster wurde mit einer hochauflösenden Mikroskopkamera fotografiert und für einzelne Gewebebereiche digital dokumentiert. Bei den SEMG2-Proben wurde zusätzlich der HSCORE für alle erfassten Drüsenanschnitte vergeben.

Quantifizierung der immunhistochemischen SEMG2-Färbung

Die immungefärbten Gewebeproben wurden mit dem HSCORE bewertet. Mit dem Score wurde die glanduläre Farbintensität in den Gewebeproben quantifiziert. Er wurde anhand der Formel $HSCORE = (0 \times \%GL_0) + (1 \times \%GL_1) + (2 \times \%GL_2) + (3 \times \%GL_3)$ für jede Probe berechnet und rangierte zwischen 0 bis 300. Jedem Drüsenanschnitt (GL) wurde ein Intensitätswert (0 – 3) zugeordnet. Der Wert 0 entsprach keiner, 1 einer schwachen, 2 einer mäßigen und 3 einer starken Färbung. Die prozentualen Anteile der nach Intensitätsstufen gruppierten Drüsenanschnitte ($\%GL_0 - 3$) an der Drüsengesamtzahl wurden ermittelt. Dazu mussten alle Drüsen eines Gewebeschnitts ausgezählt werden. Die Prozentsätze wurden mit dem zugehörigen Intensitätswert multipliziert und anschließend zum Score summiert.

2.2.3 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay

Der *Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) ermöglicht den quantitativen Nachweis von Proteinen in Körperflüssigkeiten. Das Verfahren basiert auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen, die wie bei der Immunhistochemie (2.2.2) mit einem Detektionssystem sichtbar gemacht werden. Mithilfe des ELISAs wird die Konzentration des gesuchten Antigens in Probenflüssigkeiten ermittelt, während die Immunhistochemie in Gewebeproben für semiquantitative Expressionsanalysen eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA in Kombination mit dem *Labeled-Avidin-Biotin-System* (LAB) zur Signalamplifikation eingesetzt (Abb. 8).

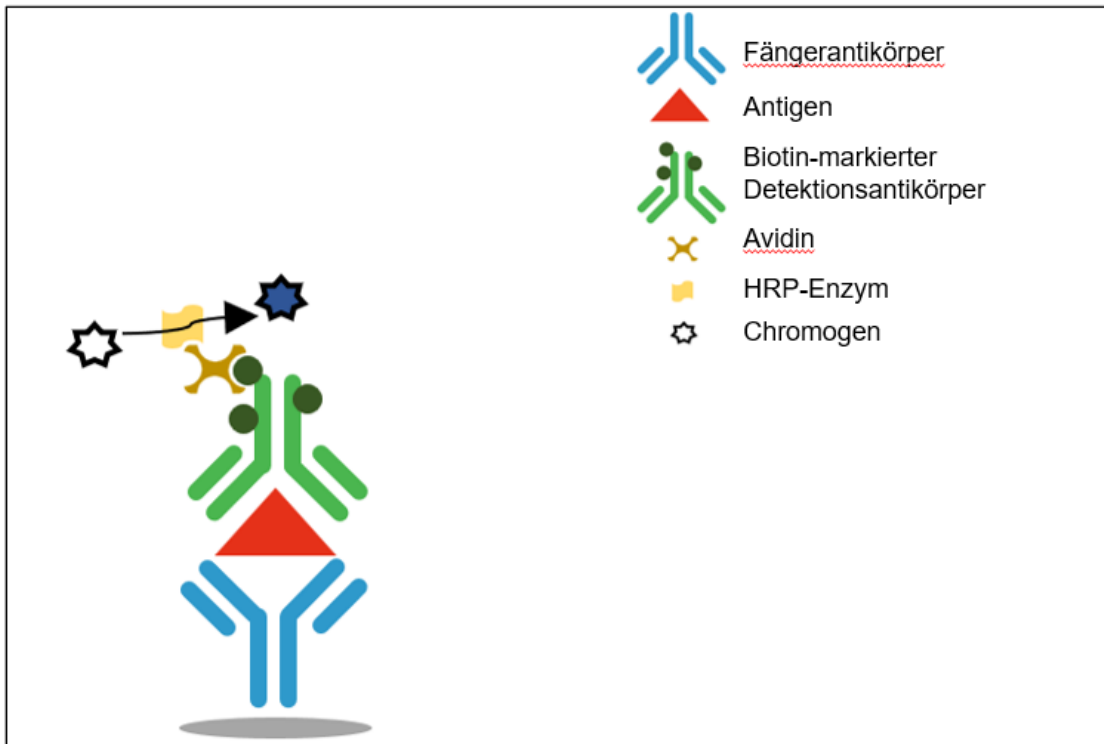


Abbildung 8: Sandwich-ELISA mit LAB-Detektionssystem. An die ELISA-Platte adsorbierte Fängerantikörper immobilisieren das gesuchte Antigen zur Visualisierung mit biotinyliertem Detektionsantikörper und HRP-Avidin.

Bei der Sandwich-Methode wird das nachzuweisende Protein zwischen einem primären Fänger- und sekundären Detektionsantikörper immobilisiert. Zunächst werden die Fängerantikörper an die ELISA-Mikrotiterplatte adsorbiert. Diese hat im Allgemeinen eine hohe Protein-Bindungskapazität, weshalb freie, nicht Antikörper-besetzte Bereiche mit einem Blockpuffer, beispielsweise BSA, abgedeckt werden. Durch das Abdecken unspezifischer Bindungsstellen wird die Hintergrundfärbung minimiert. Danach werden die Plattenvertiefungen mit den Standards und Proben inkubiert und das Ziel-Protein bindet an den Fängerantikörper. Während in den Standards normierte Mengen des Proteins enthalten sind, ist seine Konzentration in den Probengemischen unbekannt. Anschließend binden Detektionsantikörper durch Fängerantikörper immobilisierte Proteine über ein anderes, zweites Epitop. Die Bindungsstellen für den primären und sekundären Antikörper müssen ausreichend weit voneinander entfernt sein, damit die Immunreaktion nicht durch sterische Behinderung beeinträchtigt wird. Das LAB-System basiert auf der hohen Bindungsaffinität zwischen Avidin und Biotin. Dabei werden anstelle von direkt enzymmarkierten, biotinylierte Detektionsantikörper eingesetzt. Bis zu zehn kleine Biotin-Moleküle können pro Antikörper konjugiert und in einem zusätzlichen Schritt von Avidin-gekoppelten Markerenzymen gebunden werden. Durch Erhöhung der Markerdichte steigt die Signalintensität und die Sensitivität des ELISAs wird vervielfacht. Bis zur Zugabe des Enzymsubstrats werden nach jedem

Inkubationsschritt Waschschritte durchgeführt, um ungebundene Bestandteile aus den einzelnen Vertiefungen zu entfernen. Oft wird HRP als Enzym eingesetzt, welches Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem kolorimetrisch detektierbaren Reaktionsprodukt umsetzt. Auf der ELISA-Platte ist eine abgestufte Blau- und dann Gelbfärbung sichtbar. Der Farbumschlag entsteht durch Beendigung der Reaktion mit einer Stopplösung. Der Substratumsatz korreliert mit der Konzentration des nachzuweisenden Proteins in der Probe. Je mehr Protein vorhanden ist, desto höher die photometrisch mit einem ELISA-Reader messbare Farbintensität in der jeweiligen Vertiefung. Über eine Regressionsgleichung, gebildet aus den Messwerten zu den bekannten Konzentrationen in den Standards, wird schließlich die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt.

Protokoll des SEMG2-ELISAs

Zur Bestimmung des SEMG2-Gehalts in humanen, endozervikalen Mukusproben sowie in einer humanen Serumprobe wurden ELISA-Kits der Firma MyBiosource eingesetzt. Die Nachweisgrenze war bei $<7,81$ pg/ml festgelegt und eine Unterschreitung wird als nicht mehr signifikante Abweichung vom Nullsignal gewertet. Alle Arbeitsschritte wurden entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Mehrere Reagenzien mussten bei Raumtemperatur vorbereitet werden. Biotin-Antikörper und HRP-Avidin wurden mit den zugehörigen Verdünnungslösungen jeweils 100-fach verdünnt. Beim Waschpufferkonzentrat wurde eine 25-fache Verdünnung mit Aqua dest. vorgenommen. Aus dem gefriergetrockneten und zentrifugierten Standard wurde eine zweifache Verdünnungsreihe ab 2000 pg/ml angesetzt. Bei jedem Inkubationsschritt wurde die ELISA-Platte mit einem Klebestreifen abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die mit Fängerantikörper vorbeschichteten ELISA-Platten wurden direkt mit jeweils 100 µl Proben und Standards pro Vertiefung für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgekippt und gegen Papiertücher ausgeschlagen. Je 100 µl Biotin-Antikörper wurden pro Vertiefung für eine Stunde bei 37°C zugegeben. Der biotinylierte Antikörper wurde nach Ablauf der Inkubationszeit aspiriert und verworfen. Flüssigkeitsreste wurden durch Ausschlagen entfernt. Danach wurden vier Waschschritte mit einer Multikanalpipette durchgeführt. Bei jedem Waschen verblieben je 200 µl Waschpuffer für 2min in den Vertiefungen, bis zum Pufferwechsel mit Abkippen und Ausschlagen. Anschließend wurde mit je 200 µl HRP-Avidin für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, dann erneut aspiriert. Es folgten fünf Waschschritte, wie oben beschrieben. Das TMB-Substrat wurde mit 90 µl pro Vertiefung hinzugefügt. Nach 32min unter Lichtausschluss war eine ausgeprägte Farbabstufung sichtbar und es wurden jeweils 50 µl Stopplösung dazugegeben. Dies ging mit einem Farbumschlag von blau nach gelb einher. Gelegentlich wurde eine Grünfärbung in einzelnen Vertiefungen beobachtet,

entsprechend einer unzureichenden Durchmischung. Dies wurde durch behutsames Anstoßen der Platte behoben. Abschließend erfolgte deren photometrische Bestimmung mit einem ELISA-Reader bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm. Das Nullstandard-Signal wurde von allen Messergebnissen subtrahiert. Die bekannten Standardkonzentrationen wurden mit den korrespondierenden Messwerten graphisch aufgetragen. Durch diese Datenpunkte wurde die bestmögliche Ausgleichsgerade gelegt. Aus der sich daraus ergebenden Regressionsgleichung konnten die SEMG2 Proteinkonzentrationen in den Proben ermittelt werden.

2.2.4 Endometriumdatierung

Die Endometriumdatierung ermöglicht die zyklusphasen-gerechte Zuordnung uteriner Gewebeproben bei Frauen im reproduktiven Alter. Früh-, mitt- und spätsekretorische Phasenabschnitte lassen sich voneinander abgrenzen. Dadurch wird das Expressionsprofil endometrialer Proteine im Zyklusverlauf und in Bezug auf das Implantationszeitfenster beurteilbar. Die Methode basiert auf den von Noyes, Hertig und Rock festgelegten Datierungskriterien [106]. Lichtmikroskopisch werden histomorphologische Merkmale erfasst, die für die zeitliche Einordnung geeignet sind. Die am weitesten fortgeschrittene Veränderung in der Funktionalis ist ausschlaggebend für die Probenzuordnung. Dagegen kommen die Basalis und das untere Uterussegment für die Datierung nicht in Frage. Beide Gewebeabschnitte sind weniger hormonsensitiv, sodass zyklische Veränderungen kaum oder zeitverzögert stattfinden. Proben mit zumindest stellenweise erhaltenem, luminalen Epithel sind zuverlässig datierbar. Anhand dieser Gewebekomponente wird zwischen Funktionalis und Basalis unterschieden. Eine Datierung von Basalis-Fragmenten, bei Schwangerschaft, Atrophie sowie bei Gewebeanomalien wie Hyperplasie und Endometriumkarzinom ist nicht möglich. Das Verfahren ist nicht vollständig reproduzierbar und für eine tagesgenaue Diagnostik meist zu unpräzise. Die Gewebedatierung sollte in Kombination mit klinischen Informationen bewertet werden. Hilfreich sind anamnestische Angaben zum Menstruationszyklus oder Hormonstatus zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Verlässliche Datierungskriterien für die Proliferationsphase sind Mitosen und Pseudostratifikation. Hier wird das Endometrium über einen variablen Zeitraum von 0,5mm auf bis zu 5mm aufgebaut. Im Rahmen des Dickenwachstums werden zahlreiche Mitosefiguren in den Epithel- und Stromazellen beobachtet. Das Drüsenepithel proliferiert schneller als das Stroma, sodass die initial geradlinigen Drüsen einen geschlängelten Verlauf nehmen. Die Drüsenmorphologie verändert sich aber zu allmählich, um als Datierungskriterium in Frage zu kommen. Ein geeigneteres Merkmal für die erste Zyklushälfte ist das pseudostratifizierte Drüsenepithel. Die

Pseudostratifizierung kommt durch zueinander versetzt positionierte Zellkerne zustande, wodurch das einreihige Epithel mehrreihig erscheint. Die Sekretionsphase ist genauer datierbar als die Proliferationsphase, da größere histomorphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Phasenabschnitten bestehen. Frühsekreterisch liegt der Fokus auf glandulären Merkmalen. In der mittleren und späten Sekretionsphase sind wiederum Veränderungen im Stroma für die zeitliche Einordnung entscheidend. Nach der Ovulation bleibt die Gewebemorphologie für bis zu 48 Stunden nahezu unverändert. Die sekretorische Umwandlung des Endometriums setzt zeitverzögert ein. Ein sicheres Ovulationszeichen liegt erst vor, wenn die sogenannte 50%-Regel erfüllt ist. Sie besagt, dass in mindestens 50% der angeschnittenen Drüsen sowie in 50% der zugehörigen glandulären Epithelzellen Glykogenvakuolen vorkommen. Im Zuge der voranschreitenden Vakuolisierung geht die Pseudostratifizierung verloren, mit Zellkernen, die palisadenförmig in einer Ebene aufgereiht sind. Diese Konstellation ist typisch für die frühe Sekretionsphase und wird auch als Klaviertastatur-Phänomen beschrieben, weil die basalen Glykogenvakuolen an weiße und die darüberliegenden Zellkerne an schwarze Tasten erinnern. Im weiteren Verlauf verändert sich die Position der Vakuolen im epithelialen Zytoplasma von basal, an den Zellkernen vorbei, nach luminal. Die mittlere Sekretionsphase wird vor allem anhand des interstitiellen Gewebeödems identifiziert, welches die Stromazellen auseinanderdrängt. Da deren spindelförmigen Zellausläufer nur schwer abgrenzbar sind, entsteht der Eindruck alleinstehender, nackter Zellkerne. In der späten Sekretionsphase ist die Prädezidualisierung als Datierungskriterium geeignet. Sie beginnt in der Nähe der Spiralarterien, die durch die umgebenden, kugelig transformierten Stromazellen in Form von Prädeziduamanschetten prägnanter zur Darstellung kommen. Spätsekreterische Drüsen liegen in Sägeblatt-Konformation vor, mit eingefaltetem, luminal zerklüftetem Drüsenepithel als Ausdruck der stattgehabten Sekretion. Diese Drüsenform kann bereits mittsekreterisch auftreten, sodass sie alleingegenommen nicht ausreichend trennscharf ist.

Protokoll der Probendatierung

Bei Proben für die SEMG2-Immunhistochemie wurde die Datierung durch einen verblindeten Untersucher der Laborarbeitsgruppe verifiziert. Anamnestische Angaben zum Menstruationszyklus wurden bei der zeitlichen Einordnung berücksichtigt. In der Regel war eine Unterscheidung zwischen früh-, mitt- und spätsekreterischen Phasenabschnitten möglich. Dadurch konnte das Expressionsprofil des Proteins im sekretorischen Phasenverlauf untersucht werden. Nicht alle archivierten Schnitte enthielten lumbinales Epithel. In diesen Fällen war es nicht möglich, die Datierung genau zu überprüfen oder weiter einzugrenzen.

2.3 Statistik

Die statistischen Tests wurden mit der Software *GraphPad Prism* (Version 9.4.1, www.graphpad.com) durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler, Median (Interquartilsabstand) und mit Spannweite angegeben. Ergebnisse mit einem p-Wert ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant bewertet. Alle Werte wurden vorab mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Mehr als zwei Gruppen mit normalverteilten Daten wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Bei signifikanten Unterschieden wurde der Folgetest nach Tukey angewendet. Bei zwei Gruppen mit nicht-normalverteilten, numerischen Werte wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U- und bei mehr als zwei Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Bei kategorialen Daten wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Die diagnostische Eignung von SEMG2 im Zervixschleim als Fertilitätsmarker wurde mithilfe einer ROC-Kurvenanalyse geprüft. Für alle möglichen Schwellenwerte wurden die Sensitivitäts- und Spezifitätswerte ermittelt. Anhand des Youden-Index ($J = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$) wurde der optimale Schwellenwert mit der dazugehörigen ROC-Kurve bestimmt. Die Fläche unter der ROC-Kurve wurde als Maß für die Trennschärfe des Diagnosetests untersucht. Aus einer Kontingenztafel wurden die positive Likelihood-Ratio, positiver und negativer prädiktiver Wert, diagnostisches Odds Ratio sowie relatives Risiko als weitere Gütekriterien abgeleitet.

3 Ergebnisse

3.1 Die SEMG2-Expression im luminalen Epithel

Die Immunfärbung im luminalen Epithel (LE) war zytoplasmatisch, mit Betonung des apikalen Zellpols (Abb. 9). Sie war stärker als im Stroma und vergleichbar zum glandulären Epithel (GE). Nahezu alle luminalen Epithelzellen waren SEMG2-positiv. Im Bereich der Drüsenausführungsgängen ging das GE ins LE über. Hier wurden unterschiedliche, zyklusphasen-typische Oberflächendifferenzierungen beobachtet. Mittproliferativ war das LE flach, oft waren Zilienzellen identifizierbar (Abb. 9A). Diese konnten vereinzelt oder in kleinen Gruppierungen zwischen nicht-zilientragenden Zellen auftreten und waren im Laufe der sekretorischen Phase nicht mehr sichtbar. Spätproliferativ wurden SEMG2-positive Vorwölbungen der apikalen Zellmembran beobachtet (Abb. 9 B). Früh- und mittsekretorische Vorwölbungen waren besonders zahlreich und wurden als Pinopoden identifiziert. In diesem Zeitabschnitt war auch das GE im oberen Abschnitt der Drüsenausführungsgänge vorgewölbt und es wurden SEMG2-positive, Vesikel-ähnliche Strukturen über dem LE und in den Ausführungsgängen identifiziert (Abb. 9 C, D). Spätsekretorisch hatte das LE wieder eine abgeflachtere Kontur (Abb. 9 E). SEMG2 war zu jedem Zyklusphasenabschnitt im LE nachweisbar, im sekretorischen LE wurde es stärker exprimiert (Abb. 9 C - E).

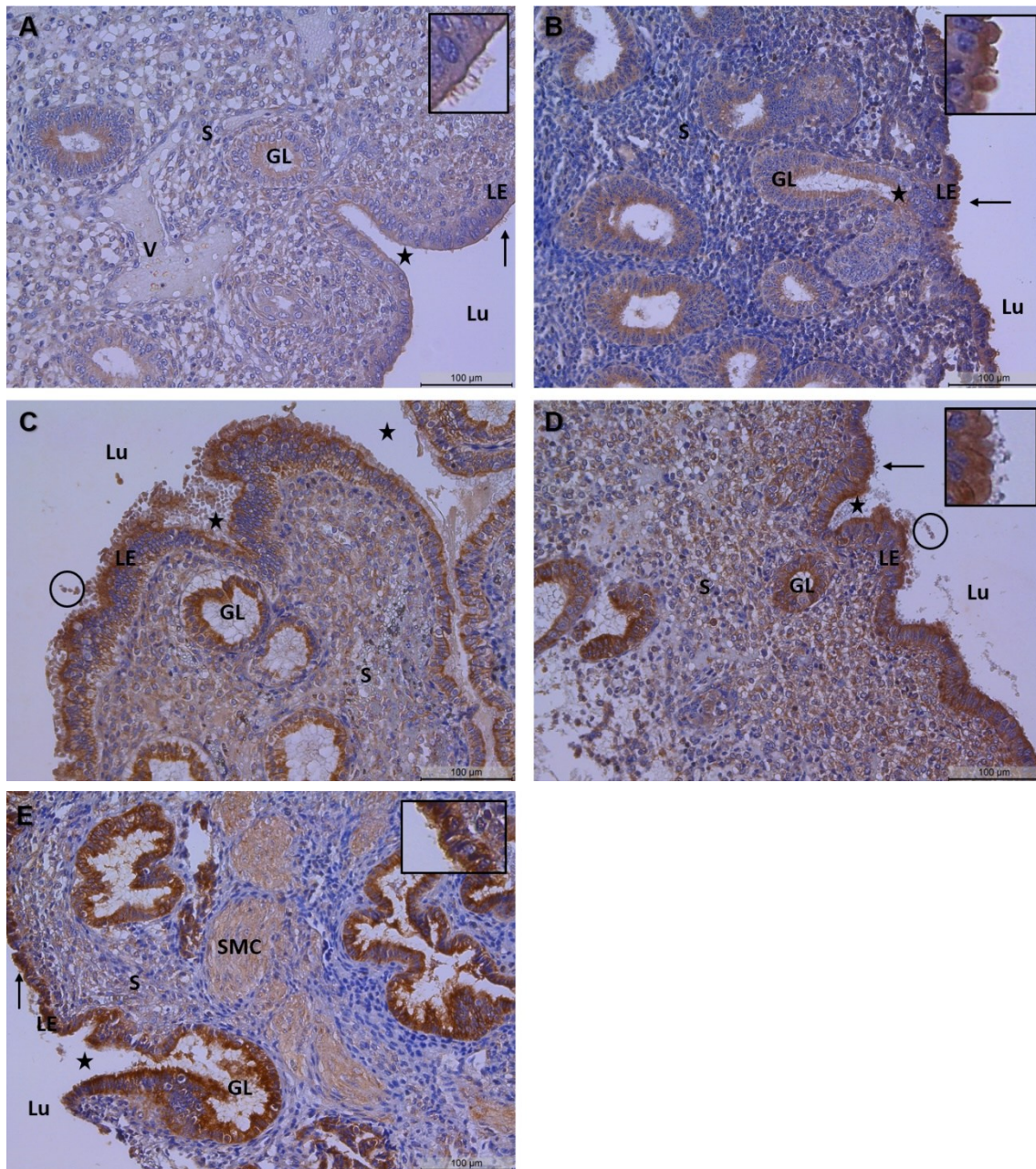


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von SEMG 2 im luminalen Epithel des mitt- (A) und spätproliferativen (B) sowie früh- (C), mitt- (D) und spätsekretorischen (E) Endometriums von Endometriose-negativen (B) und -positiven (A, C, D, E) Probandinnen. Die Pfeile zeigen an, welche Stelle des Epithels vergrößert (Insets) wurde. Inset A = Zilienzellen, Inset B und D = Pinopoden. Kreis = Vesikel-ähnliche Strukturen, LE = Luminale Epithel, Lu = Lumen, GL = Drüse (exemplarisch markiert), S = Stroma, Stern = Ausführungsgang, V = Venole, SMC = muskelartige Struktur im Stroma, Maßstabsleisten = 100 µm.

3.2 Die SEMG2-Expression im glandulären Epithel

Die SEMG2-Immunfärbung im Zytoplasma des GE war homogen und kräftiger als in den Stromazellen. Sie war in den Drüsen des Stratum basale (Basalis) und Stratum functionale (Funktionalis) derselben Gewebeprobe vergleichbar und in der zweiten Zyklushälfte intensiver (Abb. 10). Charakteristisch für die Basalis-Drüsen der proliferativen und sekretorischen Zyklushälfte war ein Verlauf entlang des angrenzenden, in der Regel SEMG2-positiven Myometriums (Abb. 10 A, C). Im Gegensatz dazu waren die Drüsen der Funktionalis zur Schleimhautoberfläche in Richtung des rechten Teilabbildungsrandes orientiert (Abb. 10 B, D). SEMG2-positive Sekretionsprodukte wurden in den Drüsenlumina der Basalis und Funktionalis in beiden Zyklushälften identifiziert.

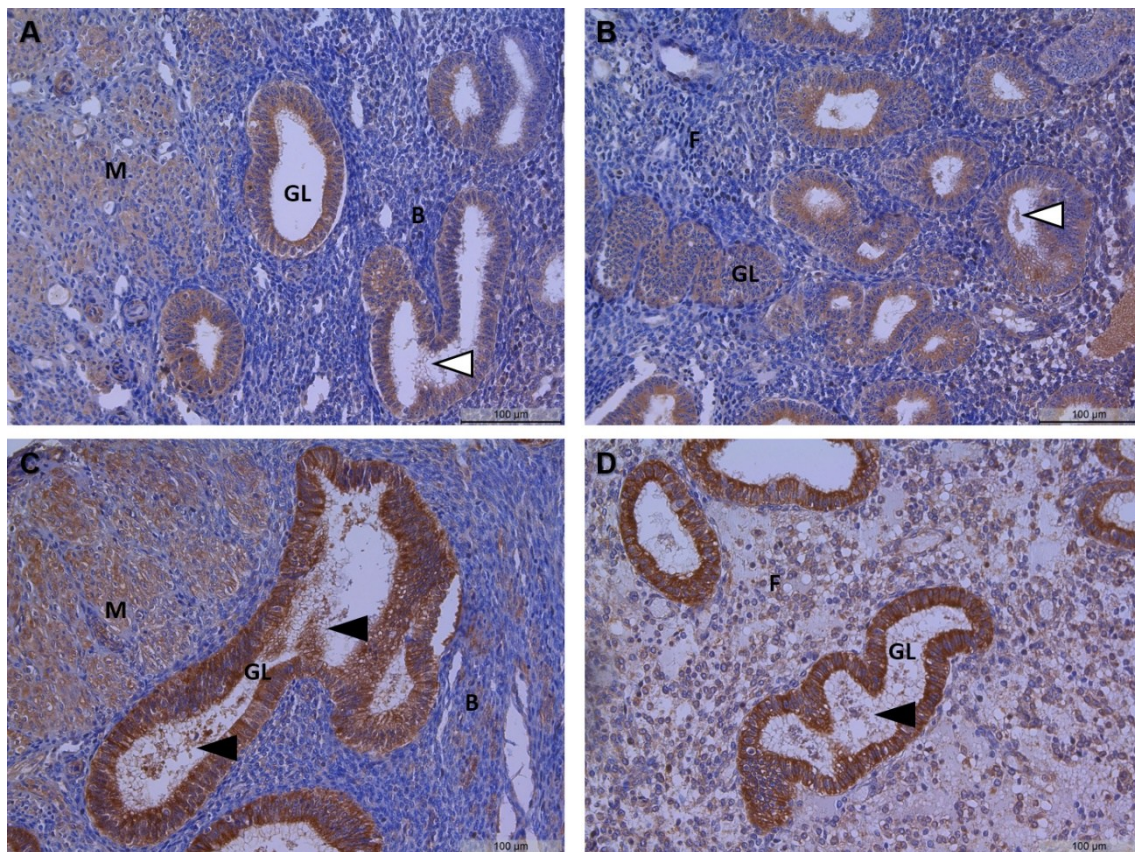


Abbildung 10: Repräsentative Mikrofotografien der Basalis (B) und Funktionalis (F) einer Endometriose-negativen Probandin in der Proliferationsphase (A, B) und einer Endometriose-positiven Probandin in der Sekretionsphase (C, D). GL = Drüse, M = Myometrium, Pfeilspitzen = Sekretion in beiden Zyklushälften, Maßstabsleisten = 100 µm.

Die sekretorische Aktivität war früh- und mittsekreterisch am höchsten (Abb. 11). Viele Drüsenlumina waren mit SEMG2-positivem Sekret gefüllt. Vereinzelt war die Immunfärbung nicht homogen, sondern apikal in Richtung des Drüsenlumens betont (Abb. 11 A).

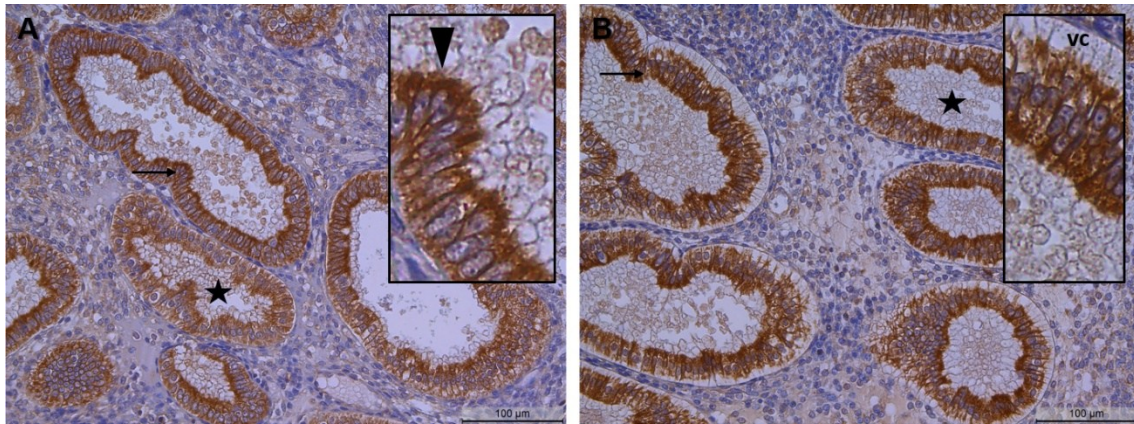


Abbildung 11: Funktionalis-Drüsen einer Endometriose-negativen (A) und Endometriose-positiven (B) Probandin in der frühen Sekretionsphase mit SEMG2-positiven Sekretionsprodukten (Sterne). Die Pfeile markieren den glandulären Epithel-Abschnitt, der vergrößert (Inset) wurde. Inset A = apikal betonte Immunfärbung (Pfeilspitze), Inset B = Glykogenvakuolen (vc), Maßstabsleisten = 100 µm.

Die Drüsenmorphologie veränderte sich im Zyklusverlauf (Abb. 12). Proliferative Drüsen waren i.d.R. schwächer immungefärbt (Abb. 12 A). Charakteristisch für frühsekretorisches, glanduläres Epithel waren SEMG2-negative Glykogenvakuolen mit Zellkernen in Reihe (Abb. 12 B). Die SEMG2-Immunfärbung war temporär nach lateral und apikal verdrängt. Die Vakuolen waren im Zytoplasma als ungefärbte Areale auf Zellkernhöhe, basal und apikal identifizierbar. Spätsekretorische Drüsen hatten eine sägeblattartige-Form mit stark aufgeweiteten Lumina und kräftiger Immunfärbung und unscharf begrenzten apikalen Zellrändern (Abb. 12 C). Insgesamt wurden 7571 Drüsenanschnitte ausgezählt; davon waren 7363 SEMG2-positiv (97,25%).

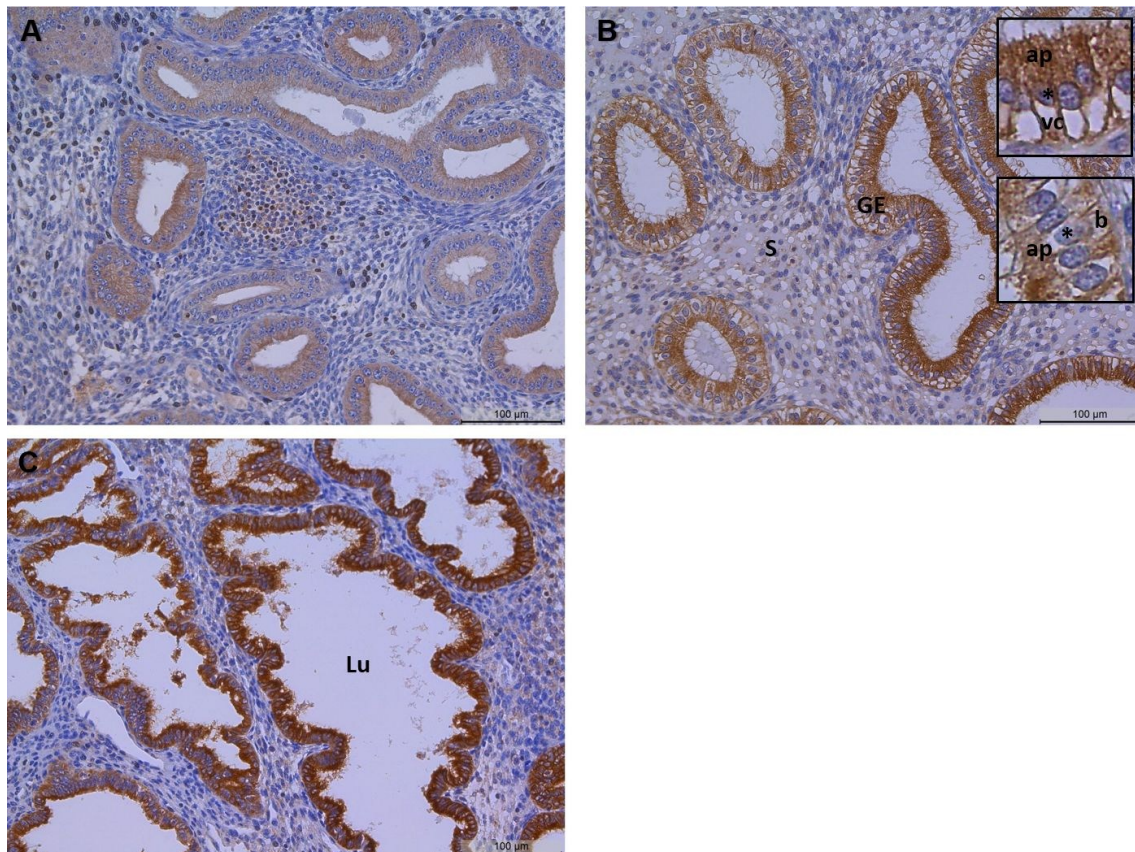


Abbildung 12: Repräsentative Mikrofotografien von SEMG2-positivem glandulären Epithel in proliferativem (A) sowie mitt- (B) und spätsekretorische (C) Endometrium von Probandinnen ohne (A) und mit (B, C) Endometriose. Inset B (oben) = basale Glykogenvakuolen, Inset B (unten) = Glykogenvakuolen auf Zellkernhöhe. ap = apikal, b = basal, GE = Glanduläres Epithel, Lu = Drüsenlumen, S = Stroma-Ödem, Stern = Zellkern, vc = Glykogenvakuolen, Maßstabsleisten = 100 µm.

3.3 Quantifizierung der SEMG2-Expression in den Drüsen

Die immunhistochemische Färbung in den Endometriumdrüsen wurde mithilfe des HSCOREs genauer beurteilt. Die datierbaren Proben wurden in vier Gruppen eingeteilt (Tab. 7A). Der ANOVA ergab, dass signifikante Unterschiede zwischen den glandulären HSCORE-Werten der einzelnen Gruppen existierten ($p < 0,0001$). Mithilfe des Tukey-Tests wurde gezeigt, wo diese Unterschiede lagen und wie stark diese ausgeprägt waren (Tab. 7B). Die größten HSCORE-Differenzen ergaben sich bei der Gegenüberstellung der sekretorischen, EM-positiven Gruppe (S/EM+; 261 ± 8) mit den proliferativen Proben von Frauen ohne (P/EM-; 189 ± 9) und mit EM (P/EM+; 167 ± 12). Bei Letzteren war die glanduläre SEMG2-Farbintensität im Vergleich um 38% (P/EM- vs. S/EM+) beziehungsweise 56% (P/EM+ vs. S/EM+) hochsignifikant reduziert ($p < 0,001$ und $p < 0,0001$). Eine 28 %ige, signifikant niedrigere Expression des Proteins im Drüsenepithel war auch bei der proliferativen, EM-positiven (P/EM+) gegenüber der sekretorischen,

Ergebnisse

EM-negativen Gruppe (S/EM-; 233 ± 18) feststellbar ($p = 0,0036$). Zwischen der anderen proliferativen (P/EM-) und ebendieser sekretorischen Gruppe (S/EM-) ergab sich ein Trend ($p = 0,0845$), der ebenfalls eine geringere Protein-Expression in den Endometriumsdrüsen der proliferativen Zyklushälfte anzeigte. Beim Vergleich von Proben aus derselben Zyklushälfte konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es spielte keine Rolle, ob sie von EM-positiven oder -negativen Probandinnen stammten. EM hatte im Vergleich zur Zyklusphase keinen nennenswerten Einfluss auf das SEMG2-Expressionsniveau im glandulären Epithel. SEMG2 wurde in der zweiten Zyklushälfte insgesamt vermehrt exprimiert.

Tabelle 7: Vergleich der SEMG2-Expression anhand des HSCOREs im glandulären Epithel von Probandinnen mit und ohne Endometriose in der Proliferations- und Sekretionsphase

(A)	P/EM-		P/EM+	S/EM-		S/EM+
n	9		10	6		7
HSCORE (GE)	189 ± 9		167 ± 12	233 ± 18		261 ± 8
	191 (165 – 213)		163 (150 – 187)	246 (195 – 266)		251 (245 – 289)
	148 – 233		104 – 239	154 – 279		240 – 290
(B)	P/EM-	P/EM-	P/EM-	P/EM+	P/EM+	S/EM-
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	P/EM+	S/EM-	S/EM+	S/EM-	S/EM+	S/EM+
p-Wert	0,4833	0,0845	0,001	0,0036	<0,0001	0,431

Der glanduläre HSCORE (GE) wurde als Mittelwert $\pm$ Standardfehler und Median (Interquartilsabstand) sowie mit der Spannweite angegeben. P/EM- = proliferativ, Endometriose-negative, P/EM+ = proliferativ, Endometriose-positive, S/EM- = sekretorisch, Endometriose-negative, S/EM+ = sekretorisch, Endometriose-positive Gruppe. Die Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) untersucht. Mithilfe des Folgetests nach Tukey wurde ermittelt bei welchen Gruppenpaaren signifikante Unterschiede beim Expressionsniveau vorlagen.

3.4 Die SEMG2-Expression im Stroma

SEMG2 wurde homogen im Zytoplasma von Stromazellen der Proliferations- und Sekretionsphase bei EM-positiven und -negativen Probandinnen exprimiert (Abb. 13). Die Übersichtsaufnahmen 13 A und B zeigen, dass der Marker vor allem im Lumen-nahen Funktionalis-Stroma exprimiert wurde. Die stromale Immunfärbung war i.d.R. schwächer als die epitheliale. Sie war in der zweiten Zyklushälfte markanter (Abb. 13 B).

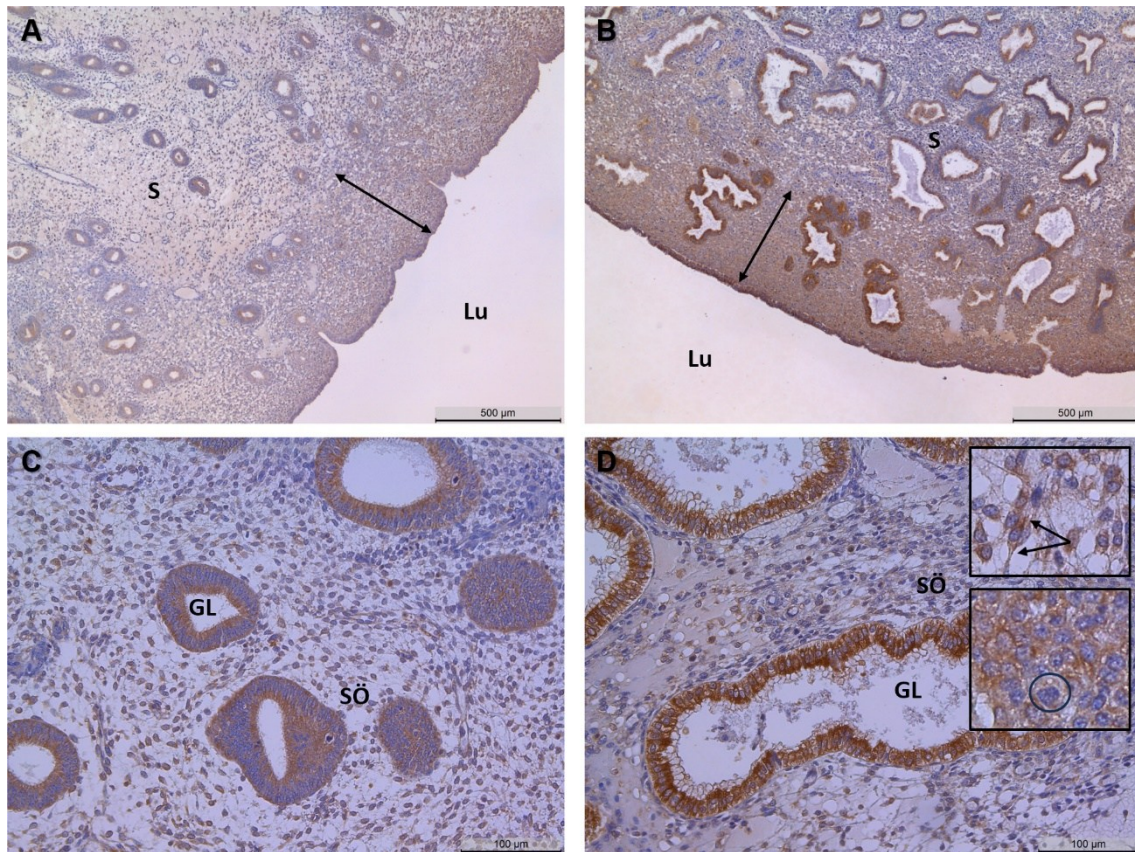


Abbildung 13: Nachweis von SEMG2 im endometrialen Stroma der mittleren Proliferations- (A, C) und Sekretionsphase (B, D) bei Patientinnen mit (A, C) und ohne (B, D) Endometriose. Inset D (oben) = spindelförmige Stroma-Zellausläufer (Pfeile), Inset D (unten) = Prädeziduazellen (Kreis). Doppelpfeil = Lumen-nahes Stroma, GL = Drüse, Lu = Lumen, S = Stroma, SÖ = Stromaödem, Maßstabsleisten = 500 µm (A, B), 100 µm (C, D).

Die Stromazellen der Funktionalis waren größtenteils SEMG2-positiv, während das basale Stroma meist SEMG2-negativ war (Abb. 10 A, B). Die mittlere Proliferations- und Sekretionsphase ging oft mit einem interstitiellen Stroma-Ödem einher, das die Stromazellen auseinander drängte (Abb. 13 C, D). Dadurch waren die spindelförmigen, SEMG2-positiven Zellausläufer gut erkennbar. Spätsekretorisch differenzierten Stromazellen zu Prädeziduazellen. Diese hatten eine rundliche Zellgestalt, aber ebenfalls ein SEMG2-positives Zytoplasma (Abb. 13 D).

3.5 Die SEMG2-Expression in Lymphozyten-Aggregaten

Die Lymphozyten-Aggregate im Endometrium von Probandinnen ohne und mit EM waren vom Aggregat-Zentrum bis zum Rand zytoplasmatisch SEMG2-positiv. In der basalen Schicht waren sie besonders deutlich erkennbar, da die SEMG2-positiven Lymphozyten einen Kontrast zum vorwiegend SEMG2-negativen Stroma bildeten (Abb. 14 A, B). Nebenbefundlich zeigten sich SEMG2-positive Endometrium-Gefäße. Der Marker kam in Spiralarterien und im Perizyten-Zytoplasma von Venolen und Kapillaren vor (Abb. 14 B). In jeder Probe gab es auch SEMG2-negative Gefäße.

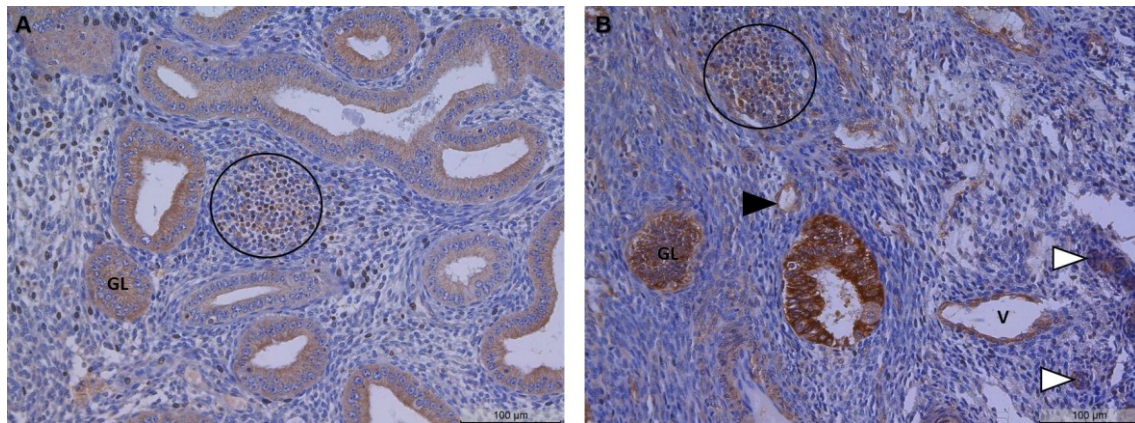


Abbildung 14: SEMG2-positive Lymphozyten-Aggregate (Kreis) in der Basalis von Endometriose-negativen (A) und Endometriose-positiven Probandinnen (C) in der Proliferationsphase. GL = Drüse, Pfeilspitze schwarz = Kapillare, Pfeilspitzen weiß = Spiralarterien, V = Venole, Maßstabsleisten = 100 µm.

3.6 Die SEMG2-Expression bei EMCs und im Endozervix

SEMG2 wurde im Rahmen von epithelialen Veränderungen (EMCs) exprimiert. Es wurde in Endometrium-Drüsen gefunden, deren Morphologie typisch für das Arias Stella Phänomen (ASR) der Frühschwangerschaft war (Abb. 15 A). Hierbei sind die Drüsen hypersekretorisch verändert. Sie waren stark gewunden und die glandulären Epithelzellen hatten ein Vakuolen-haltiges, helles Zytoplasma. Die Immunfärbung konzentrierte sich auf die Zytoplasma-Ränder und war in Zellmembran-Nähe am intensivsten. Das SEMG2-positive Stroma war prädezidualisiert und stellenweise dezidualisiert. In Teilabbildung 15 B wird zur Veranschaulichung ein von Murdock et al. [108] beschriebenes ASR abgebildet.

Bei einer weiteren Gewebeprobe wurde eine tubare EMC festgestellt (Abb. 15 C). Das LE ähnelte dem Tubenepithel. Für das Tubenepithel charakteristische Flimmerzellen, sekretorische Zellen mit apikalen Vorwölbungen und interkalare Stiftchenzellen, wurden identifiziert. Das SEMG2-Expressionsmuster war verändert. Stroma und Flimmerzellen waren SEMG2-negativ. Die Stiftchen- und sekretorischen Zellen waren SEMG2-positiv.

Ergebnisse

SEMG2 wurde auch in einer Endozervix-Probe nachgewiesen (Abb. 15 D). Die endozervikale Schleimhaut war im Gegensatz zum Endometrium stark eingefaltet und mit SEMG2-negativem, muzinösem Zylinderepithel ausgekleidet. Darunter befand sich eine Reservezellschicht mit SEMG2-positivem Zytoplasma. Die Stromazellen im Endozervix hatten ebenfalls ein SEMG2-positives Zytoplasma.

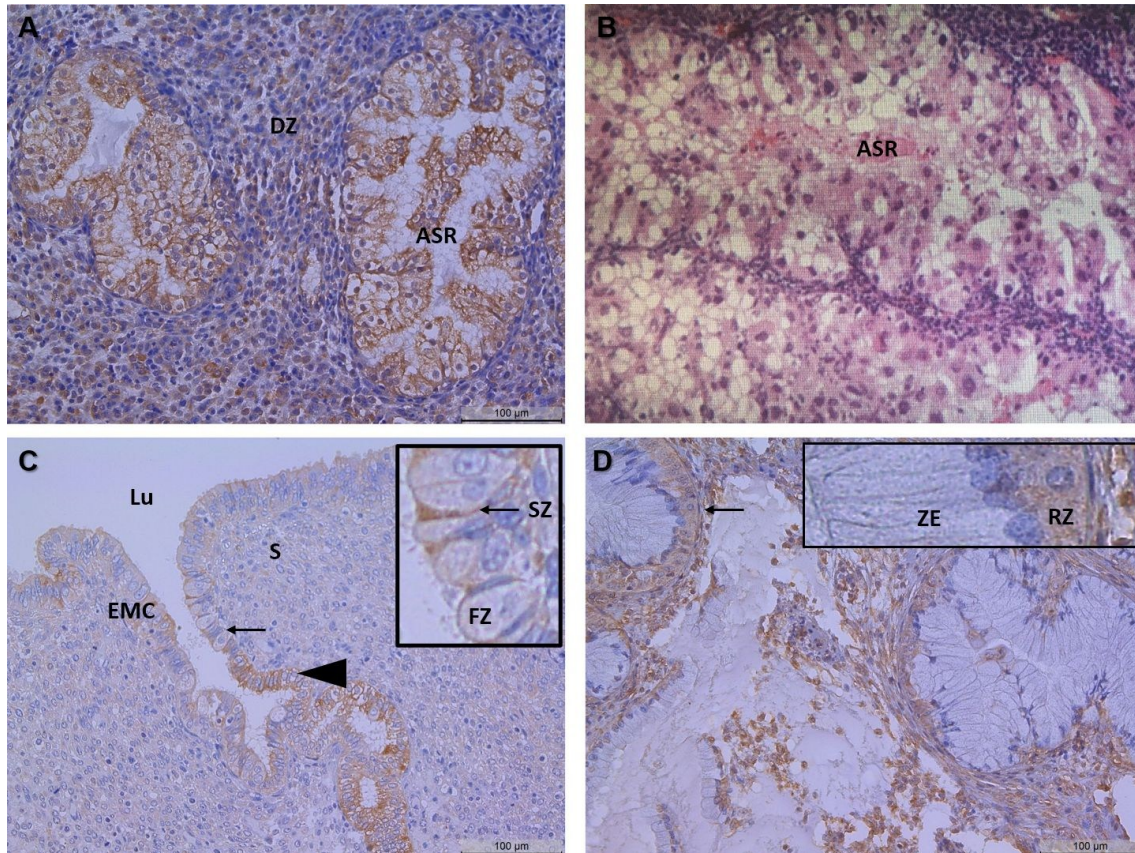


Abbildung 15: SEMG2-Expression bei Arias-Stella-artig veränderten glandulären Epithel einer Endometriose-negativen Probandin (A). Vergleichsabbildung B mit ASR ohne Maßstabsleiste, modifiziert nach Murdock et al., 2019 [108]. SEMG2 bei tubenartig veränderten Endometriumepithel einer Endometriose-positiven Probandin (C) und im Endozervix (D). Der Pfeil zeigt jeweils den vergrößerten Epithelzellabschnitt (Inset) an. Inset C = luminales Epithel mit Stiftchenzellen (SZ) und Flimmerzellen (FZ), Inset D = Zervixepithel (ZE) und Reservezellen (RZ). ASR = Arias-Stella-Reaktion, DZ = Deziduazellen, EMC = epitheliale Veränderung, Pfeilkopf = sekretorische Zellen, S = Stroma, Maßstabsleiste 100 µm (A, B, D).

3.7 Zusammenfassung der SEMG2-Ergebnisse im Endometrium

Die SEMG2-Expression im Endometrium wurde charakterisiert. Dazu wurden Lokalisation und Intensität der Immunfärbung in den verschiedenen Gewebekomponenten des menschlichen Endometriums im Zyklusverlauf untersucht. SEMG2 wurde im LE, GE und Stroma zu verschiedenen Zeitpunkten des Menstruationszyklus exprimiert. Es war in proliferativen und sekretorischen Proben von

Endometriose-negativen und -positiven Patientinnen präsent. Die Färbung erreichte ihren Höhepunkt in der zweiten Zyklushälfte. Im Verlauf der zweiten Zyklushälfte konnte ein fortwährend hohes Expressionsniveau beobachtet werden, das auch spätsekretorisch erhalten blieb. SEMG2-Hauptlokalisationen waren die glandulären Epithelzellen des Endometriums. Das Protein wurde auch in epithelialen metaplasieartigen Veränderungen (EMCs) wie Arias-Stella-artig transformiertem Endometriumgewebe (ASR) und im Endozervix nachgewiesen.

3.8 Charakteristika der Probandinnen für die SEMG2-Bestimmungen in Mukusproben

Die 134 Studienteilnehmerinnen wurden jeweils anhand der Merkmale Fertilität, Zyklusphase, Endometriose-Erkrankung und Hormontherapie aufgeteilt. Daraus ergaben sich die vier Gruppenpaare *fertil* und *infertil*, *proliferativ* und *sekretorisch*, *Endometriose-negativ* und *-positiv* sowie *nicht hormontherapiert* und *hormontherapiert*. In Tabelle 8 sind alle signifikanten Merkmalsunterschiede aufgelistet.

Infertile Probandinnen waren signifikant jünger als fertile und wurden im Mittel fünf Jahre früher in der EM-Sprechstunde vorstellig (Tab. 8 A, $p = 0,005$). Bei den anderen Gruppierungen konnte kein signifikanter Altersunterschied festgestellt werden. Die fertilen Probandinnen verwendeten im Vergleich zur infertilen Gruppe mehr Hormonpräparate (Tab. 8 A, $p = 0,0391$). In der infertilen Gruppe waren diese bei infertilen, EM-positiven Frauen mit Dysmenorrhö indiziert. In solchen Fällen wurden vermutlich Schmerz-lindernde Effekte trotz kontraceptiver Wirkung gegenüber dem Kinderwunsch priorisiert. Infertile, EM-negative Frauen nutzten mit einer Ausnahme keine Hormonpräparate.

Tabelle 8 A: Merkmalsunterschiede bei den Mukusproben-Studienteilnehmerinnen

A	fertil N = 64	infertil N = 70	p-Wert
Alter	37,6 ± 0,9 37,5 (21 – 52)	33,9 ± 0,7 32,5 (24 – 49)	0,0006
Hormontherapie			
nicht-hormontherapiert	39,1% (25/64)	60% (42/70)	0,0391
hormontherapiert	61% (39/64)	40% (28/70)	

Numerische Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler, Median (Spannweite) und kategoriale Merkmale als Prozentwert angegeben. P-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests und dem exakten Test nach Fisher ermittelt.

Ergebnisse

Probandinnen aus der ersten und zweiten Zyklushälfte unterschieden sich im Gegensatz zu den anderen Gruppierungen erwartungsgemäß hinsichtlich des Zyklustages (Tab. 8 B).

Tabelle 8 B: Merkmalsunterschiede bei den Mukusproben-Studienteilnehmerinnen

B	proliferativ N = 36	sekretorisch N = 54	nicht- datierbar	
Zyklustag	8,4 ± 0,6 10 (1 – 13)	24 ± 1 22 (14 – 50)	n = 44	<0,0001

Numerische Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler, Median (Spannweite) und kategoriale Merkmale als Prozentwert angegeben. P-Werte wurden mithilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelt. 44 Proben konnten keiner Zyklusphase zugeordnet werden.

EM-positive Probandinnen wurden signifikant häufiger hormontherapiert als EM-negative (Tab. 8 C, p = 0,0002). Auch kamen gynäkologische Eingriffe bei EM-Erkrankten deutlich häufiger als bei EM-negativen Probandinnen vor (Tab. 8 C, p < 0,0001).

Tabelle 8 C: Merkmalsunterschiede bei den Mukusproben-Studienteilnehmerinnen

C	EM-negativ N = 45	EM-positiv N = 89	p-Wert
Hormontherapie			
<i>nicht-hormontherapiert</i>	73,3% (33/45)	38,2% (34/89)	0,0002
<i>hormontherapiert</i>	26,7% (12/45)	61,8% (55/89)	
Operationen			
<i>nicht-operiert</i>	84,4% (38/45)	2,2% (2/89)	<0,0001
<i>operiert</i>	15,6% (7/45)	97,8% (87/89)	

Die Merkmale wurden als Prozentwert angegeben. P-Werte wurden mithilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelt. EM = Endometriose.

Hormontherapierte Patientinnen wurden signifikant häufiger operiert als Probandinnen, die keine Hormonpräparate einnahmen (Tab. 8 D). Sie nutzten weniger Analgetika, der Unterschied war aber nicht signifikant (p = 0,3143).

Tabelle 8 D: Merkmalsunterschiede bei den Mukusproben-Studienteilnehmerinnen

D	HT-negativ N = 67	HT-positiv N = 67	p-Wert
Operationen			
<i>nicht-operiert</i>	43,3% (29/67)	16,4% (11/67)	0,0012
<i>operiert</i>	56,7% (38/67)	83,6% (56/67)	

Die Merkmale wurden als Prozentwert angegeben. P-Werte wurden mithilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelt. HT = Hormontherapie.

3.9 Der SEMG2-Gehalt in endozervikalen Mukusproben

Der endozervikale SEMG2-Mukusgehalt wurde bei 134 Probandinnen analysiert. Das SEMG2-Protein konnte in endozervikalen Mukusproben fertiler und infertiler Probandinnen sowohl in der Proliferations- als auch in der Sekretionsphase nachgewiesen werden.

Bei fertilen Probandinnen betrug die durchschnittliche SEMG2-Konzentration $462,8 \pm 52,7$ pg/ml bei einem Stichprobenumfang von $n = 64$. Infertile Probandinnen ($n = 70$) hatten eine durchschnittliche Konzentration von $243,9 \pm 25,8$ pg/ml (Tab. 9 A). Gegenüber der fertilen Probengruppe war die Konzentration des Proteins in den Mukusproben infertiler Probandinnen um 47% signifikant reduziert ($p = 0,0015$). Auch war der SEMG2-Proteingehalt in den Proben aus der Sekretions- ($407,1 \pm 48,7$) im Vergleich zur Proliferationsphase ($327,2 \pm 72,1$) um 19,6% erhöht (Tab. 9 B, $p = 0,0438$).

Tabelle 9 A, B: SEMG2-Konzentrationen in endozervikalen Mukusproben

A	fertil N = 64	infertil N = 70	p-Wert
	$462,8 \pm 52,7$	$243,9 \pm 25,8$	0,0015
	353 (0 – 1709)	178,5 (0 – 812)	
B	proliferativ N = 36	sekretorisch N = 54	
	$327,2 \pm 72,1$	$407,1 \pm 48,7$	0,0438
	170 (0 – 1709)	301 (0 – 1495)	

Die SEMG2-Konzentrationen in pg/ml wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler, Median (Spannweite) angegeben. Die Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Konzentrationsunterschiede untersucht.

Zwischen EM-positiven und -negativen Proben gab es keinen signifikanten SEMG2-Konzentrationsunterschied (Tab. 9 C). Eine Aufteilung der EM-positiven Probandinnen anhand unterschiedlicher Erkrankungsstadien *Erstdiagnose*, *Rezidiv*, *mit* und *ohne Rezidiv-Verdacht* wurde vorgenommen (Kap. 2.1.2). Die endozervikale SEMG2-Konzentration war in den daraus resultierenden vier Untergruppen vergleichbar. Auch beim Vergleich von Proben nicht-hormontherapierter und hormontherapierter Frauen ergab sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied (Tab. 9 D). Die endozervikale SEMG2-Konzentration wurde durch Endometriose, verschiedene Zeitpunkte der Erkrankung oder die Hormontherapie nicht entscheidend beeinflusst.

Ergebnisse

Tabelle 9 C, D: SEMG2-Konzentrationen in endozervikalen Mukusproben

C	EM-negativ N = 45	EM-positiv N = 89	
	305,4 ± 44,1 211 (0 – 1431)	370,2 ± 39,2 253 (0 – 1709)	ns
D	HT-negativ N = 67	HT-positiv N = 67	
	328,3 ± 41 211 (0 – 1431)	368,6 ± 44 261 (0 – 1709)	ns

Die SEMG2-Konzentrationen in pg/ml wurden als Mittelwert ± Standardfehler, Median (Spannweite) angegeben. Die Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Konzentrationsunterschiede untersucht. EM = Endometriose, HT = Hormontherapie. ns = nicht signifikant.

Der Zusammenhang zwischen Fertilität und SEMG2-Konzentration im Zervixschleim wurde entsprechend den beiden Zyklusphasen untersucht (Tab. 9 E, F). Fertile Probandinnen der Proliferations- als auch der Sekretionsphase hatten einen höheren SEMG2-Gehalt im Mukus im Vergleich zu infertilen Probandinnen derselben Zyklusphase. Der SEMG2-Konzentrationsunterschied war aber lediglich in der Sekretionsphase signifikant ($p = 0,0235$).

Tabelle 9 E, F: SEMG2-Konzentrationen in endozervikalen Mukusproben

E	fertil, proliferativ N = 14	infertil, proliferativ N = 22	
	517,4 ± 160,7 256 (0 – 1709)	206,2 ± 47,1 139 (0 – 812)	ns
F	fertil, sekretorisch N = 25	infertil, sekretorisch N = 29	
	546,2 ± 85,8 471 (0 – 1495)	287,2 ± 42,4 188 (56 – 808)	0,0235

Die SEMG2-Konzentrationen in pg/ml wurden als Mittelwert ± Standardfehler, Median (Spannweite) angegeben. Die Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Konzentrationsunterschiede untersucht.

Beim Vergleich von Probandinnen mit und ohne die EM-spezifische Schmerzen Dysmenorrhö, chronischer Unterbauchschmerz, Dysurie, Dyschezie und Dyspareunie wurde kein signifikanter SEMG2-Konzentrationsunterschied festgestellt (Tab. 8 G – J).

Tabelle 9 G - J: SEMG2-Konzentrationen in endozervikalen Mukusproben

G	DYM-negativ	DYM-positiv	
	310,6 ± 48,1	366,3 ± 37,9	ns

Ergebnisse

	205 (0 – 1709)	261 (0 – 1631)	
H	CUB-negativ	CUB-positiv	
	324,8 ± 38,4	385,7 ± 48,1	ns
	206,5 (0 – 1709)	271 (0 – 1495)	
I	DYU-negativ	DYU-positiv	
	347,8 ± 33,5	351 ± 68,5	ns
	235 (0 – 1709)	235 (0 – 1495)	
J	DYC-negativ	DYC-positiv	
	338,7 ± 36,5	364,9 ± 52,4	ns
	235 (0 – 1709)	232,5 (0 – 1631)	
K	DYP-negativ	DYP-positiv	
	388 ± 58,4	320 ± 29,9	ns
	213,5 (0 – 1709)	243 (0 – 1495)	

Die SEMG2-Konzentrationen in pg/ml wurden als Mittelwert ± Standardfehler, Median (Spannweite) angegeben. Die Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Konzentrationsunterschiede untersucht. CUB = Chronischer Unterbauchschmerz, DYU = Dysurie, ns = nicht signifikant.

Der Nutzen von endozervikalem SEMG2 als potenzieller, minimal-invasiver Marker für die Fertilitätsdiagnostik bei Frauen in der zweiten Zyklushälfte wurde getestet. Anhand einer visuellen Gegenüberstellung der SEMG2-Konzentrationen von fertilen und infertilen Probandinnen in der Sekretionsphase sowie mithilfe einer ROC-Kurvenanalyse wurde ein Schwellenwert zur Detektion der eingeschränkten Fertilität bei 330,5 pg/ml festgelegt (Abb. 17).

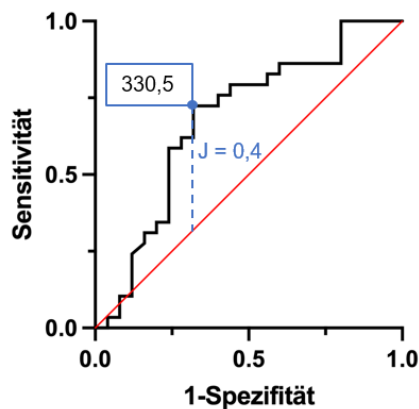


Abbildung 16: ROC-Kurve für die SEMG2-Mukuskonzentration als Fertilitätsmarker bei Probandinnen in der zweiten Zyklushälfte. Mithilfe des Youden-Index (J) wurde der Cut-off bei 330,5 pg/ml verifiziert.

Ergebnisse

Die ROC-Analyse und eine Kontingenztafel mit den aus dem Cut-off resultierenden positiven und negativen Testergebnissen zeigten, dass endozervikales SEMG2 als Fertilitätsmarker geeignet sein könnte (Tab. 10).

Tabelle 10: Kontingenztafel positiver und negativer Testergebnisse beim gewählten Cut-off von 330,5 pg/ml

	tatsächlich positiv	tatsächlich negativ
vorhergesagt positiv	21 (RP)	8 (FP)
vorhergesagt negativ	8 (FN)	17 (RN)

Bei fertilen Frauen entnommene Proben wurden als negativ, bei Infertilen entnommene als positiv definiert. FN = falsch-negativ, FP = falsch-positiv, RN = richtig-negativ, RP = richtig-positiv.

Die Sensitivität und Spezifität des Tests betrugen jeweils 72% und 68%. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) gilt ebenfalls als Testgütekriterium. Je näher der Wert bei 1 liegt, desto trennschärfer der Test. Die ROC-Kurvenanalyse ergab eine akzeptable Trennschärfe mit einem AUC-Wert bei 0,7. Bei Unterschreitung des Schwellenwerts lag eine Fertilitätsstörung mit 72-prozentiger bzw. ca. 2,3-facher Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu fertilen Probandinnen in der Sekretionsphase vor (Tab. 11, LR+ und PPW). Dabei handelt es sich um eine moderate LR+. In diesem Sinne kann der Test erste Hinweise auf eine eingeschränkte Fertilität liefern.

Tabelle 11: ROC-Analyse für SEMG2 als endozervikaler Fertilitätsmarker bei Frauen in der zweiten Zyklushälfte

AUC (95% KI)	Cut-Off	LR+	SN	SP	PPW	NPW	DOR	RR
0,68 (0,53 – 0,83)	330,5	2,26	72%	68%	72%	68%	5,6	2,26

Likelihood Ratio (LR), Sensitivität (SN), Spezifität (SP), positiver und negativer prädiktiver Wert (PPW, NPW), diagnostisches Odds Ratio (DOR) sowie relatives Risiko (RR) wurden für den Grenzwert von 330,5 pg/ml ermittelt. AUC = Fläche unter der ROC-Kurve.

3.10 Sonderfälle bei der Untersuchung des endozervikalen SEMG2-Gehalts

SEMG2 war bei zwei LASH-Probandinnen nachweisbar. Bei beiden Frauen konnte aus dem Zervixstumpf SEMG2-haltiger Mukus gewonnen werden. Anhand einer endozervikalen Gewebeprobe wurde bereits gezeigt, dass SEMG2 auch im Endozervix exprimiert wird. In diesem Fall war es aber immunhistochemisch nur in der Reservezellschicht, nicht aber im Schleim-produzierenden Zylinderepithel lokalisierbar (Kap. 3.6).

3.11 Zusammenfassung der SEMG2-Untersuchung in Mukusproben

SEMG2 ist ein Bestandteil humaner Mukusproben. Das Protein konnte bei fertilen und infertilen Probandinnen im reproduktiven Alter zu unterschiedlichen Zeitpunkten des

Menstruationszyklus mit und ohne Endometriose sowie Hormontherapie nachgewiesen werden. Die SEMG2-Konzentration war abhängig von Fertilität und Zyklusphase und könnte sich als Marker für die Fertilitätsdiagnostik eignen.

3.12 Die CNN1-Expression im Uterus

Die CNN1-Expression in den Uterusproben wurde separat in LE und Funktionalis, Basalis, endomyometrialem Übergang und Adenomyose-Läsionen untersucht.

3.13 Die CNN1-Expression im luminalen Epithel und der Funktionalis

CNN1 war im LE und in den Funktionalis-Drüsen nicht nachweisbar. Es war in zwei Fällen im Stroma unterhalb des LE lokalisiert (Abb. 17 A, B). Die Übersichtsaufnahme 17 A bildet das Myometrium als CNN1-Hauptlokalisierung in humanen Uterusproben ab. Es diente als Positivkontrolle bei der Untersuchung der CNN1-Expression in anderen Gewebekomponenten. In einer weiteren Gewebeprobe wurde eine periglanduläre CNN1-Expression in der Funktionalis identifiziert (Abb. 17 C, D). Das Protein wurde in Stromazellen zytoplasmatisch exprimiert. Es kam in der Funktionalis nur selten, in 37,5% der Fälle, vor.

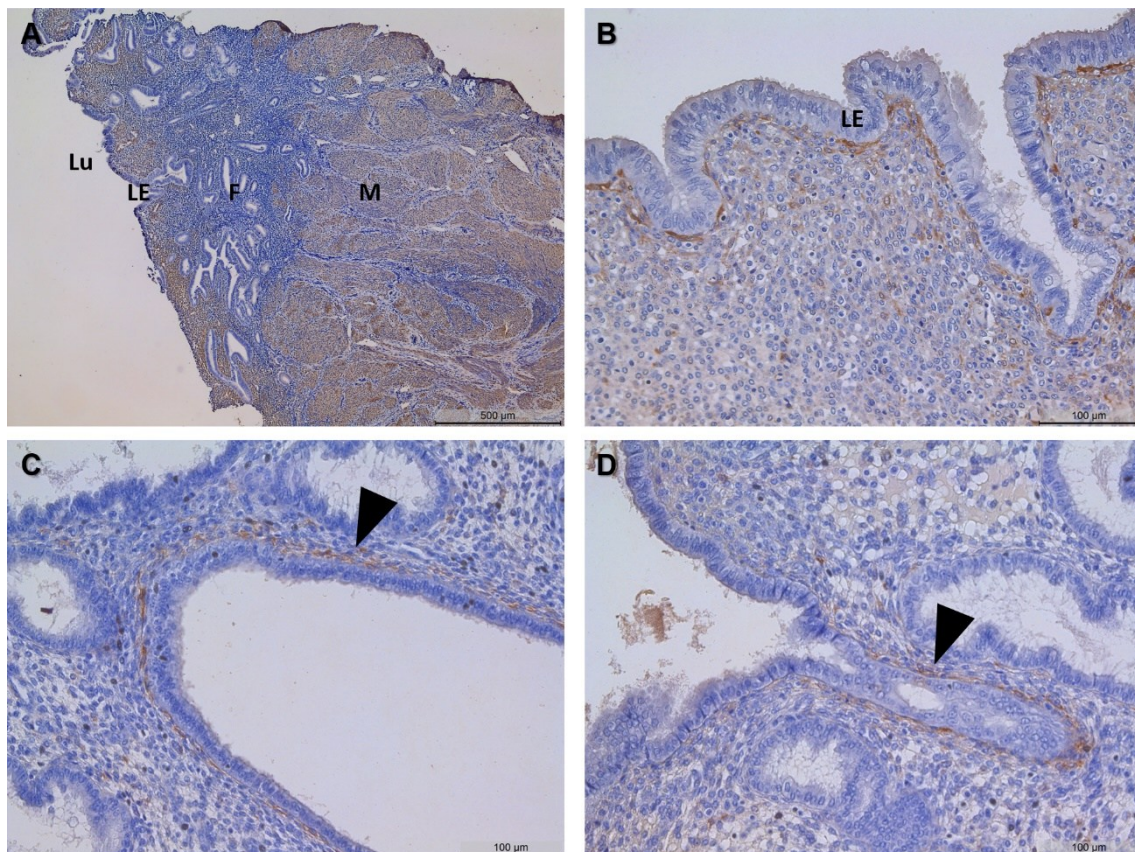


Abbildung 17: CNN1-positive stromale Zellen in der Funktionalis von Probandinnen mit AM und ohne EM. CNN1-Stromafärbung unterhalb des luminalen Epithels in der Proliferations- (A) und Sekretionsphase (B). Periglanduläre CNN1-Stromafärbung einer sekretorischen Funktionalis-

Ergebnisse

Drüse (C, D). F = Funktionalis, LE = Luminales Epithel, Lu = Uteruscavum, M = Myometrium, Pfeilspitze = periglanduläre Stromafärbung, Maßstabsleisten 500 µm (A), 100 µm (B – D).

3.14 Die CNN1-Expression in der Basalis

CNN1 war in Basalis-Drüsen nicht nachweisbar. Das Protein wurde im basalen Stroma exprimiert und kam hier häufigsten vor. 93,8% der untersuchten Basalis-Gewebeabschnitte enthielten CNN1-positive Stromazellen. Die Übersichtsaufnahme 18 A zeigt eine homogene CNN1-Färbung in der Basalis bei CNN1-negativer Funktionalis. Zusätzlich ist ein perivaskuläres CNN1-Expressionsmuster sichtbar, das ausschließlich in der Basalis beobachtet wurde. Im CD10-Folgeschnitt waren die stromalen Zellen in der Basalis und Funktionalis immungefärbt (Abb. 18 B). Die CNN1-negativen Drüsen verliefen meist horizontal entlang des Myometriums und waren oft von periglandulären, CNN1-positiven Stromazellen umgeben (Abb. 18 C). Im CD10-Folgeschnitt war dieser Bereich ebenfalls periglandulär gefärbt (Abb. 18 D).

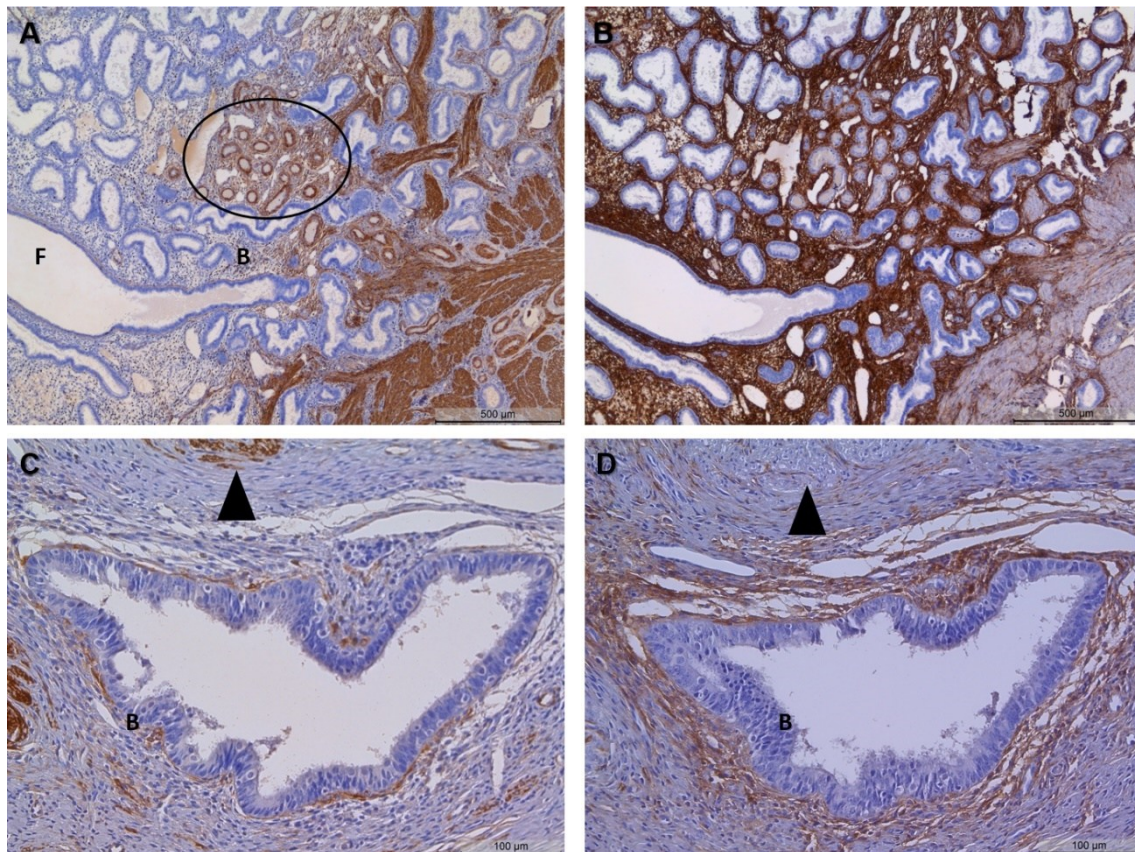


Abbildung 18: Nachweis einer homogenen, perivaskulären und unvollständigen periglandulären CNN1-Stromafärbung in der Basalis (A, C) mit CD10-positiven Folgeschnitten (B, D). B = Basalis, F = Funktionalis, Kreis = perivaskuläre Immunfärbung, Pfeilspitze = Myometrium, Maßstabsleisten = 500 µm (A, B) und 100µm (C, D).

Bei der periglandulären CNN1-Färbung gab es subtile Unterschiede hinsichtlich Vollständigkeit und Ausprägung. Abbildung 19 B zeigt, dass CNN1-positive, spindelförmige Stromazellen zahlreicher und vollständig um eine Basalis-Drüse angeordnet sein konnten. In diesem Fall war die CD10-Folgefärbung homogen (Abb. 19 C).

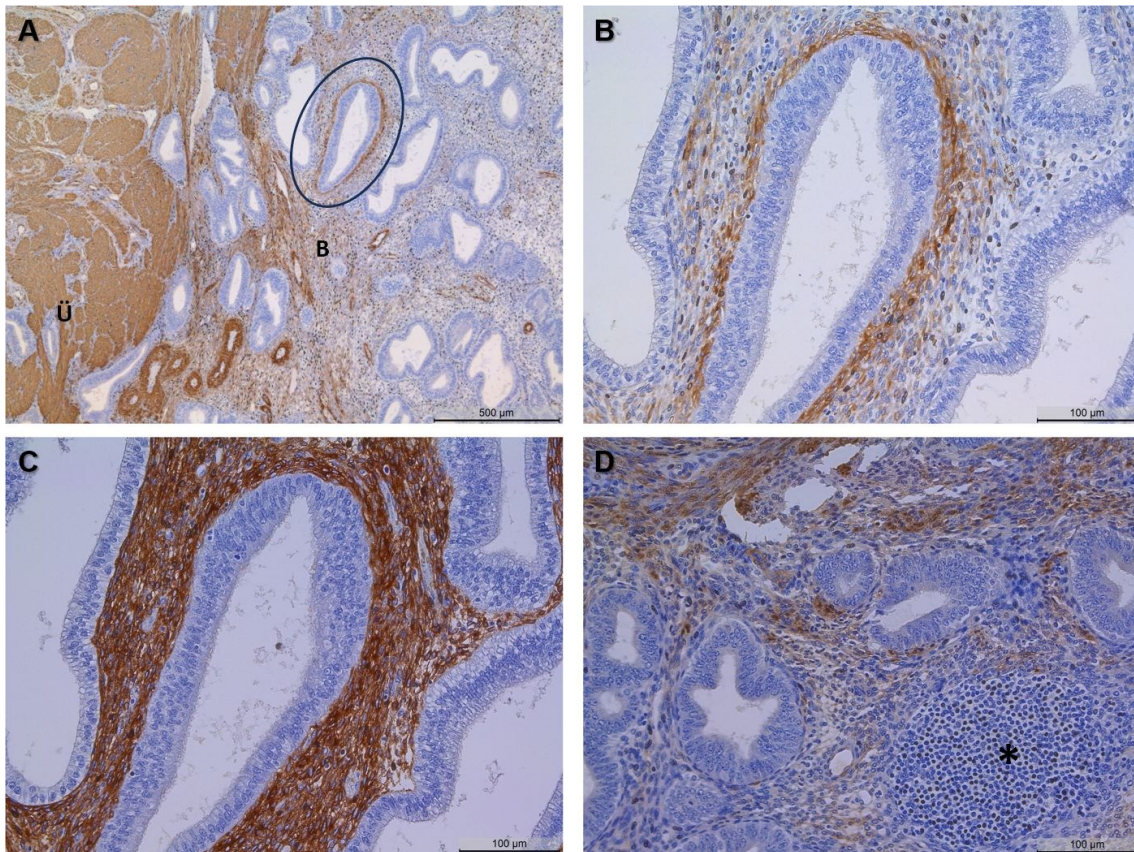


Abbildung 19: Nachweis einer vollständigen periglandulären CNN1-Stromafärbung in der Basalis in der Übersichtsaufnahme (A) und in höherer Vergrößerung (B) mit CD10-positivem Folgeschnitt (C). Nebenbefundlich war ein CNN1-negatives Lymphozyten-Aggregat sichtbar (D, Stern). B = Basalis, Ü = endomyometrialer Übergang, Kreis = periglanduläre Immunfärbung, Maßstabsleisten = 500µm (A), 100µm (B – D).

3.15 Die CNN1-Expression am endomyometrialen Übergang

Der endomyometriale Übergang ist ein irregulär verlaufender Grenzbereich zwischen Endometrium und Myometrium. In drei Gewebeproben wurden hier schwach CNN1-positive Drüsen identifiziert, die den regulären Grenzverlauf im Sinne einer beginnenden Myometrium-Invasion überschritten hatten. Die Teilabbildung 20 A zeigt, dass solche „invasiven Drüsen“ ebenfalls Claudin3-positiv waren. Die Immunfärbung war vergleichbar zu anderen Claudin3-positiven Endometrium-Drüsen. In Teilabbildung 20 B ist eine CNN1-positive Drüse abgebildet. Der Gewebeschnitt ist fragmentiert, aber die

Ergebnisse

korrespondierende Drüse konnte anhand des charakteristischen Drüsenverlaufs zweifelsfrei im Claudin3-Schnitt identifiziert werden (Abb. 20 A).

Die Teilabbildung 20 C zeigt das fibrilläre, muskelfaser-ähnliche CNN1-Expressionsmuster im randständigen Stroma einer scheinbar vom restlichen Endometrium losgelösten Schleimhautinsel. Sie war durch eine ca. 1mm breite Myometrium-Schicht vom darüberliegenden Endometrium abgetrennt und somit Bestandteil des endomyometrialen Übergangs und per definitionem kein AM-Herd (Kap. 1.1). Die fibrilläre CNN1-Färbung war im Folgeschnitt CD10-positiv, während das umgebende Myometrium ungefärbt blieb (Abb. 20 D). Insgesamt war das Stroma im endomyometrialen Übergang in 58,5% der Fälle CNN1-positiv.

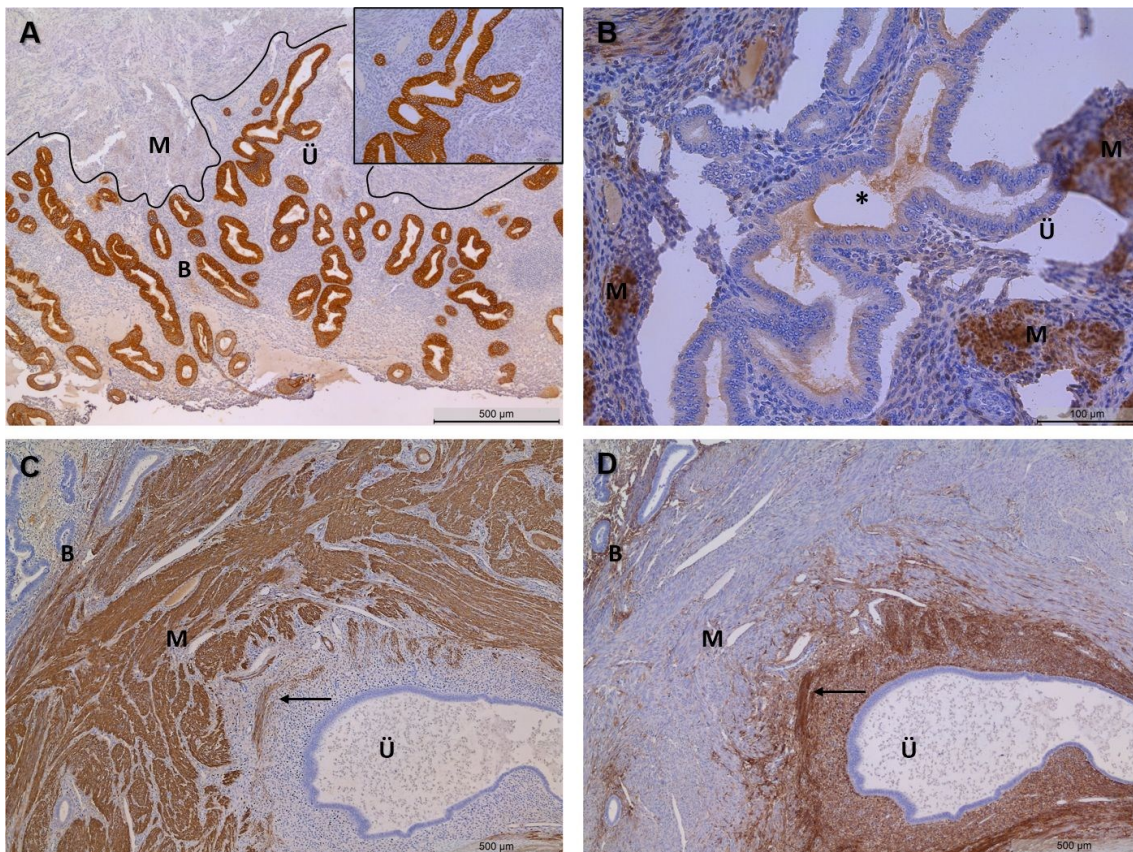


Abbildung 20: Claudin3-positive Übersichtsaufnahme (A) und Nachweis einer schwach, CNN1-positiven Drüse im endomyometrialen Übergang (B, Stern). Fibrilläre CNN1-Stromafärbung im Übergangsbereich zwischen Endometrium und Myometrium mit CD10-positivem Folgeschnitt (D). Inset A = korrespondierender Drüsenabschnitt zu Teilabbildung 20 B. B = Basalis, F = Funktionalis, Ü = endomyometrialer Übergang, Linie = Grenzverlauf zwischen Endo- und Myometrium M = Myometrium, Pfeil = fibrilläre Stromafärbung, Maßstabsleisten = 500 µm (A, C, D) und 100µm (B).

3.16 Die CNN1-Expression in Adenomyose-Herden

AM-Herde sind aus Basalis-ähnlichen Drüsen und endometrialem Stroma zusammengesetzt. Abbildung 21 A stammt von einer nicht-hormontherapierten EM-Patientin und zeigt einen großen AM-Herd mit zystisch-dilatierter Drüse. Solche blind-endenden Drüsenabschnitte werden als *occluded glands* bezeichnet. CNN1 wurde im Zytoplasma glandulärer Epithelzellen exprimiert, aber CNN1-positive AM-Drüsen traten nur vereinzelt auf. Davon waren 2/3 zystisch-dilatierte *occluded glands* mit stellenweise apikal betonter CNN1-Immunfärbung (Abb. 21 A, Inset). Sie waren im Folgeschnitt immunreaktiv für Claudin3 (Abb. 21 B). Verglichen mit nicht-dilatierten AM-Drüsen wurde Claudin3 zytoplasmatischer und weniger membranständig exprimiert (Abb. 21 B, Insets). Es gab erhebliche Unterschiede in Bezug auf die Läsions- und Drüsengröße sowie Drüsenanzahl. Abbildung 21 C stammt von einer hormontherapierten EM-Patientin mit zwei, im Vergleich zu den Teilabbildungen 21 A und B, deutlich kleineren AM-Herden, die eine englumige Drüse bzw. ausschließlich Stroma beinhalten.

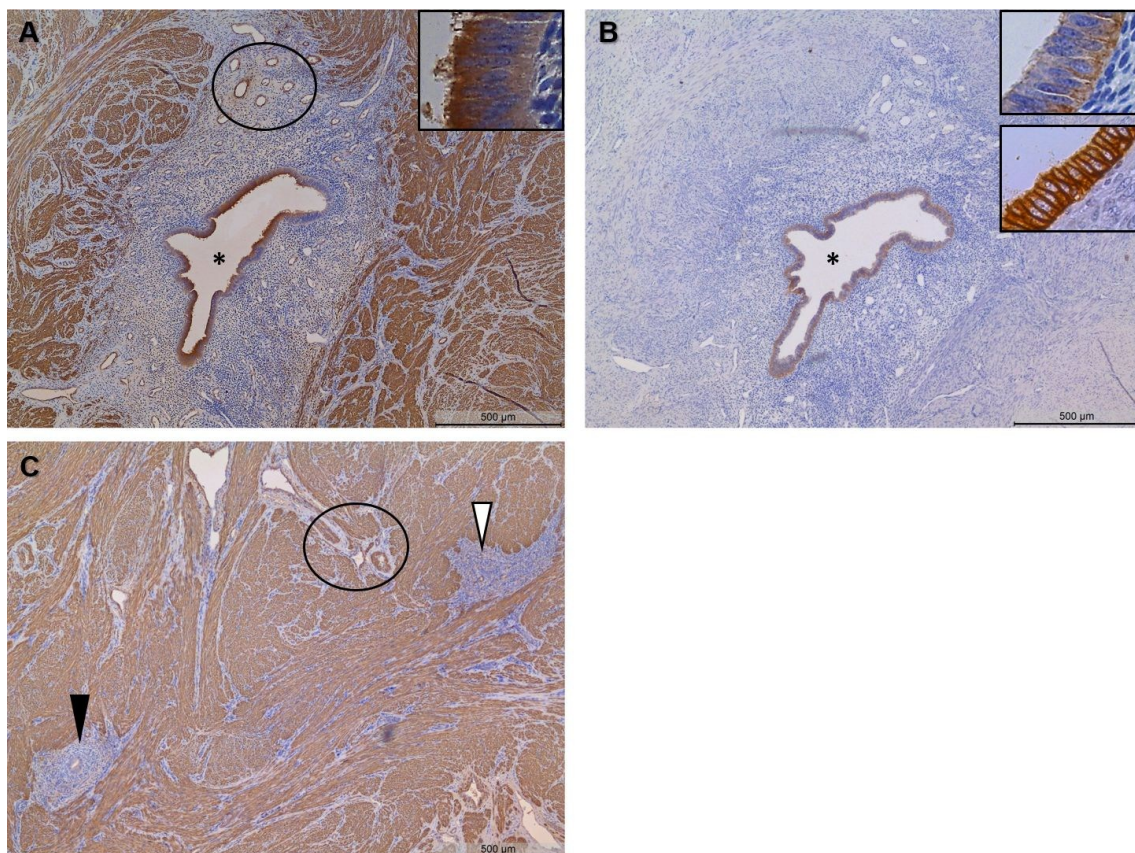


Abbildung 21: Nachweis einer CNN1-positiven, zystisch-dilatierten AM-Drüse (A, Stern) bei einer nicht-hormontherapierten EM-Patientin. Claudin3-positiver Folgeschnitt (B). AM-Herde bei einer hormontherapierten EM-Patientin (C). Inset A = CNN1 in dilatiertem AM-Drüsenepithel, Inset B = Claudin3 in dilatiertem (oben) und vergleichsweise in nicht-dilatierten AM-Drüsenepithel (unten). Kreis = CNN1-positive Gefäße, Pfeilspitze schwarz = AM-Herd mit Drüse, Pfeilspitze weiß = AM-Herd ohne Drüsen, Maßstabsleisten = 500 µm (A, B, D) und 100 µm (C).

Ergebnisse

Bei 61,1% der Gewebeproben wurde CNN1 im Zytoplasma adenomyotischer Stromazellen exprimiert. Am häufigsten war eine homogene CNN1-Expression. Abbildung 22 A verdeutlicht, dass diese in Kombination mit einer periglandulären Stroma- und Drüsenepithel-Färbung für CNN1 auftreten konnte. CNN1-positive, nicht-dilatierte AM-Drüsen waren immunreaktiv für Claudin3, vergleichbar zu Claudin3-positiven Drüsen im Endometrium (Abb. 22 B). CNN1-positives AM-Stroma war immer auch CD10-positiv (Abb. 22 C). In Einzelfällen wurde eine fibrilläre CNN1-Expression in den Myometrium-nahen Randbereichen der AM-Herde beobachtet.

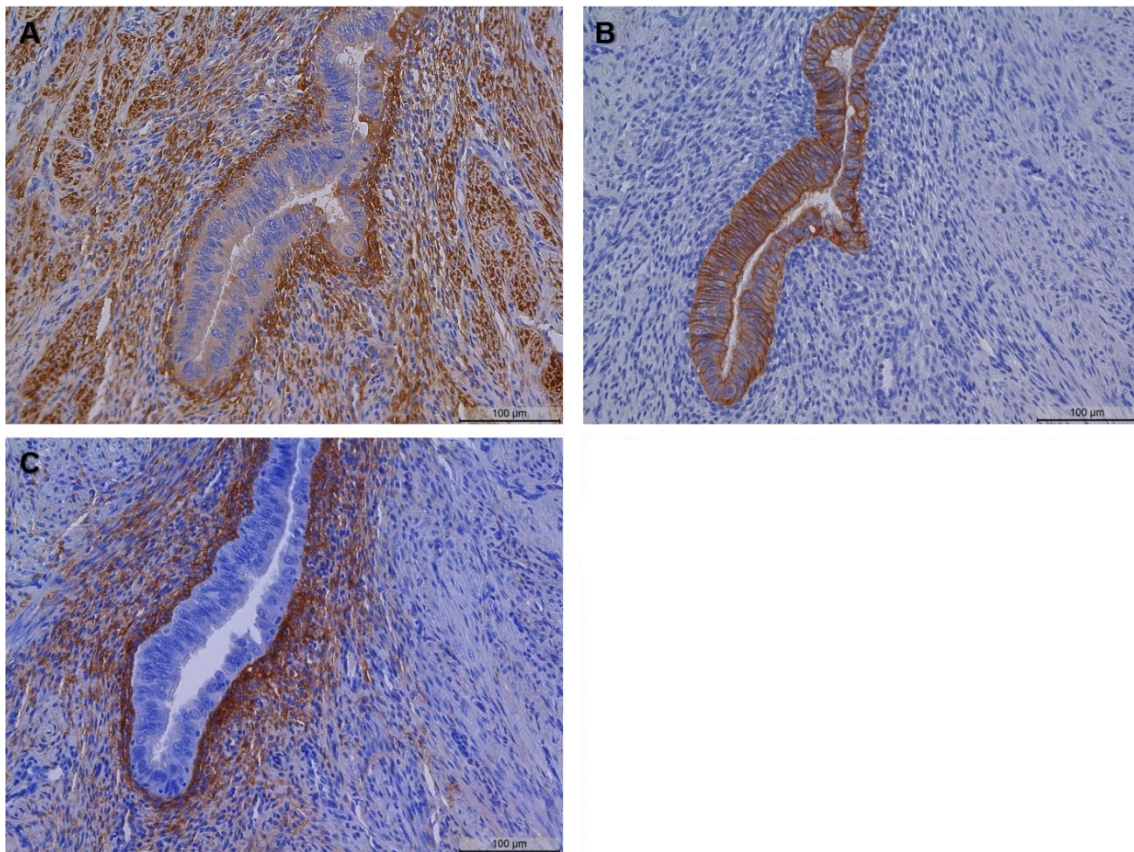


Abbildung 22: Nachweis einer CNN1-positiven AM-Drüse bei einer EM-Patientin (A); Claudin3-positiver Folgeschnitt (B); CD10-positiver Folgeschnitt (C). Maßstabsleiste = 100 µm.

Eine glanduläre CNN1-Expression trat ausschließlich im endomyometrialen Übergang und AM-Herden auf. Ein möglicher Zusammenhang zu Alter, Zyklusphase, EM, Myomen, EM-assoziiierter Schmerz-Symptomatik, Hormontherapie und Fertilität wurde untersucht (Tab. 12). Probandinnen mit und ohne CNN1-positive Drüsen wurden gegenübergestellt. Das Protein wurde bei Frauen mit EM signifikant häufiger im Drüsenepithel des Uterus exprimiert. Bei den anderen Merkmalen lag kein signifikanter Unterschied vor.

Ergebnisse

Tabelle 12: Vergleich von Proben mit und ohne CNN1-positive Drüsen

	GL (CNN1+)	GL (CNN1-)	Fehlende Daten	p-Wert
Alter	39,8 ± 1,6	43,7 ± 1,4	n = 0	ns
Zyklusphase				
proliferativ	40,0% (6/15)	60,0% (9/15)	n = 2	ns
sekretorisch	35,7% (5/14)	64,3% (9/14)		
Endometriose				
positiv	60,0% (9/15)	18,8% (6/15)	n = 0	0,029
negativ	40,0% (3/16)	81,3% (13/16)		
Leiomyom				
ja	43,8% (7/16)	56,3% (9/16)	n = 3	ns
nein	33,3% (4/12)	66,7% (8/12)		
Dysmenorrhö				
ja	50,0% (8/16)	50,0% (8/16)	n = 11	ns
nein	25,0% (1/4)	75,0% (3/4)		
Chronischer Unterbauchschmerz				
ja	66,7% (4/6)	33,3% (2/6)	n = 11	ns
nein	35,7% (5/14)	64,3% (9/14)		
Dysurie				
ja	66,7% (2/3)	33,3% (1/3)	n = 11	ns
nein	41,2% (7/17)	58,8% (10/17)		
Dyschezie				
ja	50,0% (2/4)	50,0% (2/4)	n = 11	ns
nein	43,8% (7/16)	56,3% (9/16)		
Dyspareunie				
ja	50,0% (5/10)	50,0% (5/10)	n = 12	ns
nein	44,4% (4/9)	55,6% (5/9)		
Hormontherapie				
ja	42,9% (3/7)	57,1% (4/7)	n = 11	ns
nein	46,2% (6/13)	53,9% (7/13)		
Fertilität				
fertil	41,7% (5/12)	58,3% (7/12)	n = 12	ns
infertil	57,1% (4/7)	42,9% (3/7)		

Das Alter war normalverteilt und wurde als Mittelwert ± Standardfehler aufgeführt. Für die anderen Merkmale wurden prozentuale und relative Häufigkeiten angegeben. P-Werte wurden mithilfe des t-Tests und dem exakten Test nach Fisher ermittelt. GL (CNN1+) = Gruppe mit CNN1-positiven Drüsen, GL (CNN1-) = Gruppe ohne CNN1-positive Drüsen, ns = nicht signifikant.

3.17 CNN1-Expression in Sonderfällen

Bei hormontherapierten Probandinnen wurden i.d.R. nur schwach CNN1-positive, atrophe AM-Drüsen im Sinne eines therapieinduzierten, regredienten Herdes identifiziert (Abb. 23 A). Diese waren im Folgeschnitt ebenfalls Claudin3-positiv (Abb. 23 B). Weiterhin wurde eine intravaskuläre AM dokumentiert (Abb. 23 C). Das AM-Stroma in den myometrialen Gefäßen war CNN1-negativ.

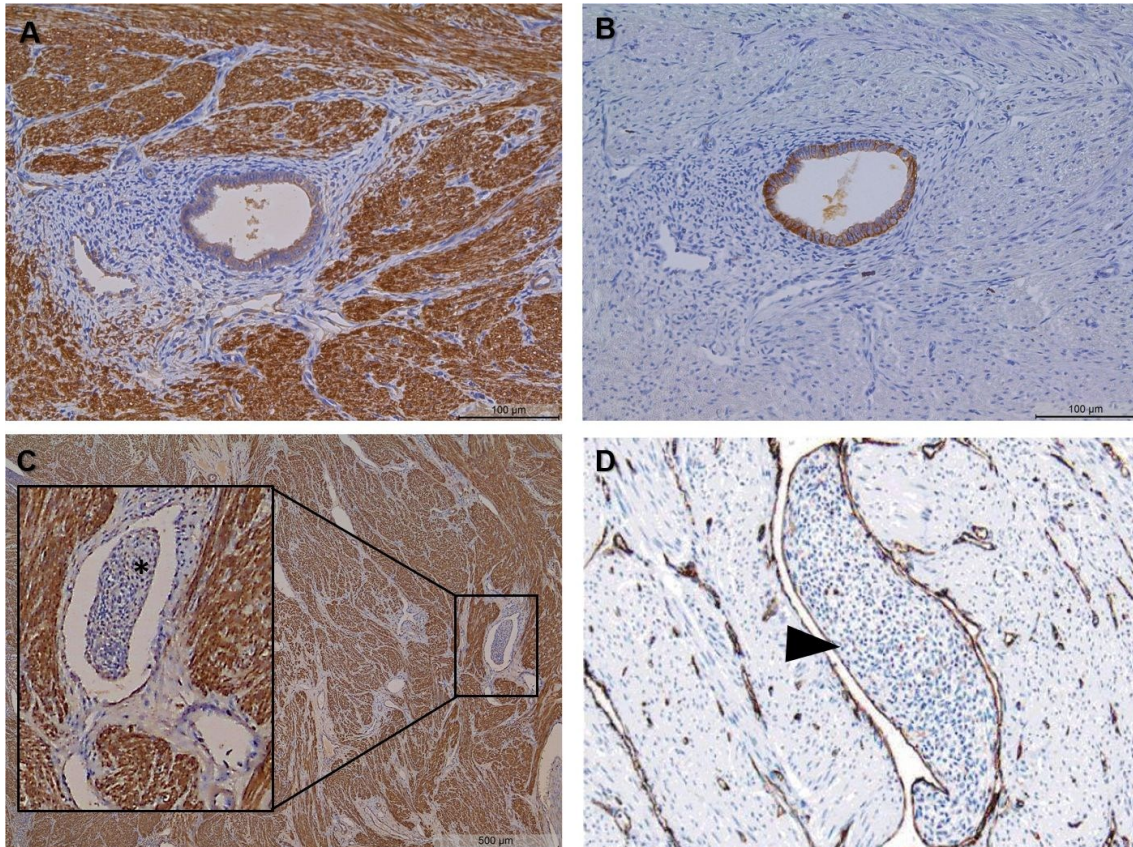


Abbildung 23: Atrophe, schwach CNN1-positive AM-Drüse einer hormontherapierten Patientin (A) mit Claudin3-positivem Folgeschnitt (B). CNN1-negative intravaskuläre AM im vergrößerten Ausschnitt (C, Stern). Vergleichsabbildung D mit CD31-Immunfärbung zur Veranschaulichung der intravaskulären Lage des AM-Stromas, modifiziert nach Kurman et al., 2019 [109]. Maßstabsleisten = 100µm (A, B) und 500µm (C), Vergleichsabbildung D ohne Maßstabsleiste.

3.18 Zusammenfassung der CNN1-Untersuchung im Uterusgewebe

CNN1 wurde im humanen Uterusgewebe exprimiert. Hauptlokalisation war das Myometrium. Das Protein wurde im Zytoplasma endometrialer und adenomyotischer Stromazellen nachgewiesen. Vier stromale CNN1-Expressionsmustern wurden in absteigender Häufigkeit differenziert: homogen, periglandulär, fibrillär und perivaskulär (Tab. 13). Oft traten diese in Kombination auf, insbesondere in der Basalis. Nur in diesem Gewebeabschnitt war eine perivaskuläre CNN1-Expression sichtbar. Alle CNN1-positiven Stromazellen waren auch CD10-positiv. CNN1-positive Drüsen waren nur in AM-Herden und vereinzelt im endomyometrialen Übergang vertreten und ebenfalls Claudin3-positiv (Tab. 13). Eine glanduläre CNN1-Expression trat signifikant häufiger bei EM-positiven Probandinnen auf.

Tabelle 13: CNN1-Expressionsmuster in den uterinen Gewebeabschnitten

		AM	Ü	B	F
homogen	%	38,7%	23,5%	62,5%	25%
(z.T. fokal)	(n/N)	(12/31)	(4/17)	(10/16)	(2/8)
periglandulär	%	19,4%	17,6%	31,3%	12,5%
	(n/N)	(6/31)	(3/17)	(5/16)	(1/8)
fibrillär	%	6,5%	11,8%	31,3%	0%
	(n/N)	(2/31)	(2/17)	(5/16)	(0/8)
perivaskulär	%	0%	0%	25%	0%
	(n/N)	(0/31)	(2/17)	(4/16)	(0/8)
epithelial	%	29%	17,6%	0%	0%
	(n/N)	(9/31)	(3/17)	(0/16)	(0/8)

Relative (n/N) und prozentuale Häufigkeit (%) der CNN1-Expression in den Gewebeabschnitten Adenomyose (AM), endomyometrialer Übergang (Ü), Basalis (B) und Funktionalis (F). Vier stromale Expressionsmuster (homogen, periglandulär, fibrillär, perivaskulär) wurden identifiziert und eine Expression im Drüsenepithel.

4 Diskussion

4.1 Probandinnenkollektiv für die SEMG2-Immunhistochemie

Die SEMG2-Expression im Endometrium wurde in 32 proliferativen und sekretorischen Uterusproben von Frauen mit und ohne EM immunhistochemisch untersucht. Weiterhin wurden drei nicht-datierbare Sonderfälle als Restgruppe einbezogen. Eine Stärke der immunhistochemischen Untersuchung war, dass die Immunfärbung in jeder Gewebekomponente separat erfasst wurde. Durch die Unterscheidung zwischen früh-, mitt-, und spätsekretorischen Phasenabschnitten konnte die Proteinexpression im zeitlichen Verlauf noch genauer beurteilt werden. Die Stichprobenanzahl für die vier nach Zyklusphase und EM aufgeteilten Vergleichsgruppen war vergleichbar zu anderen immunhistochemischen Studien zum Endometrium und Endometriose. Oft unterscheiden diese bei der Analyse eines endometrialen Expressionsprofils aber nicht zwischen EM-negativen und -positiven Probandinnen [110]. Eine Herausforderung ist die Heterogenität EM-positiver Kollektive hinsichtlich Erkrankungsausprägung, Lokalisation, Symptomintensität und Fertilität. Es fehlen ausreichend genaue, nicht-invasive Diagnosemöglichkeiten. Selbst bei Frauen mit unauffälligem Laparoskopie-Befund können mikroskopische EM-Läsionen vorliegen. Höchstwahrscheinlich hatten die verschiedenen EM-Ausprägungen aber keinen Einfluss auf die SEMG2-Expression, da diese in allen EM-positiven Proben vergleichbar war.

4.2 Analyse der SEMG2-Expression im humanen Uterusgewebe

4.2.1 SEMG2-Expression im luminalen Epithel

SEMG2 wurde ursprünglich im Ejakulat bzw. Seminalplasma entdeckt [64]. Der Großteil des ejakulierten SEMG2 stammt aus dem Zytoplasma des Bläschendrüseneithels [66]. Vieles deutet darauf hin, dass endometriales SEMG2 ebenfalls ein Sekretionsprodukt ist. SEMG2 wurde zytoplasmatisch im LE des Endometriums exprimiert (Kap. 3.1). Im Vergleich zur Proliferationsphase war die SEMG2-Immunfärbung im sekretorischen LE intensiver und oft in Richtung des Uteruscavums betont. Weiterhin war das Protein in Pinopoden nachweisbar [111]. Diese 5-10µm hohen, apikalen Membranvorwölbungen wurden v.a. ultrastrukturell untersucht, können aber auch lichtmikroskopisch identifiziert werden und haben eine sekretorische Funktion [112]. In Übereinstimmung mit der Literatur waren sie im LE und in den oberen Abschnitten der Drüsenausführungsgänge sichtbar. Pinopoden gelten als Rezeptivitätsmarker, da ihr Auftreten um das Implantationszeitfenster mit einer erfolgreichen Schwangerschaft in Verbindung gebracht wurde [113]. Das in ihnen beinhalten SEMG2 könnte eine Rolle für die weibliche Empfänglichkeit spielen. Für Pinopoden wurden mehrere Sekretionsmodi

beschrieben [114]. SEMG2-positive Vesikel wurden über dem LE und in den Drüsenausführungsgängen der frühen und mittleren Sekretionsphase beobachtet. SEMG2 könnte im Rahmen eines apokrinen Sekretionsmechanismus in zytoplasmatischen Abschnürungen extrazellulär in das Uteruscavum gelangen. Dort könnte es mit der Blastozyste und aufsteigenden Spermien in Kontakt kommen. Möglicherweise wird das Protein auch sezerniert. Im Bereich der Drüsenausführungsgänge waren luminale Zilienzellen mit SEMG2-benetzten Kinozilien lokalisiert. Ihr Zilienschlag könnte eine großflächigere Verteilung uteriner Sekretionsprodukte wie SEMG2 bewirken. Interaktionen zwischen uterinen Zilienzellen und der Kopfregion aufsteigender Spermien wurden beobachtet [115]. Hierbei könnte SEMG2 an die Spermienoberfläche binden. Bekannt ist, dass SEMG-Fragmente aus dem Ejakulat in das Uteruscavum gelangen. Als Spermien-gebundene Dekapazitationsfaktoren verhindern sie eine vorzeitige Kapazitation bzw. Spermienreifung, was essentiell für die Überlebensfähigkeit der Spermien im weiblichen Reproduktionstrakt ist [63]. Naheliegender wäre, dass diese Wirkung v.a. durch das weibliche SEMG2 zustande kommt. Das im Mäuseuterus vorkommende SEMG-Homologon SVS2 hat einen vergleichbaren Effekt [75]. Auch im menschlichen Uterussekret werden Spermien-protective, kapazitationshemmende Bestandteile vermutet. SEMG2 könnte dazugehören. Ausreichend konzentriert wirken SEMGs als Spermienmotilitätsinhibitoren. Vermutlich werden solche Konzentrationen intrauterin nicht erreicht. Eine Bestimmung des SEMG2-Gehalts in Uteruslavage könnte Gewissheit bringen. Bei SVS2 wurde keine motilitätsinhibierende Wirkung auf intrauterine Spermien festgestellt. Weiterhin ist das menschliche Uteruscavum für Spermien innerhalb von 10min passierbar [116]. Myometriale Kontraktionen erleichtern die schnelle Spermienaufsteigung. In diesem Kontext ist eine temporäre Spermienimmobilisierung durch endometriales SEMG2 unwahrscheinlich.

4.2.2 SEMG2-Expression im glandulären Epithel

SEMG2 war im GE des Endometriums lokalisiert (Kap. 3.2). Wie auch im LE wurde es zytoplasmatisch und in der zweiten Zyklushälfte stärker exprimiert. Höchstwahrscheinlich ist es ein glanduläres Sekretionsprodukt. Früh- und mittsekreterische Drüsenlumina waren SEMG2-positiv. Glanduläres SEMG2 könnte über Drüsenausführungsgänge in das Uteruscavum gelangen und dort als Dekapazitationsfaktor wirken. Denkbar ist auch, dass aufsteigende Spermien auf zusätzliche weibliche Sekretionsprodukte wie SEMG2 angewiesen sind, um überlebensfähig und fertil zu bleiben.

4.2.3 Quantifizierung der SEMG2-Expression in den Drüsen

Die SEMG2-Expression wurde semiquantitativ im GE untersucht und war in der gesamten zweiten Zyklushälfte deutlich gesteigert (Kap. 3.3). Das Protein könnte in diesem Zeitraum wichtig für eine erfolgreiche Konzeption und Implantation sein. Die EM hatte keinen signifikanten Einfluss auf das glanduläre Expressionsniveau. Möglicherweise spielt das Protein aber eine Rolle bei der Entstehung EM-assoziiierter Infertilität. Die Erkrankung kann mit uteriner Hyper- und Dysperistaltik einhergehen und ein suboptimales, proinflammatorisches Milieu bedingen [3]. Diese Faktoren könnten den Spermien-Epithelzellkontakt und die Interaktion mit SEMG2 beeinträchtigen, sodass mehr Spermien vorzeitig absterben, ohne die Tube zu erreichen.

4.2.4 SEMG2-Expression im Stroma

SEMG2 wurde im endometrialen Stroma exprimiert (Kap. 3.4). Das Protein kann in Zellen aller Keimblätter vorkommen [67]. Stromazellen waren i.d.R. schwächer immungefärbt als Epithelzellen. Die Immunreaktivität war in beiden Gewebekomponenten vergleichbar in Bezug auf Lokalisation, Zyklusphase und EM. Auch hier war die Erkrankung ohne Einfluss. Generell ist umstritten, ob das endometriale Expressionsprofil durch EM entscheidend verändert wird [28]. SEMG2 hat eine hohe Zn^{2+} -Affinität und könnte im endometrialen Stroma die Aktivität Zn^{2+} -abhängiger Proteasen regulieren [77]. In Vorbereitung auf eine Schwangerschaft könnte es zu einer optimalen Geweberezeptivität beitragen, da prädezipualisierte Stromazellen ebenfalls SEMG2-positiv waren.

4.2.5 SEMG2-Expression in Lymphozyten-Aggregaten

SEMG2 kam im Zytoplasma von endometrialen Immunzellen vor, die zu Lymphozyten-Aggregaten angeordnet waren (Kap. 3.5). SEMGs haben antibakterielle und möglicherweise auch immunmodulatorische Eigenschaften [76, 117]. Lymphozyten-Aggregate wurden in der Basalis und Funktionalis EM-negativer und -positiver Probandinnen identifiziert. Zusammen mit SEMG2 könnten sie wichtig für die Pathogenabwehr und Immuntoleranzentwicklung gegenüber aufsteigenden Spermien sein. In der zweiten Zyklushälfte ist der Uterus zugänglich für Spermien und besonders anfällig für Infektionen. Für diesen Zeitabschnitt wurde eine Größenzunahme der Lymphozyten-Aggregate mit Vervielfachung der Zellzahl beschrieben [118].

4.3 SEMG2-Expression bei EMCs und im Endozervix

SEMG2 wurde in Endometrium mit ASR exprimiert (Kap. 3.6). Meist handelt es sich um einen Zufallsbefund in der Kürettage bei unbekannter Frühschwangerschaft oder unbemerktem Abort [119]. Endometriales SEMG2 könnte die Geweberezeptivität

steigern und die Dezidualisierung beschleunigen [120]. Dieser Effekt wurde *in vitro* für SEMG-haltiges Seminalplasma festgestellt.

Das SEMG-Expressionsprofil war bei tuben-ähnlicher epithelialer Endometrium-Veränderung (EMC) verändert. Das Protein wurde in bestimmten Epithelzelltypen und im Stroma nicht exprimiert. Normales Tubengewebe ist ein Kapazitationsort für Spermien und somit möglicherweise komplett SEMG2-negativ. Als Dekapazitationsfaktor könnte SEMG2 beim Übertritt in die Tube von der Spermienoberfläche entfernt werden.

Im Endozervix waren Stroma- und Reservezellen SEMG2-positiv (Kap. 3.6). Das Protein wird i.d.R. ebenfalls im LE exprimiert und ist ein endozervikales Sekretionsprodukt. Es wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Menstruationszyklus im Zervixschleim nachgewiesen. Wie auch im Uteruscavum könnten ascendierende Spermien von der protektiven Wirkung des sekretierten SEMG2 profitieren. Möglicherweise wird es durch endozervikale Kallikreine gespalten [121]. Die dabei entstehenden SEMG-Fragmente könnten sich als Zn^{2+} -*Shuttle* positiv auf die DNA-Integrität der Spermien auswirken [59].

4.4 Probandinnenkollektiv für den SEMG2-ELISA

Der SEMG2-Gehalt wurde in 134 endozervikalen Mukusproben bestimmt. Die Proben stammten von fertilen und infertilen EM-negativen und -positiven Probandinnen und wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Menstruationszyklus entnommen. Es wurden viermal je zwei Vergleichsgruppen anhand von Fertilität, Zyklusphase, EM und HT gebildet.

Die infertile Gruppe umfasste verschiedene Sterilitätsfaktoren. Auch EM kann die Fruchtbarkeit auf unterschiedliche Art und Weise beeinträchtigen [3]. Dies ist aber nicht immer der Fall, weshalb EM-positive Frauen auch in der fertilen Gruppe vertreten waren. Der Altersdurchschnitt in der infertilen Gruppe war im Vergleich zur fertilen Gruppe niedriger. Alle Probandinnen waren in der EM-Sprechstunde vorstellig, aber möglicherweise wird die Erkrankung bei unerfülltem Kinderwunsch im Rahmen der Ursachensuche frühzeitiger abgeklärt. Infertile Probandinnen wurden seltener hormontherapiert. Sie verwendeten i.d.R. keine hormonellen Verhütungsmittel, v.a. wenn die Familienplanung noch nicht abgeschlossen war. Auch bei EM-positiven Infertilen wurde oft auf eine HT verzichtet. Denn alle verfügbaren Hormontherapeutika verzögern die Umsetzung des Kinderwunsches, sodass wertvolle Zeit für natürliche Konzeptionsversuche und ART verloren geht. Wünschenswert wäre eine EM-spezifische HT, die nicht kontrazeptiv ist [3].

Vom Zyklusphasen-spezifischen Vergleich mussten Probandinnen im LZ, mit Amenorrhö und Z.n. LASH ausgeschlossen werden, da eine Zuordnung unmöglich ist.

Hingegen wurden geringfügige inter- und intraindividuelle Zyklusvariationen als physiologisches Phänomen gewertet und einbezogen. Zu eng definierte Einschlusskriterien würden die Übertragbarkeit der Untersuchungsergebnisse auf die Grundgesamtheit erschweren.

Die EM-Patientinnen befanden sich in unterschiedlichen Erkrankungsstadien. Dies wurde durch eine Aufteilung in EM-Untergruppen berücksichtigt. Jeweils zusammengefasst wurden Frauen mit Erstdiagnose, Rezidiv, Z.n. EM-Sanierung mit und ohne Rezidiv. Hormontherapierte Probandinnen waren eher operiert als Nicht-hormontherapierte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine HT oft als EM-Rezidivprophylaxe eingesetzt wird. Nicht signifikant weniger hormontherapierte Probandinnen machten die Angabe Analgetika einzunehmen. Dies verdeutlicht, wie herausfordernd die Schmerztherapie bei EM ist. Trotz HT kann jederzeit eine Befundverschlechterung eintreten. Oft ist eine Kombination aus verschiedenen Therapieansätzen erforderlich. Eingenommen wurden NSAR bis zu Opioiden, da die Schmerzintensität bei EM erheblich variieren kann.

Insgesamt verdeutlichen die gruppenspezifischen Unterschiede, dass das eingeschlossene Probandinnenkollektiv repräsentativ war für infertile und fertile, EM-negative und -positive Probandinnen aus beiden Zyklushälften.

4.5 Analyse der SEMG2-Konzentration in endozervikalen Mukusproben

SEMG2 war in Mukusproben infertiler und fertiler, EM-negativer und -positiver Probandinnen aus beiden Zyklushälften nachweisbar (Kap. 3.10). Die sexuelle Aktivität der Probandinnen wurde nicht gezielt abgefragt, aber eine Probenkontamination durch SEMG-haltiges Seminalplasma ist keine plausible Erklärung für dieses Ergebnis. Seminalplasma kann mit ausfließendem Zervixschleim in Kontakt kommen, aber es wird nur vorübergehend im hinteren Scheidengewölbe deponiert [116]. Die Probenentnahme erfolgte direkt aus dem Zervikalkanal. Zudem liegt die endozervikale SEMG2-Konzentration im pg/ml-Bereich, wohingegen der SEMG-Gehalt im Seminalplasma um ein Vielfaches höher bei einigen mg/ml liegt. SEMG2 ist höchstwahrscheinlich ein uterines Sekretionsprodukt aus dem Endometrium und Endozervix. Die Hypothese, dass SEMGs nur in Form von Spermien-gebundenen Spaltprodukten in den weiblichen Reproduktionstrakt gelangen, ist nicht haltbar. Wie auch im Endometrium könnte SEMG2 im Endozervix einen Spermien-protectiven Effekt als Dekapazitationsfaktor haben. Eine dekapazitierende Wirkung wurde für 1/300 der SEMG-Konzentration im Seminalplasma beschrieben, aber möglicherweise hält diese *in vivo* auch bei geringeren Konzentrationen an [63]. Denkbar ist, dass endozervikales SEMG2 durch ortsständige KLK fragmentiert wird [121]. Die dabei entstehenden Spaltprodukte könnten ebenfalls

einen positiven Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Spermien haben und die Chancen auf eine erfolgreiche Aszension in Richtung Eileiter erhöhen. Ein abweichender SEMG2-Gehalt im Zervixschleim könnte zu einem suboptimalen Milieu im weiblichen Reproduktionstrakt beitragen und mit Subfertilität einhergehen [122].

In den endozervikalen Mukusproben waren niedrigere SEMG2-Konzentrationen mit Infertilität assoziiert (Tab. 9 A). Bei sinkendem SEMG2-Gehalt könnten die Spermienprotektiven Effekte entfallen, sodass weniger oder bereits geschädigte Spermien in das Uteruscavum gelangen. Bei Männern hingegen führen höhere SEMG-Konzentrationen zu Infertilität [123]. Dies liegt daran, dass SEMGs bei Ejakulation im männlichen Genitaltrakt und Vaginalkanal deutlich stärker konzentriert sind und an diesen Orten primär als gelformierende Motilitätsinhibitoren fungieren. Im Endozervix und wahrscheinlich auch im Uteruscavum werden diese Konzentrationen nicht erreicht. Wie bereits beschreiben, stehen hier andere Funktionen im Vordergrund, sodass sich ein gegenteiliger Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Fertilität ergibt.

Der SEMG2-Gehalt war in sekretorischen Mukusproben signifikant höher als in Proben, die während der Proliferationsphase entnommen wurden (Tab. 9 B). Der Phasenspezifische Konzentrationsunterschied im Zervixschleim passt zum erhöhten Expressionsniveau des Proteins im sekretorischen Endometrium. In diesem Zeitraum können Spermien den Zervixschleim passieren und kommen dabei mit weiblichen Sekretionsprodukten wie SEMG2 in Kontakt [101]. Das Protein könnte in beiden uterinen Gewebeabschnitten wichtig für die weibliche Empfänglichkeit und Konzeptionsfähigkeit der Spermien sein.

Der Zusammenhang zwischen endozervikaler SEMG2-Konzentration und Fertilität wurde durch den Zeitpunkt der Probenentnahme beeinflusst. Deswegen wurden infertile und fertile Proben aus der Proliferations- bzw. Sekretionsphase gegenübergestellt (Tab. 9 C – D). In beiden Zyklushälften war die SEMG2-Konzentration bei fertilen Probandinnen höher, aber nur in der Sekretionsphase war dieser Unterschied signifikant. Möglicherweise entfaltet sich die für die Fruchtbarkeit wichtige, Spermienprotektive Wirkung des Proteins im sekretorischen Endozervix erst bei ausreichend hoher Konzentration.

EM kann das Zervixschleim-Proteom beeinflussen [32]. Die Erkrankung hatte aber keinen signifikanten Effekt auf den endozervikalen SEMG2-Gehalt (Tab. 9 C). Vergleichbares wurde in Bezug auf die SEMG2-Expression im Endometrium festgestellt. Auch EM-spezifische Schmerzsymptome hatten keinen Einfluss auf die SEMG2-Konzentration im Zervixschleim (Tab. 9 G – J). EM hat höchstwahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf die Expression und Sekretion des Proteins im weiblichen Genitaltrakt.

Eine HT kann die Mukusviskosität und -qualität verändern, weshalb ein Vergleich zwischen Nicht-Hormontherapierten und Hormontherapierten vorgenommen wurde. HT war kein Einflussfaktor für die endozervikale SEMG2-Konzentration (Tab. 9 D).

Eine Vorstudie für einen diagnostischen Fertilitätstest bei EM-Sprechstundenpatientinnen aus der zweiten Zyklushälfte wurde durchgeführt, weil es einen deutlichen SEMG2-Konzentrationsunterschied zwischen infertilen und fertilen sekretorischen Mukusproben gab. Durch eine Gegenüberstellung der Einzelwerte und ROC-Analyse wurde die optimale SEMG2-Grenzkonzentration zur Differenzierung zwischen infertilen und fertilen Probandinnen aus der Sekretionsphase ermittelt (Abb. 17, Tab. 10). Bei einer SEMG2-Konzentration von 330,5 pg/ml wurde die beste Trennschärfe mit einer Sensitivität von 72% und Spezifität von 68% erreicht. Als prävalenzunabhängige Maßzahl für die Aussagekraft des diagnostischen Tests lag die positive LR mit 2,26 in einem akzeptablen Bereich. Entsprechend war ein positives Testergebnis bei Infertilität 2,26 x wahrscheinlicher als bei Fertilität (Tab. 11). Ursächlich für das ausschließlich akzeptable Abschneiden der SEMG2-Fertilitätstestung ist, dass die weibliche Fruchtbarkeit durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Alleine im Endozervix sind neben SEMG2 viele weitere Proteine für eine optimale Spermienpassage wichtig. Der SEMG2-Grenzwert könnte zu Gunsten einer höheren Sensitivität angehoben werden. Ein falsch-negatives Testergebnis im Sinne einer nicht entdeckten Infertilität hätte deutlich schwerwiegendere Konsequenzen, da wertvolle Zeit für fertilitätsverbessernde Maßnahmen verloren geht. Ein positiver Test sollte dann aber lediglich als Infertilitätsverdacht gewertet werden und eine ausführlichere Abklärung der Fruchtbarkeit zur Folge haben.

SEMG2-haltige endometriale Sekretionsprodukte könnten durch den Zervikalkanal abfließen. Eine solche Kontamination der Mukusproben ist aber unwahrscheinlich, da das Protein auch bei Probandinnen mit Z.n. LASH, also mit Zervixstumpf ohne restlichen Uterus, im üblichen Konzentrationsbereich nachweisbar war.

4.6 Probandinnenkollektiv für die CNN1-Immunhistochemie

Für die CNN1-Untersuchung wurden uterine Gewebeproben von jeweils 31 Probandinnen mit AM eingeschlossen und immunhistochemisch analysiert. Eine gezielte AM-Nachuntersuchung wurde durchgeführt, weil die Erkrankung im Rahmen der pathologischen Routinediagnostik oft nur zufällig entdeckt wird [6]. Erschwerend kommt hinzu, dass in 1/3 der Fälle klinische Anhaltspunkte fehlen und es keine AM-spezifische Symptomatik gibt und diese oft mit EM-Symptomen überlappt [12, 40]. Je ausführlicher aber die Suche, desto mehr AM-Läsionen lassen sich identifizieren. Laut Bird et al. kann die Prävalenz der Erkrankung durch zusätzliche Schnittuntersuchungen verdoppelt

werden [5, 21]. Im klinischen Alltag ist die dafür erforderliche Schnittanzahl jedoch nicht zu bewältigen, sodass viele Fälle übersehen werden [124]. Für Hysterektomie-Patientinnen hat dies keine Konsequenzen, weil mit der Uterusentfernung auch der Manifestationsort der AM beseitigt wird. Bei einzelnen Probandinnen konnte die Diagnose nicht verifiziert werden, da die archivierten Proben keine AM-Läsionen beinhalteten. Dies ist höchstwahrscheinlich auf eine fokale Verteilung der Erkrankung zurückzuführen, sodass diese Frauen weiterhin als AM-positiv gewertet wurden. Aus demselben Grund konnten im Rahmen der systematischen Nachuntersuchung zusätzliche Erkrankungsfälle identifiziert werden. Sie basierte auf der gebräuchlichsten histopathologischen AM-Definition mit einem auf 2,5mm festgelegten Läsionsabstand zwischen der tiefsten Stelle der JZ und dem oberflächlichsten AM-Herd [6]. Dieser ist willkürlich und z.T. uneinheitlich festgelegt, um eine Überdiagnostik zu vermeiden [125]. Ausgehend von der Invaginationstheorie nach Cullen entsteht die Erkrankung graduell [38]. Es ist aber unklar, ab wann eine AM vollständig etabliert ist und ob dies überhaupt mit einer bestimmten Eindringtiefe zusammenhängt. In diesem Kontext könnte ein AM-spezifischer, immunhistochemischer Marker hilfreich sein. Bei den AM-positiven Probandinnen wurde in Übereinstimmung mit der Literatur eine hohe EM- und Leiomyom-Koinzidenz festgestellt, weshalb man von einer repräsentativen Stichprobe ausgehen kann [12]. Dementsprechend waren EM-spezifische Symptome und AUB zum Zeitpunkt der Probenentnahme regelhaft vertreten.

4.7 Analyse der CNN1-Expression im humanen Uterusgewebe

Für ein besseres Verständnis der AM-Pathogenese wurde die CNN1-Expression in Uterusproben von AM-positiven Probandinnen untersucht. In den meisten Proben war das Endometrium nur unvollständig erhalten. Dies wurde akzeptiert, weil die Proteinexpression schwerpunktmäßig in AM-Herden analysiert wurde, sowie in Basalis und endomyometrialen Übergang als mutmaßlichem Ausgangspunkt der Erkrankung. Eine Stärke dieser Untersuchung ist, dass CNN1-positive Gewebebereiche zusätzlich mit einem Drüsen- und Stroma-spezifischen Marker untersucht wurden und weiterhin, dass auch zystisch dilatierte Drüsen, sogenannte *occluded glands* eingeschlossen wurden. Nicht beinhaltet waren Fälle von externer, Serosa-naher AM, bekannt als *fokale AM des äußeren Myometrium* (FOAM), da hier evtl. ein anderer TIE-ähnlicher Pathomechanismus zugrunde liegt [126].

4.7.1 CNN1-positive Myofibroblasten

Das endometriale Stroma beinhaltet verschiedene Zelltypen, darunter Fibro- und Myofibroblasten, glatte Muskelzellen, Perizyten und Immunzellen [94]. CNN1 wird als

Aktinfilament-assoziiertes, regulatorisches Protein nicht nur in glatten Muskelzellen, sondern auch in Myofibroblasten exprimiert [81]. Dabei handelt es sich um eine zelluläre Übergangsform zwischen glatten Muskelzellen und Fibroblasten, die in den 1970ern von Gabbiani et al. im Rahmen der Wundheilung identifiziert wurden [127, 128]. Im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass Myofibroblasten in nahezu jedem Gewebetyp als reaktive Zellen entstehen können [129]. Durch die myometriale Peristaltik wird auch das Endometrium während des gesamten Menstruationszyklus mechanischem Stress ausgesetzt. Hier sind die Myofibroblasten für den Erhalt der normalen Myometrium-Architektur und -Funktion notwendig [130]. Vergleichbar zu Fibroblasten können sie EZM produzieren. Zugleich haben sie wie Myozyten kontraktile Eigenschaften zur Stabilisierung der Gewebestruktur und Adaption der Wundränder bzw. Minimierung der Verletzungsfläche. Sie vereinen somit die Eigenschaften beider Zelltypen [129]. Lichtmikroskopisch sind die ebenfalls spindelförmigen Myofibroblasten nicht von Fibroblasten zu unterscheiden. Auch wenn es keine Myofibroblasten-spezifischen Marker gibt, können diese Zellen durch Expression von Proteinen wie CNN1 immunhistochemisch von anderen Stromazellen abgegrenzt werden [131]. Endgültige Gewissheit bietet eine ultrastrukturelle, elektronenmikroskopische Analyse [132].

4.7.2 CNN1 in der Funktionalis und unterhalb des luminalen Epithels

Das LE und alle Funktionalis-Drüsen waren CNN1-negativ (Kap. 3.13). Das Protein kommt v.a. in mesenchymalen Zellen vor [79]. CNN1-positive Stromazellen wurden in der Funktionalis v.a. direkt unterhalb des LE nachgewiesen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Myofibroblasten, nicht aber um glatte Muskelzellen, da das CNN1-positive Stroma im Folgeschnitt ebenfalls CD10-positiv war. Möglicherweise kommt es direkt unterhalb des LE zu einer größeren Stresseinwirkung als in der restlichen Funktionalis. CNN1 kann die zytoskelettale Spannung durch Bündelung, Vernetzung und somit Stabilisierung von Aktin-Stressfasern regulieren. Denkbar ist, dass dies vergleichbar zur zweiten Isoform des Proteins mechanotransduktiv, in Abhängigkeit von der extrazellulären Rigidität, geschieht [79]. In tieferen Funktionalis-Bereichen wurde in Einzelfällen eine fokale und oder periglanduläre CNN1-Stromafärbung beobachtet. Diese Stroma- bzw. Drüsenabschnitte könnten geringfügig erhöhtem Stress ausgesetzt sein. Vergleichbar zur Expression ASMA-positiver, endometrialer Stromazellen könnte das periglanduläre CNN1-Expressionsmuster ein Zeichen für eine mechanische Belastung der jeweiligen Drüsenabschnitte sein [133].

4.7.3 CNN1 in der Basalis

Die Basalis-Drüsenmorphologie unterschied sich deutlich von den Drüsen der Funktionalis, aber auch hier war das GE CNN1-negativ (Kap. 3.14). In der Basalis war CNN1-positives Stroma am häufigsten nachweisbar. Es wurden vier verschiedene, z.T. kombiniert auftretende Expressionsmuster identifiziert: (fokal) homogen, periglandulär, perivaskulär und fibrillär. Das subendometriale Myometrium ist während des gesamten Menstruationszyklus Ausgangspunkt von Kontraktionen, beispielsweise um uterinen Ausfluss, Spermientransport oder eine fundusnahe Implantation zu erleichtern [134]. Dadurch wird die darüberliegende basale Schleimhaut konstantem Stress ausgesetzt. Es findet eine kontinuierliche Umwandlung basaler Stromazellen in Myofibroblasten und zurück statt [135]. Dieser reversible Transformationsprozess könnte je nach Stresslevel bedarfsgerecht in Richtung Fibro- oder Myofibroblast erfolgen, um Schleimhauttraumatisierungen zu minimieren. Es ist naheliegend, dass CNN1-positive, basale Stromazellen Myofibroblasten waren. Das Protein könnte die Aktin-Stressfaserformation erleichtern und dadurch Zytoskelett und EZM der unmittelbaren Umgebung stabilisieren [79].

Myofibroblasten entstehen v.a. aus lokalen Fibroblasten. Dieser Vorgang wird als Fibroblast-Myofibroblast-Transdifferenzierung (FMT) bezeichnet. FMT kann über den TGFbeta1/Smad-Signalweg und Mechanotransduktion vermittelt werden [129]. Auch die CNN1-Expression in Myofibroblasten kann TGFbeta1-induziert sein und evtl. ähnlich zu CNN2 stressbedingt erfolgen [79, 87]. FMT macht das fokal homogene und periglanduläre CNN1-Expressionsmuster in der Basalis nachvollziehbar. Das Protein könnte auf diese Weise Gewebereiche anzeigen, die unter mechanischer Belastung stehen. Vergleichbares wurde im Zusammenhang mit der basalen ASMA-Expression gemutmaß [133].

Bei der periglandulären CNN1-Expression wurden subtile Unterschiede in Bezug auf Dicke und Vollständigkeit der Immunfärbung festgestellt. Diese Variationen und auch das fokale Expressionsmuster deuten darauf hin, dass sich die mechanische Belastung möglicherweise nicht gleichmäßig auf die Basalis verteilt und es abschnittsweise Unterschiede gibt. Je ausgeprägter und intensiver die CNN1-Immunfärbung, desto höher könnte das Stresslevel sein. Myofibroblasten können in geringerem Ausmaß auch aus anderen Zelltypen wie Perizyten und zirkulierenden Knochenmark-Fibrozyten differenziert werden [129, 136]. Auf diese Weise könnte das perivaskuläre CNN1-Expressionsmuster entstehen, das ausschließlich in der Basalis beobachtet wurde. Auch die Umwandlung glatter Muskelzellen in Myofibroblasten wurde beschrieben und könnte das fibrilläre, Myometrium-nahe CNN1-Expressionsmuster im basalen Stroma bedingen

[129]. Alle vier stromalen CNN1-Expressionsmuster kamen nur in der Basalis vor und waren hier stärker als in anderen Uterusbereichen ausgeprägt. Dies könnte auf ein hohes FMT- und Metaplasie-Potential der Basalis hindeuten [135]. Alle CNN1-positiven Stromazellen waren auch CD10-positiv und somit keine Muskelzellen.

Beachtet werden sollte, dass ausschließlich Gewebeproben von Probandinnen mit AM untersucht wurden. Ausgangspunkt der Erkrankung ist höchstwahrscheinlich das basale Endometrium. Dafür gibt es zahlreiche Anhaltspunkte, wie z.B. identische KRAS-Mutationen in Endometrium- und AM-Drüsen sowie Kontinuitätsnachweise in Serienschnitten, mit 3D-Rekonstruktion und Chromopertubationsfarbstoff [21–23]. Die von der Basalis ausgehende Invasion in das Myometrium könnte durch Gewebetraumatisierungen erleichtert werden, einhergehend u.a. mit Hypoxie-bedingter TGFbeta-Produktion durch Drüsen- und Stromazellen. [41]. TGF-beta wiederum könnte ursächlich für die Rekrutierung und möglicherweise Persistenz zahlreicher CNN1-positiver Myofibroblasten in der Basalis sein. Myofibroblasten persistieren in fibrotischem Gewebe bei abnormer Wundheilung [129]. CNN1-positive Basalis-Myofibroblasten könnten eine Präventionsmaßnahme bei erhöhtem Gewebestress sein. Wie bereits erwähnt, kann das Protein an einer Umstrukturierung des Zytoskeletts beteiligt sein und auf diese Weise die Widerstandsfähigkeit des Gewebes erhöhen. Eine CNN1-Überexpression in Zellkulturen mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten war mit einer reduzierten Proliferationsrate assoziiert und in Übereinstimmung hiermit wird das Protein beim Übergang aus der G₀- in die G₁-Zellzyklusphase herunterreguliert [81]. Die stabilisierenden und antiproliferativen Eigenschaften von CNN1 könnten dazu beitragen, dass eine Zellmigration in Richtung Myometrium verzögert oder erschwert wird [87].

4.7.4 CNN1 im endomyometrialen Übergang

Beobachtet wurde, dass der Verlauf des endomyometrialen Übergangs bei AM-Erkrankten irregulär ist [12, 21]. Übereinstimmend verlief dieser bei den eingeschlossenen Probandinnen mit AM undulierend (Kap. 3.15). Stellenweise reichte das Endometrium in das subendometriale Myometrium in Sinne einer beginnenden Schleimhautinvagination. Die Verbindung zur darüberliegenden Basalis war schnittbedingt nicht immer sichtbar. Dementsprechend wurden diese nur scheinbar isoliert im oberflächlichen Myometrium gelegenen Endometrium-Herde als Bestandteil des Übergangsbereichs gewertet. Es wurde beschrieben, dass insbesondere Bereiche entlang der Radialarterien ohne schützende Submukosa für die Myometriuminvasion prädestiniert sind [23, 137]. In den von uns identifizierten Invaginationsstellen waren meist ebenfalls größere Gefäße lokalisiert.

Im Gegensatz zu Funktionalis und Basalis wurden im endomyometrialen Übergang CNN1-positive Drüsen nachgewiesen. Das Protein wird i.d.R. in glatten Muskelzellen und Myofibroblasten exprimiert. Unter bestimmten Umständen kann es aber auch in polarisierten, TJ-haltigen Zellen vorkommen. Im fibrotischen Lungengewebe wurde es in HPMC-Zellen entdeckt, was als Anzeichen für eine Differenzierung dieser Zellen zu Myofibroblasten im Rahmen eines EMT-ähnlichen Prozesses gewertet wurde [87]. Bei EM-positiven Pferden wurde es in Endometrium-Drüsen exprimiert. Hier wurde die glanduläre CNN1-Immunfärbung als „inkomplette myoepitheliale Differenzierung“ interpretiert [91]. Myoepithelzellen liegen unterhalb des GE und erleichtern durch ihre kontraktile Aktivität den Sekrettransport in den Drüsen [138]. Solche Zellen waren im humanen Endometrium aber nicht sichtbar. Um das Phänomen bei Frauen mit AM und beginnender AM besser zu verstehen, wurden alle CNN1-positiven Drüsen in Folgeschnitten untersucht. Sie exprimierten immer auch das TJ-Protein Claudin3. Dies deutet daraufhin, dass die Polarität der glandulären Epithelzellen erhalten bleibt und es hier zu keinem Zell-Zell-Kontakt-Verlust kommt [97]. EMT ist ein Vorgang bei dem epitheliale Marker herunter- und mesenchymale Marker hochreguliert werden. Es kommt zu einem Polaritäts- und Zell-Zell-Kontakt-Verlust. Solche zellulären Phänotyp-Wechsel können z.B. bei Wundheilung und Metastasierung auftreten und eine erhöhte Zellmotilität begünstigen [8]. CNN1 hemmt aber die zelluläre Motilität. Möglicherweise wird das mesenchymale Protein im GE aber im Rahmen einer partiellen EMT vom Typ2 ohne Verlust des epithelialen Phänotyps produziert. EMT kann ein mehrschrittiger Prozess mit Zwischenstadien sein. Typ2 wird u.a. bei Gewebsverletzungen induziert und solche Bedingungen könnten bei AM mit invasivem Einwachsen in das Myometrium vorliegen [8, 41]. Eine partielle EMT könnte im Rahmen von Reparationsmechanismen eine Rolle spielen.

Im endomyometrialen Übergang wurden die stromalen Expressionsmuster meist seltener als in der Basalis oder AM-Herden erfasst. Evtl. gibt es hier weniger Myofibroblasten oder CNN1 wird in diesen herunterreguliert oder teils nicht exprimiert. Denkbar ist, dass bereits invaginiertes, einwachsendes Gewebe im Vgl. zu anderen Bereichen einer geringeren mechanischer Belastung ausgesetzt ist. Ist CNN1 herunterreguliert, könnte der inhibitorische Effekt des Proteins auf Zellproliferation und -migration entfallen [79, 87]. Dies könnte die Endometrium-Invasion ins Myometrium und die AM-Entstehung erleichtern. Im Rahmen der Gewebetraumatisierung und -invagination werden Muskelfasern auseinandergedrängt [41]. Dadurch wird auch das interfazikuläre Bindegewebe gestresst, in dem zahlreiche Myofibroblasten enthalten sein können [139]. Diese könnten das fibrilläre Expressionsmuster im endomyometrialen Stroma-Randbereich bedingen.

4.7.5 CNN1 in Adenomyose-Herden

3D-Rekonstruktionen haben gezeigt, dass AM im Myometrium ein von Stroma umgebenes labyrinthartiges Netzwerk bildet [23]. In der konventionellen Schnittuntersuchung bleiben diese netzwerkartigen Verbindungen zwischen den AM-Herden oft verborgen. Die AM-Drüsenarchitektur ähnelte mit ihrem horizontalen, z.T. verzweigtem Verlauf der von Basalis-Drüsen (Kap. 3.17). Dies wird als ein weiteres Indiz für eine Endometrium-Invasion ins Myometrium gewertet [21]. CNN1-positive Drüsen kamen in AM-Herden häufiger als im endomyometrialen Übergang vor. Das Protein war in beiden Gewebebereichen im Zytoplasma des GE lokalisiert. Die CNN1-Expression in AM-Drüsen könnte ebenfalls durch eine partielle EMT bei erhöhter mechanischer Belastung verursacht werden. Hierfür spricht, dass 2/3 der CNN1-positiven Drüsen sogenannte *occluded glands* waren. Diese blind endenden Drüsen werden im Vergleich zu anderen Abschnitten des glandulären Netzwerks besonders stark gestresst. Hier kommt es zur Ansammlung glandulärer Sekretionsprodukte, sodass sich der intraluminale Druck erhöht und die Drüse zystisch dilatiert [23]. Wie auch im endomyometrialen Übergang bleibt der epitheliale Phänotyp bei allen CNN1-positiven AM-Drüsen erhalten. Sie waren im Folgeschnitt ebenfalls Claudin3-positiv, aber das membranständige Protein wurde zytoplasmatischer als im endomyometrialen Übergang exprimiert. Im ektopen, adenomyotischen Endometrium könnte es zu Veränderungen nach wie vor erhaltener Zell-Zell-Kontakte im Sinne eines fortgeschritteneren EMT-Zwischenstadiums kommen. Anzeichen für eine vollständige EMT gab es aber auch hier nicht. Die EMT scheint für das invasive Drüsenwachstum in das Myometrium nicht zwingend erforderlich zu sein. Ansonsten würde das abweichende Claudin3-Expressionsmuster bereits im endomyometrialen Übergang und nicht erst in etablierten AM-Herden auftreten. Andererseits ist unklar, ob CNN1 überhaupt ein geeigneter EMT-Marker ist oder nur reaktiv zur Stabilisierung des epithelialen Zytoskeletts exprimiert wird. Zu EMT kommt es u.a. bei Wundheilung und Metastasierung. Im Gegensatz dazu ist eine erhöhte CNN1-Expression mit verringerter Zellmotilität und Tumorsuppression assoziiert [8, 79].

Die glanduläre CNN1-Expression war in humanen Uterusproben auf endomyometriale und AM-Herde beschränkt, sodass das Phänomen genauer untersucht wurde. Proben mit und ohne CNN1-positive Drüsen wurden gegenübergestellt und in Bezug auf Alter, Zyklusphase, HT, Fertilität sowie Vorhandensein von EM, Leiomyomen und EM-spezifischen Symptomen verglichen. Bei EM-positiven Probandinnen kamen CNN1-positive Drüsen signifikant häufiger vor, während bei allen anderen Merkmalsausprägungen kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Es ist unklar,

ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der glandulären CNN1-Expression und einer EM-Koinzidenz bei AM gibt. Das Protein wurde auch in Endometrium-Drüsen EM-positiver Pferde und im Stroma humaner EM-Herde nachgewiesen [91, 140]. CNN1 könnte also bei AM und EM eine Rolle spielen.

Adenomyotisches und basales Stroma waren vergleichbar. In keiner der AM-haltigen Proben war es sekretorisch transformiert. Dies war auch der Fall, wenn die Proben in der zweiten Zyklushälfte entnommen wurden. AM-Läsionen nehmen i.d.R nicht am Zyklusgeschehen teil, nur selten wurden sekretorische Veränderungen beschrieben [125]. Sie sind von glatten Muskelzellen des Myometriums umgeben und könnten auf diese Weise mechanischem Stress ausgesetzt sein. Dementsprechend wurde im AM-Stroma wie auch im endomyometrialen Übergang in absteigender Häufigkeit ein homogenes, periglanduläres und fibrilläres CNN1-Expressionsmuster beobachtet. Die homogene Immunfärbung war in einigen AM-Herden vollständig und in anderen wiederum nur fokal mit CNN1-negativen Stromazellen. Möglicherweise basieren diese Unterschiede auf einer variierenden mechanischen Belastung durch das angrenzende Myometrium, in Abhängigkeit von der jeweiligen Läsionsform und den z.T. erheblichen Größenunterschieden zwischen diesen. In AM-Herden wurde eine periglanduläre CNN1-Immunfärbung um CNN1-negative und -positive Drüsen nachgewiesen. Vorstellbar ist, dass solche Drüsen stärker belastet werden und dies durch die Immunfärbung sichtbar gemacht wird. Die fibrilläre, Muskelfaser-ähnliche CNN1-Immunfärbung wurde v.a. im Randbereich der AM-Herde nachgewiesen. Hier gibt es keinen klar abgrenzbaren Übergang zum normalen Myometrium, aber auch diese CNN1-positiven Stroma-Bereiche war im Folgeschnitt CD10-positiv und somit Myozyten-frei. Eventuell kommt es in diesen Randbereichen zu einer Umwandlung der adenomyotischen Stromazellen zu Myozyten.

4.7.6 CNN1 in weiteren uterinen Gewebekomponenten

CNN1 wurde auch in glatten Muskelzellen des Myometriums und in Perizyten nachgewiesen und ist dort höchstwahrscheinlich Bestandteil des kontraktilen Apparats. (Kap. 3.13, 3.16) In zu Lymphozyten-Aggregaten angeordneten Immunzellen des Endometriums spielt es keine Rolle (Kap. 3.14).

4.7.7 CNN1 in Sonderfällen

Atrophe AM-Herde treten perimenopausal und HT-induziert auf [141]. Hier war die CNN1-Färbeintensität schwächer als bei nicht-atrophen Herden. Möglicherweise nimmt die mechanische Belastung auf das ektope Gewebe im Rahmen des Atrophie-bedingten Rückgangs der Läsionsgröße ab.

In 10-20% der AM-Uteri sind Fälle von intravaskulärer AM mit Stroma in myometrialen Gefäßen nachweisbar [109, 142]. Auch in den analysierten Uterusproben wurden intravaskuläre AM-Herde identifiziert (Kap. 3.17). Es wird vermutet, dass perivaskuläres AM-Stroma in das Gefäßlumen vordringt [109]. Sowohl das intra- als auch das extraluminale AM-Stroma waren kaum CNN1-positiv. Wird das Protein in Stromazellen herunterreguliert, können Zellmotilität und -migration begünstigt werden [79]. Bei EM wird eine vaskuläre Dissemination in Einzelfällen uterusferner Erkrankungsfälle für möglich gehalten [17]. Auch bei AM ist eine Ausbreitung über das uterine Gefäßsystem zusätzlich zum Hauptausbreitungsmechanismus durch Gewebeinvasion denkbar, aber eher unwahrscheinlich [143]. Fraglich ist, ob es auch zu einer systemischen Ausbreitung kommt und AM-Herde somit per definitionem zu EM-Herden werden oder umgekehrt. AM und EM könnten enger miteinander verflochten sein als bisher angenommen. Ein auf getrennten Erkrankungsdefinitionen basiertes Denken könnte ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen erschweren.

5 Zusammenfassung

Ein genaueres reproduktionsmedizinisches Verständnis könnte mehr natürliche Konzeptionen ermöglichen. Seminalplasma-Proteine werden auch im weiblichen Gewebe exprimiert. Semenogelin2 (SEMG2), ein vorherrschendes Protein im Ejakulat, wurde im humanen Endometrium zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Menstruationszyklus immunhistochemisch nachgewiesen. Bisher wurde angenommen, dass ausschließlich Spermien-gebundene SEMG-Fragmente aus dem männlichen Genitaltrakt in den Uterus gelangen. Dies ist nicht länger haltbar. Ein in der Sekretionsphase signifikant erhöhtes glanduläres SEMG2-Expressionsniveau sowie SEMG2-haltige Pinopoden und Drüsenlumina deuten darauf hin, dass „weibliches SEMG2“ ein endometriales Sekretionsprodukt ist. Es könnte vergleichbar zu SEMG-Fragmenten als protektiver Dekapazitationsfaktor mit aufsteigenden Spermien interagieren. Ein niedriger SEMG2-Gehalt in endozervikalen Mukusproben aus der Sekretionsphase war mit Infertilität korreliert und eignet sich bedingt zur Infertilitätstestung. Spermien-protektive Funktionen des Proteins könnten bei niedrigen Konzentrationen entfallen. SEMG2 trägt höchstwahrscheinlich zu einer optimalen Konzeptionsfähigkeit bei. Die endometriale SEMG2-Expression und der SEMG2-Mukusgehalt wurden durch Endometriose nicht beeinflusst.

Ein besseres pathophysiologisches Verständnis könnte die Diagnostik und Therapie der Adenomyose (AM) verbessern. Immunhistochemisch wurde die Calponin1 (CNN1) Expression im Uterusgewebe AM-positiver Probandinnen untersucht. CNN1-positives Stroma war in Folgeschnitten CD10-positiv und im Endometrium fast ausschließlich in der Basalis sowie im endomyometrialen Übergang und AM-Herden nachweisbar. Das Protein zeigt im Stroma höchstwahrscheinlich Myofibroblasten-haltige Gewebereiche an. Diese sind an der Regeneration des Endometriums beteiligt und werden an Orte mit erhöhtem mechanischem Stress rekrutiert, um die normale Gewebearchitektur zu erhalten. Verschiedene CNN1-Expressionsmuster im Stroma sind hinweisgebend auf eine unterschiedliche Abstammung der Myofibroblasten. Die stromale CNN1-Expression könnte eine Reaktion auf einwachsendes Endometrium bei Adenomyose sein. CNN1- und Claudin3-positive Drüsen wurden v.a. in AM-Herden und vereinzelt im endomyometrialen Übergang bei den „occluded glands“ beobachtet. Diese sind erhöhtem mechanischen Stress ausgesetzt. Claudin3 war in CNN1-positiven AM-Drüsen zum Teil zytoplasmatisch lokalisiert, aber der epitheliale Phänotyp blieb erhalten. Eine partielle EMT könnte in AM-Herden, nicht aber bei der Erkrankungsentstehung, eine Rolle spielen.

6 Summary

A better understanding of reproductive principles could enable more natural pregnancies. Seminal plasma proteins are also expressed in female tissues. Semenogelin2 (SEMG2), a predominant protein in semen, was immunohistochemically detected in the human endometrium throughout the menstrual cycle. It was assumed that only sperm-bound SEMG-fragments reach the uterus, but this is no longer viable. An increased expression level of SEMG2 in secretory glands and SEMG2-containing glandular lumina as well as pinopodes indicate that the 'female SEMG2' is a secretory product. It might interact with ascending spermatozoa as a protective decapacitation factor. A low content of SEMG2 in secretory mucus samples was correlated with infertility and could be useful for infertility testing. It is possible that sperm protective features of the protein no longer apply at a certain concentration range. SEMG2 most likely contributes to an optimal female microenvironment so that a successful conception can take place. The endometrial expression of SEMG2 and the mucus concentration of SEMG2 were not influenced by endometriosis.

A better pathophysiological understanding of adenomyosis might improve the diagnostic procedures and therapy of the disease. The Calponin1 (CNN1) expression was investigated in uterine tissues from patients with adenomyosis by immunohistochemistry. CNN1-positive stroma was CD10-positive in serial sections. In the endometrium it was almost exclusively found in the basalis, and it was present in the endomyometrial junction and in foci of adenomyosis. CNN1 might be indicative of tissue areas that contain myofibroblasts. This cell type is involved in the regeneration of the endometrium, and it is recruited into areas that are subjected to increased mechanical stress to maintain the tissue architecture. Different expression patterns of CNN1 point to multiple origins of myofibroblasts. The stromal expression of CNN1 could be a response to the invagination of the endometrium into the myometrium that takes place in adenomyosis. CNN1- and Claudin3-positive glands were observed in foci of adenomyosis and occasionally in the endomyometrial junction. Especially occluded glands were immunoreactive for CNN1 and they are most likely exposed to more stress than other glands. In some cases, the tight junction protein Claudin3 was also located in the cytoplasm of CNN1-positive adenomyotic glands. Nonetheless the epithelial phenotype was preserved. A partial EMT might occur in adenomyotic foci but not in early stages of the disease.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM	Adenomyose
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
ARS	Arias Stella Phänomen
ART	Assistierte Reproduktionstechnik
ASMA	Alpha Smooth Muscle Actin
AUB	Abnorme Uterine Blutungen
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Aqua dest.	Aqua destillata
ART	Assisted Reproductive Technologies
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CNN1	Calponin1
CTA	Krebs-Hoden-Antigen
DAB	Diaminobenzidin
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DNG	Dienogest
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EEL	Europäische Endometriose Liga
EFI	Endometriose-Fertilitäts-Index
ELISA	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay
EM	Endometriose
EMC	Metaplasie-artige Epitheliale Veränderung
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EPPIN	Epididymal Peptidase Inhibitor
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Endocrinology
EUG	Extrauterin gravidität
evtl.	eventuell

Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

EZM	Extrazellulärmatrix
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d' Obstétrique
FMT	Fibroblast to Myofibroblast Transdifferentiation
FOAM	Focal Adenomyosis of the Outer Myometrium
GE	Glanduläres Epithel
GL	Drüse bzw. Drüsenanschnitt
GnRHa	Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonist
GSR	Gland Stroma Ratio
h	Stunde
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	heat induced epitope retrieval
HPMC	Human Peritoneal Mesothelial Cell
HRP	Horseradish Peroxidase
HSCORE	Histological Score
HT	Hormontherapie
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision
i.d.R.	in der Regel
i.S.	im Sinne
IHC	Immunhistochemie
IUI	Intrauterine Insemination
IUP	Intrauterinpessar
IVF	In-vitro-Fertilisation
JZ	Junktionszone
kDa	Kilodalton
KLK	Kallikrein
KM	Knochenmark
KOK	Kombiniertes Orales Kontrazeptivum
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus Gen
LASH	Laparoskopisch Assistierte Suprazervikale Hysterektomie
LE	Luminales Epithel
Lig.	Ligamentum
L(S)AB	Labeled-(Strept-)Avidin-Biotin-System
LNG	Levonorgestrel

Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

LR	Likelihood Ratio
LZ	Langzeitzyklus
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
mg	Miligramm
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Myo	Myometrium
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC-1	Mucin-1
MW	Mittelwert
MRKH	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
NPV	negativer prädiktiver Wert
NRS	Numerische Analogskala
n.s.	nicht signifikant
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OP	Operation
PBS	phosphate buffered saline
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
Pg	Pikogramm
POF	premature ovarian failure
PPV	positiver prädiktiver Wert
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rASRM	revidierte Endometriose-Klassifikation der American Society for Reproductive Medicine
RT	Raumtemperatur
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SEL	Stiftung EM Forschung
SEM	Standard Error of the Mean
SEMG	Semenogelin
SMC	Metaplasie-artige glattmuskuläre Veränderung

Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

SN	Sensitivität
SP	Spezifität
SVS2	Semenoclotin2
Tab.	Tabelle
TGF-beta	Transforming Growth Factor beta
TIAR	Tissue Injury And Repair
TIE	tiefinfiltrierende Endometriose
TMB	Tetramethylbenzidin
TJ	Tight Junction
TVUS	Transvaginaler Ultraschall
u.a.	unter anderem
UKGM	Universitätsklinikum Gießen Marburg
v.a.	vor allem
Vol.-%	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
Zn ²⁺	Zink
ZP	Zyklusphase
z.T.	zum Teil
3D	dreidimensional

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Uterusproben für CNN1 und Folgefärbungen mit CD10 und Claudin3.....	20
Tabelle 2: Puffer und Chemikalien.....	21
Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper für die IHC-Nachweise	22
Tabelle 4: Laborgeräte, Softwareprogramme und weitere Materialien	22
Tabelle 5: Protokoll des Einkammer-Einbettautomaten unter Vakuum	24
Tabelle 6: Protokoll zur IHC-Färbung von uterinen Gewebeschnitten.....	26
Tabelle 7: Vergleich der SEMG2-Expression anhand des HSCOREs	39
Tabelle 8: Merkmalsunterschiede bei den Mukusproben.....	43
Tabelle 9: SEMG2-Konzentrationen in endozervikalen Mukusproben	45
Tabelle 10: Kontingenztafel positiver und negativer SEMG2-Testergebnisse	48
Tabelle 11: ROC-Analyse für SEMG2 als endozervikaler Fertilitätsstörungs-Marker ...	48
Tabelle 12: Vergleich von Proben mit und ohne CNN1-positive Drüsen	55
Tabelle 13: CNN1-Expressionsmuster in den uterinen Gewebeabschnitten.....	57

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der SEMG2-Gewebeproben für die IHC-Analyse	14
Abbildung 2: Aufteilung der Mukusproben für den SEMG2-ELISA.....	16
Abbildung 3: Sterilitätsfaktoren der infertilen Probandinnen	17
Abbildung 4: Einteilung der Mukusproben anhand des Menstruationszyklus.	17
Abbildung 5: Zusammensetzung der Endometriose-positiven Probandinnen.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der uterinen Gewebeabschnitte	20
Abbildung 7: Polymerbasiertes EnVision+ Detektionssystem.....	25
Abbildung 8: Sandwich-ELISA mit LAB-Detektionssystem	29
Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von SEMG2 im luminalen Epithel	35
Abbildung 10: Repräsentative Mikrofotografien der Basalis und Funktionalis.....	36
Abbildung 11: Funktionalis-Drüsen in der frühen Sekretionsphase.....	37
Abbildung 12: SEMG2-positives glanduläres Epithel	38
Abbildung 13: Nachweis von SEMG2 im endometrialen Stroma	40
Abbildung 14: SEMG2-positive Lymphozyten-Aggregate	41
Abbildung 15: SEMG2-Expression bei EMC	42
Abbildung 16: ROC-Kurve für die SEMG2-Mukuskonzentration als Fertilitätsmarker ..	47
Abbildung 17: CNN1-positive Funktionalis	49
Abbildung 18: CNN1-Stromafärbung in der Basalis	50
Abbildung 19: Homogene, periglanduläre und perivaskuläre CNN1-Stromafärbung....	51
Abbildung 20: CNN1-positive Drüse und fibrilläre CNN1-Stromafärbung im endomyometrialen Übergang.....	52
Abbildung 21: CNN1-positive, zystisch-dilatierte AM-Drüse	53
Abbildung 22: CNN1-positive AM-Drüse.....	54
Abbildung 23: CNN1 bei AM-Atrophie, intravaskulärer AM.....	56

10 Literaturverzeichnis

1. Burghaus S, Schäfer SD, Beckmann MW, Brandes I, Brünahl C, Chvatal R, et al. Diagnosis and treatment of endometriosis. Guideline of the DGGG, SGGG and OEGGG (S2k Level, AWMF Registry Number 015/045, August 2020). *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2021;81:422–46. doi:10.1055/a-1380-3693.
2. Garcia Garcia JM, Vannuzzi V, Donati C, Bernacchioni C, Bruni P, Petraglia F. Endometriosis: cellular and molecular mechanisms leading to fibrosis. *Reprod Sci.* 2023;30:1453–61. doi:10.1007/s43032-022-01083-x.
3. Saunders PTK, Horne AW. Endometriosis: etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell.* 2021;184:2807–24. doi:10.1016/j.cell.2021.04.041.
4. Renner SP, Müller A. Endometriose. In: Leidenberger FA, Strowitzki T, Ortmann O, editors. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. S. 533–549. doi:10.1007/978-3-642-38043-3_16.
5. Bird CC, McElin TW, Manalo-Estrella P. The elusive adenomyosis of the uterus- Revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112:583–93. doi:10.1016/0002-9378(72)90781-8.
6. Horn L-C, Höhn AK, Burghaus S, Schäfer SD, Ulrich UA, Schmidt D. S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose – Anforderungen an die Pathologie. [S2k guidelines for the diagnosis and treatment of endometriosis-Recommendations for pathology]. *Pathologe.* 2022;43:117–25. doi:10.1007/s00292-021-00978-x.
7. Becker CM, Bokor A, Heikinheimo O, Horne A, Jansen F, Kiesel L, et al. ESHRE guideline: endometriosis. *Hum Reprod Open.* 2022;2022:hoac009. doi:10.1093/hropen/hoac009.
8. Konrad L, Dietze R, Riaz MA, Scheiner-Bobis G, Behnke J, Horné F, et al. Epithelial-mesenchymal transition in endometriosis-When does it happen? *J Clin Med* 2020. doi:10.3390/jcm9061915.
9. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet.* 2004;364:1789–99. doi:10.1016/S0140-6736(04)17403-5.
10. Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2012;39:535–49. doi:10.1016/j.ogc.2012.10.002.
11. Schäfer SD. Medikamentöse Therapie der Endometriose. In: Dimpfl T, Janni W, Kreienberg R, Maass N, Ortmann O, Strowitzki T, et al., editors. *Weiterbildung*

- Gynäkologie und Geburtshilfe. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. S. 89–98. doi:10.1007/978-3-662-44424-5_10.
12. Vannuccini S, Petraglia F. Recent advances in understanding and managing adenomyosis. *F1000Res* 2019;8:283 doi:10.12688/f1000research.17242.1.
 13. Carlyle D, Khader T, Lam D, Vadivelu N, Shiwlochan D, Yonghee C. Endometriosis pain management: a review. *Curr Pain Headache Rep.* 2020;24:49. doi:10.1007/s11916-020-00884-6.
 14. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984;64:151–4.
 15. Young VJ, Brown JK, Saunders PTK, Horne AW. The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2013;19:558–69. doi:10.1093/humupd/dmt024.
 16. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14:422–69. doi:10.1016/S0002-9378(15)30003-X.
 17. Yovich JL, Rowlands PK, Lingham S, Sillender M, Srinivasan S. Pathogenesis of endometriosis: look no further than John Sampson. *Reprod Biomed Online.* 2020;40:7–11. doi:10.1016/j.rbmo.2019.10.007.
 18. Mechsner S, Weichbrodt M, Riedlinger WFJ, Kaufmann AM, Schneider A, Köhler C. Immunohistochemical evaluation of endometriotic lesions and disseminated endometriosis-like cells in incidental lymph nodes of patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2010;94:457–63. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.03.097.
 19. Leyendecker G. 2 Pathogenese und Pathophysiologie der Adenomyose und Endometriose (Archimetrose). In: Ebert AD, editor. *Endometriose: De Gruyter*; 2019. S. 5–40. doi:10.1515/9783110561326-002.
 20. Konrad L, Dietze R, Kudipudi PK, Horné F, Meinhold-Heerlein I. Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis? *Reproduction.* 2019;158:R41-R47. doi:10.1530/REP-19-0106.
 21. Antero MF, Ayhan A, Segars J, Shih I-M. Pathology and pathogenesis of adenomyosis. *Semin Reprod Med.* 2020;38:108–18. doi:10.1055/s-0040-1718922.
 22. Ebert AD. 11 Klinisch-operative Erscheinungsbilder. In: Ebert AD, editor. *Endometriose: De Gruyter*; 2019. S. 141. doi:10.1515/9783110561326-011.

23. Yamaguchi M, Yoshihara K, Suda K, Nakaoka H, Yachida N, Ueda H, et al. Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium. *iScience*. 2021;24:102258. doi:10.1016/j.isci.2021.102258.
24. Inoue S, Hirota Y, Ueno T, Fukui Y, Yoshida E, Hayashi T, et al. Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations. *Nat Commun*. 2019;10:5785. doi:10.1038/s41467-019-13708-y.
25. Ziegler D de, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet*. 2010;376:730–8. doi:10.1016/S0140-6736(10)60490-4.
26. Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, los Santos MJ de, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod*. 1994;9:725–9. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138578.
27. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96:659–67. doi:10.1111/aogs.13082.
28. Da Broi MG, Ferriani RA, Navarro PA. Ethio-pathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2019;23:273–80. doi:10.5935/1518-0557.20190029.
29. Giudice LC, Telles TL, Lobo S, Kao L. The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to discovery. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;955:252-64; discussion 293-5, 396-406. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02786.x.
30. Wei Q, St Clair JB, Fu T, Stratton P, Nieman LK. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2009;91:1686–91. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.02.121.
31. Revel A. Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2012;97:1028–32. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.03.039.
32. Grande G, Vincenzoni F, Milardi D, Pompa G, Ricciardi D, Fruscella E, et al. Cervical mucus proteome in endometriosis. *Clin Proteomics*. 2017;14:7. doi:10.1186/s12014-017-9142-4.
33. Ulrich U, Keckstein J. Diagnostik der Endometriose. [Diagnosing endometriosis]. *Zentralbl Gynakol*. 2005;127:295–8. doi:10.1055/s-2005-836869.

34. Guo S-W. Fibrogenesis resulting from cyclic bleeding: the Holy Grail of the natural history of ectopic endometrium. *Hum Reprod.* 2018;33:353–6. doi:10.1093/humrep/dey015.
35. Oehmke F, Weyand J, Hackethal A, Konrad L, Omwandho C, Tinneberg H-R. Impact of endometriosis on quality of life: a pilot study. *Gynecol Endocrinol.* 2009;25:722–5. doi:10.3109/09513590903159607.
36. Wee-Stekly W-W, Kew CCY, Chern BSM. Endometriosis: a review of the diagnosis and pain management. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy.* 2015;4:106–9. doi:10.1016/j.gmit.2015.06.005.
37. Bourdel N, Alves J, Pickering G, Ramilo I, Roman H, Canis M. Systematic review of endometriosis pain assessment: how to choose a scale? *Hum Reprod Update.* 2015;21:136–52. doi:10.1093/humupd/dmu046.
38. García-Solares J, Donnez J, Donnez O, Dolmans M-M. Pathogenesis of uterine adenomyosis: invagination or metaplasia? *Fertil Steril.* 2018;109:371–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.12.030.
39. Munro MG, Critchley HOD, Fraser IS. The FIGO systems for nomenclature and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: who needs them? *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207:259–65. doi:10.1016/j.ajog.2012.01.046.
40. Sammour A, Pirwany I, Usubutun A, Arseneau J, Tulandi T. Correlations between extent and spread of adenomyosis and clinical symptoms. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;54:213–6. doi:10.1159/000068385.
41. Guo S-W. Cracking the enigma of adenomyosis: an update on its pathogenesis and pathophysiology. *Reproduction.* 2022;164:R101-R121. doi:10.1530/REP-22-0224.
42. Hackethal A, Luck C, Hobe A-K von, Eskel K, Oehmke F, Konrad L. A structured questionnaire improves preoperative assessment of endometriosis patients: a retrospective analysis and prospective trial. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;284:1179–88. doi:10.1007/s00404-010-1819-0.
43. Konrad L, Fruhmann Berger LM, Maier V, Horné F, Neuheisel LM, Laucks EV, et al. Predictive model for the non-invasive diagnosis of endometriosis based on clinical parameters. *J Clin Med* 2023;12:4231 doi:10.3390/jcm12134231.
44. Haas D, Shebl O, Shamiyeh A, Oppelt P. The rASRM score and the ENZIAN classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2013;92:3–7. doi:10.1111/aogs.12026.

45. Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, et al. ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. Zentralbl Gynakol. 2005;127:275–81. doi:10.1055/s-2005-836904.
46. Ebert AD. 12 Stadieneinteilung der Endometriose. In: Ebert AD, editor. Endometriose: De Gruyter; 2019. S. 147–154. doi:10.1515/9783110561326-012.
47. Vlahos N, Vlachos A, Triantafyllidou O, Vitoratos N, Creatsas G. Continuous versus cyclic use of oral contraceptives after surgery for symptomatic endometriosis: a prospective cohort study. Fertil Steril. 2013;100:1337–42. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.008.
48. Zorbas KA, Economopoulos KP, Vlahos NF. Continuous versus cyclic oral contraceptives for the treatment of endometriosis: a systematic review. Arch Gynecol Obstet. 2015;292:37–43. doi:10.1007/s00404-015-3641-1.
49. Vannuccini S, Clemenza S, Rossi M, Petraglia F. Hormonal treatments for endometriosis: the endocrine background. Rev Endocr Metab Disord. 2022;23:333–55. doi:10.1007/s11154-021-09666-w.
50. Ebert AD. 15 Medikamentöse Therapie. In: Ebert AD, editor. Endometriose: De Gruyter; 2019. S. 200. doi:10.1515/9783110561326-015.
51. Leeners B, Imthurn B. Psychosomatische Aspekte der Endometriose-Aktueller Stand der wissenschaftlichen Kenntnisse und der klinischen Erfahrungen. [Psychosomatic aspects of endometriosis-Current state of scientific knowledge and clinical experience]. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch. 2007;47:132–9. doi:10.1159/000102575.
52. Ferrero S, Alessandri F, Racca A, Leone Roberti Maggiore U. Treatment of pain associated with deep endometriosis: alternatives and evidence. Fertil Steril. 2015;104:771–92. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.08.031.
53. K pker W, Agic A. Endometriose. In: Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G, editors. Reproduktionsmedizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. S. 357. doi:10.1007/978-3-662-57636-6_35.
54. Marcoux S, Maheux R, B r b  S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. N Engl J Med. 1997;337:217–22. doi:10.1056/NEJM199707243370401.
55. Bragheto AM, Caserta N, Bahamondes L, Petta CA. Effectiveness of the levonorgestrel-releasing intrauterine system in the treatment of adenomyosis

- diagnosed and monitored by magnetic resonance imaging. *Contraception*. 2007;76:195–9. doi:10.1016/j.contraception.2007.05.091.
56. Gkrozou F, Vatopoulou A, Skentou C, Paschopoulos M. Diagnosis and treatment of adenomyosis with office hysteroscopy-A narrative review of literature. *Diagnostics (Basel)* 2023;13:2182 doi:10.3390/diagnostics13132182.
57. Osada H, Silber S, Kakinuma T, Nagaishi M, Kato K, Kato O. Surgical procedure to conserve the uterus for future pregnancy in patients suffering from massive adenomyosis. *Reprod Biomed Online*. 2011;22:94–9. doi:10.1016/j.rbmo.2010.09.014.
58. Nawroth F. Adenomyose. In: Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G, editors. *Reproduktionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. S. 367. doi:10.1007/978-3-662-57636-6_36.
59. Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55:944–60. doi:10.1007/s000180050346.
60. Ulvsbäck M, Lazure C, Lilja H, Spurr NK, Rao VV, Löffler C, et al. Gene structure of semenogelin I and II. The predominant proteins in human semen are encoded by two homologous genes on chromosome 20. *J Biol Chem*. 1992;267:18080–4.
61. Kise H, Nishioka J, Kawamura J, Suzuki K. Characterization of semenogelin II and its molecular interaction with prostate-specific antigen and protein C inhibitor. *Eur J Biochem*. 1996;238:88–96. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0088q.x.
62. Shuvalov O, Kizenko A, Petukhov A, Aksenov N, Fedorova O, Vorobev M, et al. Cancer-testis antigens, semenogelins 1 and 2, exhibit different anti-proliferative effects on human lung adenocarcinoma cells. *Cell Death Discov*. 2020;6:108. doi:10.1038/s41420-020-00336-5.
63. Lamirande E de. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33:60–8. doi:10.1055/s-2006-958463.
64. Lilja H, Abrahamsson PA, Lundwall A. Semenogelin, the predominant protein in human semen. Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *J Biol Chem*. 1989;264:1894–900.
65. Lamirande E de, Lamothe G. Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc. *Hum Reprod*. 2010;25:1619–30. doi:10.1093/humrep/deq110.

66. Bjartell A, Malm J, Moller C, Gunnarsson M, Lundwall A, H L. Distribution and tissue expression of semenogelin I and II in man as demonstrated by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Androl.* 1996;17:17–26.
67. Lundwall A, Bjartell A, Olsson AY, Malm J. Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in non-genital tissues. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:805–10. doi:10.1093/molehr/8.9.805.
68. Flori F, Ermini L, La Sala GB, Nicoli A, Capone A, Focarelli R, et al. The GPI-anchored CD52 antigen of the sperm surface interacts with semenogelin and participates in clot formation and liquefaction of human semen. *Mol Reprod Dev.* 2008;75:326–35. doi:10.1002/mrd.20738.
69. Esfandiari N, Lamirande E de, Gukturk A, San Gabriel MC, Nazemian Z, Burjaq H, et al. Seminal hyperviscosity is not associated with semenogelin degradation or sperm deoxyribonucleic acid damage: a prospective study of infertile couples. *Fertil Steril.* 2014;101:1599–603. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.02.045.
70. Shuvalov O, Kizenko A, Petukhov A, Fedorova O, Daks A, Barlev N. Emerging roles of cancer-testis antigenes, semenogelin 1 and 2, in neoplastic cells. *Cell Death Discov.* 2021;7:97. doi:10.1038/s41420-021-00482-4.
71. Mandal A, Bhattacharyya AK. Sperm hyaluronidase activation by purified predominant and major basic human seminal coagulum proteins. *Hum Reprod.* 1995;10:1745–50. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136167.
72. Yoshida K, Yamasaki T, Yoshiike M, Takano S, Sato I, Iwamoto T. Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. *J Androl.* 2003;24:878–84. doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb03139.x.
73. Légaré C, Droit A, Fournier F, Bourassa S, Force A, Cloutier F, et al. Investigation of male infertility using quantitative comparative proteomics. *J Proteome Res.* 2014;13:5403–14. doi:10.1021/pr501031x.
74. Lamirande E de, Yoshida K, Yoshiike TM, Iwamoto T, Gagnon C. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. *J Androl.* 2001;22:672–9.
75. Sakaguchi D, Miyado K, Iwamoto T, Okada H, Yoshida K, Kang W, et al. Human Semenogelin 1 promotes sperm survival in the mouse female reproductive tract. *Int J Mol Sci* 2020;21:3961. doi:10.3390/ijms21113961.
76. Edström AML, Malm J, Frohm B, Martellini JA, Giwercman A, Mörgelin M, et al. The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived

- from fragmentation of the semenogelins. *J Immunol.* 2008;181:3413–21. doi:10.4049/jimmunol.181.5.3413.
77. Jonsson M, Lundwall A, Malm J. The semenogelins: proteins with functions beyond reproduction? *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:2886–8. doi:10.1007/s00018-006-6287-0.
78. Bonilha VL, Rayborn ME, Shadrach KG, Li Y, Lundwall A, Malm J, Hollyfield JG. Semenogelins in the human retina: differences in distribution and content between AMD and normal donor tissues. *Exp Eye Res.* 2008;86:150–6. doi:10.1016/j.exer.2007.10.006.
79. Wu K-C, Jin J-P. Calponin in non-muscle cells. *Cell Biochem Biophys.* 2008;52:139–48. doi:10.1007/s12013-008-9031-6.
80. Miano JM, Krahe R, Garcia E, Elliott JM, Olson EN. Expression, genomic structure and high resolution mapping to 19p13.2 of the human smooth muscle cell calponin gene. *Gene.* 1997;197:215–24. doi:10.1016/s0378-1119(97)00265-5.
81. Liu R, Jin J-P. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene.* 2016;585:143–53. doi:10.1016/j.gene.2016.02.040.
82. Leinweber BD, Leavis PC, Grabarek Z, Wang CL, Morgan KG. Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem J.* 1999;344 Pt 1:117–23.
83. Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;141:20–6. doi:10.1016/s0006-291x(86)80328-x.
84. Takahashi K, Yoshimoto R, Fuchibe K, Fujishige A, Mitsui-Saito M, Hori M, et al. Regulation of shortening velocity by calponin in intact contracting smooth muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279:150–7. doi:10.1006/bbrc.2000.3909.
85. Abe M, Takahashi K, Hiwada K. Effect of calponin on actin-activated myosin ATPase activity. *J Biochem.* 1990;108:835–8. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123289.
86. Gimona M, Sparrow MP, Strasser P, Herzog M, Small JV. Calponin and SM 22 isoforms in avian and mammalian smooth muscle. Absence of phosphorylation in vivo. *Eur J Biochem.* 1992;205:1067–75. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb16875.x.
87. Choo Y-Y, Sakai T, Komatsu S, Ikebe R, Jeffers A, Singh KP, et al. Calponin 1 contributes to myofibroblast differentiation of human pleural mesothelial cells. *Am J*

- Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2022;322:L348-L364.
doi:10.1152/ajplung.00289.2021.
88. Horiuchi A, Nikaido T, Ya-Li Z, Ito K, Orii A, Fujii S. Heparin inhibits proliferation of myometrial and leiomyomal smooth muscle cells through the induction of alpha-smooth muscle actin, calponin h1 and p27. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:139–45. doi:10.1093/molehr/5.2.139.
 89. Jiang Z, Grange RW, Walsh MP, Kamm KE. Adenovirus-mediated transfer of the smooth muscle cell calponin gene inhibits proliferation of smooth muscle cells and fibroblasts. *FEBS Lett.* 1997;413:441–5. doi:10.1016/s0014-5793(97)00944-7.
 90. Samaha FF, Ip HS, Morrissey EE, Seltzer J, Tang Z, Solway J, Parmacek MS. Developmental pattern of expression and genomic organization of the calponin-h1 gene. A contractile smooth muscle cell marker. *J Biol Chem.* 1996;271:395–403. doi:10.1074/jbc.271.1.395.
 91. Minkwitz C, Schoon H-A, Zhang Q, Schöninger S. Plasticity of endometrial epithelial and stromal cells-A new approach towards the pathogenesis of equine endometrosis. *Reprod Domest Anim.* 2019;54:835–45. doi:10.1111/rda.13431.
 92. Horiuchi A, Nikaido T, Ito K, Zhai Y, Orii A, Taniguchi S, et al. Reduced expression of calponin h1 in leiomyosarcoma of the uterus. *Lab Invest.* 1998;78:839–46.
 93. Maguer-Satta V, Besançon R, Bachelard-Cascales E. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells.* 2011;29:389–96. doi:10.1002/stem.592.
 94. Konrad L, Kortum J, Nabham R, Gronbach J, Dietze R, Oehmke F, et al. Composition of the stroma in the human endometrium and endometriosis. *Reprod Sci.* 2018;25:1106–15. doi:10.1177/1933719117734319.
 95. Oliva E. CD10 expression in the female genital tract: does it have useful diagnostic applications? *Adv Anat Pathol.* 2004;11:310–5. doi:10.1097/01.pap.0000138140.81139.46.
 96. Che J, Yue D, Zhang B, Zhang H, Huo Y, Gao L, et al. Claudin-3 inhibits lung squamous cell carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and invasion via suppression of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Int J Med Sci.* 2018;15:339–51. doi:10.7150/ijms.22927.
 97. Hoersch A, Horné F, Dietze R, Berkes E, Oehmke F, Tinneberg H-R, et al. Localization of claudin-2 and claudin-3 in eutopic and ectopic endometrium is highly

- similar. Arch Gynecol Obstet. 2020;301:1003–11. doi:10.1007/s00404-020-05472-y.
98. Esteves SC, Schattman GL, Agarwal A. Definitions and relevance of unexplained infertility in reproductive medicine. In: Schattman GL, Esteves SC, Agarwal A, editors. Unexplained Infertility. New York, NY: Springer New York; 2015. S. 3–5. doi:10.1007/978-1-4939-2140-9_1.
 99. Barratt CL, Cooke ID. Sperm transport in the human female reproductive tract--a dynamic interaction. Int J Androl. 1991;14:394–411. doi:10.1111/j.1365-2605.1991.tb01268.x.
 100. Koistinen H, Soini T, Leinonen J, Hyden-Granskog C, Salo J, Halttunen M, et al. Monoclonal antibodies, immunofluorometric assay, and detection of human semenogelin in male reproductive tract: no association with in vitro fertilizing capacity of sperm. Biol Reprod. 2002;66:624–8. doi:10.1095/biolreprod66.3.624.
 101. Martyn F, McAuliffe FM, Wingfield M. The role of the cervix in fertility: is it time for a reappraisal? Hum Reprod. 2014;29:2092–8. doi:10.1093/humrep/deu195.
 102. Guo S-W. The pathogenesis of adenomyosis vis-à-vis endometriosis. J Clin Med 2020;9:485. doi:10.3390/jcm9020485.
 103. Habiba M, Benagiano G, Guo S-W. An appraisal of the tissue injury and repair (TIAR) theory on the pathogenesis of endometriosis and adenomyosis. Biomolecules 2023;13:975. doi:10.3390/biom13060975.
 104. Bernd Graubner. ICD-10-GM 2014 Systematisches Verzeichnis Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 11. Revision - German Modification Version 2014. 2014th ed.; 2014.
 105. Nicolae A, Preda O, Nogales FF. Endometrial metaplasias and reactive changes: a spectrum of altered differentiation. J Clin Pathol. 2011;64:97–106. doi:10.1136/jcp.2010.085555.
 106. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Reprint of: Dating the endometrial biopsy. Fertil Steril. 2019;112:e93-e115. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.08.079.
 107. Shojaeian S, Maslehat Lay N, Zarnani A-H. Detection systems in immunohistochemistry. In: F. Streckfus C, editor. Immunohistochemistry - The ageless biotechnology: IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.82072.

108. Murdock TA, Veras EF, Kurman RJ, Mazur MT, editors. Diagnosis of endometrial biopsies and curettings. Cham: Springer International Publishing; 2019. S. 39 - 73. doi: 10.1007/978-3-319-98608-1_3.
109. Zaloudek CJ, Hendrickson MR, Soslow RA. 10 Mesenchymal tumors of the uterus. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, editors. Blaustein's pathology of the female genital tract. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer; 2011. S. 512-13.
110. Horné F, Justus Liebig University Giessen. Expressionsprofile von Vimentin, Claudin-11 und Claudin-7 in der Pathogenese der Endometriose: Universitätsbibliothek Gießen; 2020.
111. Quinn KE, Matson BC, Wetendorf M, Caron KM. Pinopodes: Recent advancements, current perspectives, and future directions. Mol Cell Endocrinol. 2020;501:110644. doi:10.1016/j.mce.2019.110644.
112. Develioglu OH, Nikas G, Hsiu JG, Toner JP, Jones HW. Detection of endometrial pinopodes by light microscopy. Fertil Steril. 2000;74:767–70. doi:10.1016/s0015-0282(00)00717-2.
113. Kabir-Salmani M, Nikzad H, Shiokawa S, Akimoto Y, Iwashita M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. Mol Hum Reprod. 2005;11:553–9. doi:10.1093/molehr/gah218.
114. Bartosch C, Lopes JM, Beires J, Sousa M. Human endometrium ultrastructure during the implantation window: a new perspective of the epithelium cell types. Reprod Sci. 2011;18:525–39. doi:10.1177/1933719110392055.
115. Saint-Dizier M, Mahé C, Reynaud K, Tsikis G, Mermillod P, Druart X. Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. Mol Cell Endocrinol. 2020;516:110956. doi:10.1016/j.mce.2020.110956.
116. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. Hum Reprod Update. 2006;12:23–37. doi:10.1093/humupd/dmi047.
117. Szczykutowicz J, Tkaczuk-Włach J, Ferens-Sieczkowska M. Glycoproteins presenting galactose and N-Acetylgalactosamine in human seminal plasma as potential players involved in immune modulation in the fertilization process. Int J Mol Sci 2021;22:7331. doi:10.3390/ijms22147331.
118. Agostinis C, Mangogna A, Bossi F, Ricci G, Kishore U, Bulla R. Uterine immunity and microbiota: a shifting paradigm. Front Immunol. 2019;10:2387. doi:10.3389/fimmu.2019.02387.

119. Murdock TA, Veras EFT, Kurman RJ, Mazur MT. Pregnancy, abortion, and ectopic Pregnancy. In: Murdock TA, Veras EF, Kurman RJ, Mazur MT, editors. *Diagnosis of endometrial biopsies and curettings*. Cham: Springer International Publishing; 2019. S. 39–73. doi:10.1007/978-3-319-98608-1_3.
120. Robertson SA, Sharkey DJ. Seminal fluid and fertility in women. *Fertil Steril*. 2016;106:511–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.07.1101.
121. Anamthathmakula P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception. *Biol Reprod*. 2020;103:411–26. doi:10.1093/biolre/ioaa075.
122. Mahdavinezhad F, Gharaei R, Farmani AR, Hashemi F, Kouhestani M, Amidi F. The potential relationship between different human female reproductive disorders and sperm quality in female genital tract. *Reprod Sci*. 2022;29:695–710. doi:10.1007/s43032-021-00520-7.
123. Martínez-Heredia J, Mateo S de, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod*. 2008;23:783–91. doi:10.1093/humrep/den024.
124. Tellum T, Munro MG. Classifications of adenomyosis and correlation of phenotypes in imaging and histopathology to clinical outcomes: a review. *Curr Obstet Gynecol Rep*. 2022;11:1–11. doi:10.1007/s13669-021-00320-5.
125. Camboni A, Marbaix E. Ectopic Endometrium: the pathologist's perspective. *Int J Mol Sci* 2021;22:10974. doi:10.3390/ijms222010974.
126. Bourdon M, Oliveira J, Marcellin L, Santulli P, Bordonne C, Maitrot Mantelet L, et al. Adenomyosis of the inner and outer myometrium are associated with different clinical profiles. *Hum Reprod*. 2021;36:349–57. doi:10.1093/humrep/deaa307.
127. Fujii S, Konishi I, Mori T. Smooth muscle differentiation at endometrio-myometrial junction. An ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1989;414:105–12. doi:10.1007/BF00718589.
128. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971;27:549–50. doi:10.1007/BF02147594.
129. Tai Y, Woods EL, Dally J, Kong D, Steadman R, Moseley R, Midgley AC. Myofibroblasts: function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis. *Biomolecules* 2021;11:1095. doi:10.3390/biom11081095.

130. Baglolle CJ, Smith TJ, Foster D, Sime PJ, Feldon S, Phipps RP. 3 Functional assessment of fibroblast heterogeneity by the cell-surface glycoprotein Thy-1. In: Chaponnier C, Demolière A, Gabbiani G, editors. *Tissue Repair, Contraction and the Myofibroblast*. Boston, MA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media LLC; 2006. S. 36.
131. Lowe JS, Anderson PG, Anderson SI. 5 Contractile Cells. In: Stevens and Lowe's *Human Histology - E-Book*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020. S. 93
132. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*. 2008;12:22–37. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00213.x.
133. Czernobilsky B, Remadi S, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin and other stromal markers in endometrial mucosa. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;422:313–7. doi:10.1007/BF01608341.
134. Kunz G, Leyendecker G. Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization, regulation, function and dysfunction. *Reprod Biomed Online*. 2002;4 Suppl 3:5–9. doi:10.1016/s1472-6483(12)60108-4.
135. Leyendecker G, Wildt L. 20 Uterine peristalsis and the development of endometriosis and adenomyosis. In: Healy DL, Evers JLH, Giudice L, editors. *Endometriosis: science and practice*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell; 2012. S. 200 - 209.
136. Yan D, Liu X, Xu H, Guo S-W. Platelets induce endothelial-mesenchymal transition and subsequent fibrogenesis in endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2020;41:500–17. doi:10.1016/j.rbmo.2020.03.020.
137. Habiba M, Benagiano G, Brosens I. 3 The pathophysiology of adenomyosis. In: Habiba M, Benagiano G, editors. *Uterine adenomyosis*. 1st ed. Cham: Springer; 2016. S.46 -49.
138. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2006. S. 111
139. Welsch U. 13.3 Weibliche Geschlechtsorgane. In: Welsch U, Kummer W, Deller T, editors. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: Das Lehrbuch*. 5th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2018. S. 532.
140. Ibrahim MG, Sillem M, Plendl J, Taube ET, Schüring A, Götte M, et al. Arrangement of myofibroblastic and smooth muscle-like cells in superficial peritoneal endometriosis and a possible role of transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) in

- myofibroblastic metaplasia. Arch Gynecol Obstet. 2019;299:489–99. doi:10.1007/s00404-018-4995-y.
141. Dallenbach-Hellweg G, Dietel M. 1 Weibliches Genitale. In: Remmele W. Pathologie 4. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997. S.81
142. Fadare O, Roma AA. 2 Selected non-neoplastic and benign diseases of the endometrium and myometrium. In: Fadare O. Atlas of uterine pathology. Cham: Springer International Publishing AG; 2019. S.44.
143. Meenakshi M, McCluggage WG. Vascular involvement in adenomyosis: report of a large series of a common phenomenon with observations on the pathogenesis of adenomyosis. Int J Gynecol Pathol. 2010;29:117–21. doi:10.1097/PGP.0b013e3181b7018d.

11 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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

12 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Lutz Konrad für die engagierte wissenschaftliche Betreuung. Er war jederzeit für mich erreichbar und ermutigte mich dazu eigenständig Ideen zu entwickeln. Seine konstruktive Kritik war bei der Durchführung der Versuche und beim Verfassen meiner Arbeit extrem hilfreich. Ich weiß das entgegengebrachte Vertrauen und die Geduld bei der Überlassung der hochinteressanten Themengebiete sehr zu schätzen.

Weiterhin gilt mein Dank dem Geschäftsführenden Direktor und Chefarzt der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am UKGM Herrn Prof. Dr. Ivo Meinhold-Heerlein für die Vermittlung dieser Doktorarbeit.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern der Klinik, die am Ausbau der Gewebedatenbank beteiligt sind und eine reibungslose Überführung der Proben in das Labor ermöglichten.

Für die fundierten histopathologische Befundungen danke ich dem Institut für Pathologie des UKGMs unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner.

Frau Hof war mir eine unentbehrliche Unterstützung bei der Einarbeitung im Labor, ebenso wie Dr. Raimund Dietze, Dr. Pradeep Kudipudi und Veronica Maier. Vielen Dank hierfür und auch für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Svenja und meiner Mutter für ihre Unterstützung in allen Belangen. Ebenso Svenjas Eltern, meinen und Svenjas Geschwistern für ihre wertvollen und aufbauenden Ratschläge. Ihr hattet stets ein offenes Ohr für mich.