

**Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen  
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener**

**Expression und Regulation des Chemokinrezeptors CCR-1 in  
Peritonealmakrophagen, Endometrium und  
Endometriosegewebe**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Songül Dogan  
aus  
Ludwigsburg**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Hornung  
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Klingel

In Liebe meinen Nichten Dilan und Helin und  
meinen Neffen Tayfun, Devin und Metin

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>4</b>
<u>2.1. Patientenkollektiv.....</u>	4
<u>2.2. Zellpräparation.....</u>	4
2.2.1. Präparation von Peritonealflüssigkeit zur Kultivierung von Makrophagen.....	4
2.2.2. Präparation von Gewebe zur Kultivierung von Stroma- und Epithelzellen.....	6
2.2.3. Herstellung der Medien.....	7
<u>2.3. Zellkultur.....</u>	7
2.3.1. Mediumwechsel der Makrophagen.....	7
2.3.2. Kultivierung der Makrophagen.....	7
2.3.3. Stimulation der Makrophagen mit TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ .....	8
2.3.3.1. Ansetzen der Zytokine.....	8
2.3.3.2. Stimulation der Makrophagen.....	8
2.3.4. Einfrieren der Makrophagen.....	8
<u>2.4. Protein-Assay.....</u>	9
2.4.1. Herstellung des Lysispuffers.....	9
2.4.2. Präparation von Endometriosegewebe und Endometrium.....	9
2.4.3. Bestimmung des Proteingehaltes.....	9
<u>2.5. Westernblot.....</u>	10
2.5.1. Herstellung der Pufferlösungen.....	10
2.5.2. Westernblot.....	11

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>13</b>
3.1. Expression des CCR-1-Rezeptors in nativen und kultivierten Peritonealmakrophagen.....	13
3.2. Effekt von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ auf die Expression des CCR-1-Rezeptors in Peritonealmakrophagen.....	14
3.3. Expression des CCR-1-Rezeptors in Endometriosegewebe und Endometrium..	16
3.4. Effekt von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ auf die Expression des CCR-1-Rezeptors in Stromazellen von Endometriosegewebe und Endometrium.....	17
3.5. Expression des CCR-1-Rezeptors in Epithelzellen.....	18
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>19</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>29</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>31</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>45</b>
<b>8. DANKSAGUNG.....</b>	<b>48</b>
<b>9. LEBENSLAUF.....</b>	<b>49</b>

## **1. Einleitung**

Endometriose ist charakterisiert durch das heterotope Vorkommen von Endometrium außerhalb der Uterushöhle. 5-15 % aller Frauen im gebärfähigen Alter leiden an dieser benignen Erkrankung. Klassische Symptome von Endometriose sind Dysmenorrhoe, chronische Unterbauchschmerzen, positionsabhängige Dyspareunie und Infertilität. Die Diagnose „Endometriose“ sollte durch eine diagnostische Laparoskopie gesichert werden.

Die bisher etablierten Therapien umfassen chirurgische Interventionen und/oder Hormontherapien. Die sichtbaren Endometrioseherde werden operativ entfernt, entweder durch Exzision, Elektrokoagulation oder durch Vaporisation mittels Laser. Ziel dieser Verfahren ist, vor allem auch durch Adhäsiolyse, die Wiederherstellung einer normalen Anatomie im kleinen Becken. Als konservative Behandlungsmaßnahmen kommen Gestagene, GnRH-Analoga und Danazol zum Einsatz. Durch unterschiedliche Wirkmechanismen bewirken diese Medikamente eine Atrophisierung des eutopen und ektopen Endometriums und wirken dadurch gleichzeitig kontrazeptiv. Das Rezidivrisiko schwankt unter den derzeitigen Therapiemöglichkeiten je nach Untersuchungszeitraum zwischen 7 und 35 %. Im ersten postoperativen Jahr kommt es in 16 % und danach pro Jahr in 3-8 % der Fälle zu Rezidiven. Unter einer Gestagen-therapie wird die Rezidivrate bei zweijähriger Nachbeobachtung mit 16-34 % angegeben. Über Behandlungen mit GnRH-Analoga werden bei kurzer Nachbeobachtungszeit Rezidivraten von 20 % berichtet. In 15-20 % der Fälle ist nach Danazol-therapie im ersten Jahr mit einem Rezidiv zu rechnen und danach treten pro Jahr ca. 5 % Rezidive auf (22,33,56,71,99-102,120).

Die Ätiologie von Endometriose ist bis heute nicht vollständig geklärt. Die am weitesten verbreitete Hypothese ist die Implantationstheorie von Sampson (96). Danach wird endometriales Gewebe mittels retrograder Menstruation in die Peritonealhöhle verschleppt und extrauterin implantiert. Weitere Hypothesen umfassen die Metaplasie-theorie (76), die lymphogene und hämatogene Metastasierung (34) und die iatrogene Verschleppung (55). Keine einzige dieser Theorien kann jedoch alle klinischen Erscheinungsformen der Endometriose erklären. Da selbst die retrograde Menstruation

einen physiologischen Prozess darstellt (38), vermutet man, dass auch andere Faktoren eine Rolle bei der Entstehung der Endometriose spielen. Hierbei werden immunologische, genetische, hormonale, enzymatische und Umweltfaktoren diskutiert (89,118). Kennedy (59) beschrieb eine siebenfach höhere Prävalenz von Endometriose bei Verwandten ersten Grades und auch bei entfernten Verwandten wurde ein 1,56-fach höheres Risiko postuliert (106). Trotz der zunehmenden Hinweise bezüglich einer genetischen Komponente der Endometriose sind die potentiellen Gene, die diese Erkrankung verursachen können, immer noch relativ unbekannt (11). Die Entdeckung von Genpolymorphismen ist aktuell Gegenstand intensivster Forschungen. Zahlreiche Arbeitsgruppen vermuten auch eine Beziehung zwischen der Erkrankung und einer veränderten Immunitätslage dieser Patientinnen. In diesem Zusammenhang wird Endometriose häufig als Autoimmunerkrankung angesehen. Ein klassisches Merkmal solcher Erkrankungen ist die veränderte B-Zellaktivierung verbunden mit hohen Immunglobulin- und Zytokinspiegeln (32,73,74,78). Es ist jedoch nicht nur die humorale, sondern auch die zelluläre Immunantwort verändert. Denn die mit der Endometriose assoziierten Symptome scheinen das Ergebnis lokaler Entzündungsreaktionen zu sein. Hohe Konzentrationen von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten und erhöhte Spiegel von spezifischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren unterstützen diese Hypothese (8,36,37,42,66-68,113,119).

RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) ist ein 8 kDa  $\beta$ -Chemokin (98). Chemokine sind Polypeptide, die zur Gruppe der Zytokine gehören und chemotaktische und aktivierende Effekte in Entzündungsreaktionen vermitteln. Sie werden in vier Gruppen eingeteilt. Diese Klassifizierung beruht auf der Sequenz der ersten beiden Cysteinreste. Somit unterscheidet man die CXC-, CC-, C- und CX3C-Klassen (48,92). Die zweite Gruppe, CC- oder  $\beta$ -Chemokine, hat überwiegend monozytische Affinitäten. Neben RANTES zählen zu dieser Gruppe unter anderem MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) und MIP-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ ). Diese Chemokine binden mit unterschiedlicher Affinität an CCR-1- bis CCR-5-Rezeptoren (92). CCR-1 ist der Rezeptor mit der höchsten Affinität für RANTES (108).

RANTES wird gebildet von Makrophagen, T-Lymphozyten (81), Endothelzellen (72), Stromazellen (46) und Thrombozyten (63). Es ist chemotaktisch wirksam für Monozyten – hierzu zählen auch CD68+ Makrophagen (45) –, T-Gedächtniszellen (97), Eosinophile (12), Basophile, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und dendritische Zellen (30). Die Konzentration von RANTES ist in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen erhöht und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (60). RANTES ist zu 70 % für die chemotaktische Wirkung der Monozyten in der Peritonealflüssigkeit verantwortlich (30).

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, wie die beiden Zytokine Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) den CCR-1-Rezeptor in Makrophagen, Stromazellen und Epithelzellen zeitabhängig regulieren können. Daneben soll die CCR-1-Proteinexpression in Endometrium und Endometriosegewebe quantifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit würden Hinweise dafür liefern, dass neben der autokrinen Wirkung von RANTES auch ein positiver Feed-back-Mechanismus vorhanden ist. Diese positive Rückkopplung ist folgendermaßen zu verstehen: Endometriome sezernieren RANTES. Das Chemokin bewirkt die Migration von Makrophagen und Lymphozyten zum Ort des Geschehens. Des Weiteren exprimieren diese Immunzellen vermehrt CCR-1-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche und setzen Zytokine wie RANTES, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  frei. Das bedeutet, je höher die Konzentration des Mediators ist, desto mehr wird dessen Rezeptor exprimiert.

Neue therapeutische Ansätze könnten entwickelt werden, um die bedeutsamen Fertilitätschancen zu erhöhen. In Betracht käme hierbei der Einsatz von CCR-1-Rezeptorblockern oder RANTES-Antikörpern. Aus mehreren Gründen ist die klinische Anwendung des Letztgenannten nicht möglich. Abgesehen von den hohen Kosten wäre zum einen die Bildung von Antikörpern gegen diese RANTES-Antikörper denkbar und zum anderen ist die orale Anwendung nicht möglich. Somit hoffen wir, durch eine Therapie mit CCR-1-Blockern zunächst die Inflammation reduzieren zu können, um dadurch die mit der Endometriose assoziierten Symptome zu mildern, und ferner eine Erhöhung der Schwangerschaftsraten zu erzielen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patientenkollektiv**

Nach dem Aufklärungsgespräch mit dem Arzt wurde von den Patientinnen eine Einwilligungserklärung zur „Entnahme und Aufbewahrung von Blut, Peritonealflüssigkeit, Endometrium und Endometriosegewebe im Rahmen ergänzender wissenschaftlicher Untersuchungen“ (Ethik-Kommission AZ 340/2001V) unterschrieben, wobei die gegebene Einwilligung freiwillig war und jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen werden konnte.

Die Proben wurden von Patientinnen im Alter von 18-45 Jahren entnommen, die mindestens drei Monate vor der Operation keine GnRH-Therapie erhielten. Frauen mit Endometriose (n=19) wurden entsprechend dem OP-Bericht nach dem rAFS- (revised American Fertility Society-) System in Stadien eingeteilt. Kontrollpersonen (n=15) waren Frauen, die wegen Ovarialzysten, Wunsch nach Sterilisation, Infertilität, Unterbauchschmerzen, Leiomyomen oder Gebärmutterfehlbildungen eine Laparoskopie erhielten. Endometrium (n=25) wurde von Frauen entnommen, bei denen eine vaginale oder abdominale Hysterektomie aufgrund von Adenomyosis uteri, Leiomyomen, Deszensus uteri oder Stressharninkontinenz erfolgte.

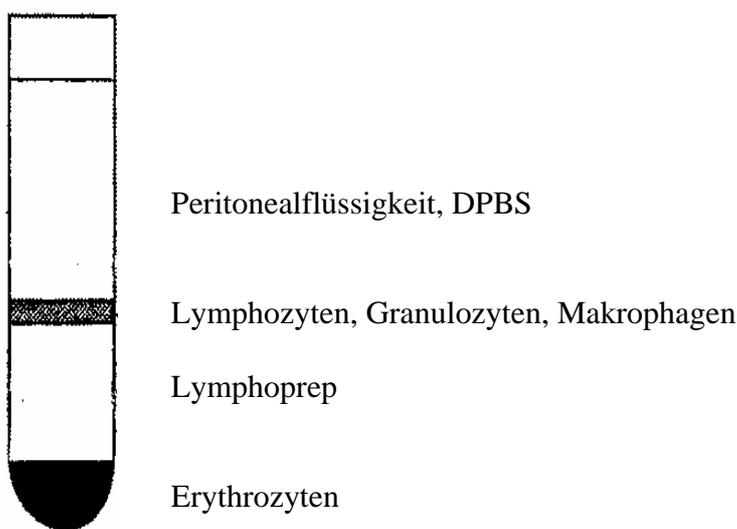
Operativ erfahrene Gynäkologen bestimmten den Grad der Endometriose anhand der laparoskopisch sichtbaren Adhäsionen und der Größe und Infiltrationstiefe der Endometrioseimplantate.

### **2.2. Zellpräparation**

#### **2.2.1. Präparation von Peritonealflüssigkeit zur Kultivierung von Makrophagen**

Nach der sterilen Entnahme der Peritonealflüssigkeit aus dem Douglas'schen Raum wurde diese sofort in ein mit 0,5 ml Heparin (5000 I.E., Braun, Melsungen) gefülltes 15 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson, New Jersey) gegeben. Anschließend wurde die Peritonealflüssigkeit auf Eis ins Labor transportiert. Dort erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 200×g in einer Heraeus-Zentrifuge. Man erhielt einen Überstand bestehend aus Peritonealflüssigkeit und einen Unterstand bestehend aus Leukozyten und Erythrozyten. Der Überstand wurde in mehrere 1,5 ml Tubes (Eppendorf, Hamburg) gefüllt und bei -80°C eingefroren. Circa 1,5 ml

Peritonealflüssigkeit wurde im Röhrchen belassen und mit den zellulären Bestandteilen vermischt. Diese 2 ml wurden mit 2 ml DPBS (Bio-Whittaker, Verviers) mit Kalzium und Magnesium 1:1 verdünnt. Für die Auftrennung der Zellen in Leukozyten und Erythrozyten wurde zunächst in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen 2 ml Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo) gefüllt. Über diese Schicht wurde vorsichtig die vorhandenen 4 ml verdünnte Peritonealflüssigkeit pipettiert. Nach der nun folgenden Zentrifugation bei 20°C und 800×g für 20 min erfolgte die Trennung. Man erhielt vier Phasen, die sich folgendermaßen zusammensetzten:



**Abb. 1:** Separation der in der Peritonealflüssigkeit enthaltenen Blutbestandteile in Leukozyten und Erythrozyten durch Lymphoprep

Die Peritonealflüssigkeit wurde entfernt, die zweite Schicht großzügig in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt, mit DPBS gewaschen und bei 20°C, 250×g für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal durchgeführt. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 2 ml erwärmten Makrophagen-Medium (PAA, Linz) vermischt und über eine 10 cm Ø Petrischale (Greiner, Nürtingen), die bereits erwärmtes Medium enthielt, pipettiert. Die nun fertige Kultur wurde zur Bebrütung in einen Brutkasten (Heraeus, Hanau) bei 37°C und mit 5 % CO<sub>2</sub> gestellt.

### **2.2.2. Präparation von Gewebe zur Kultivierung von Stroma- und Epithelzellen**

Das Gewebe wurde nach dem operativen Eingriff unter sterilen Bedingungen in einem Falcon-Röhrchen mit 10 % FCS-RPMI-Medium in das Labor transportiert. Im Labor wurde das Gewebe samt Medium in eine sterile Petrischale gegeben und das Medium abgesaugt. Nach Entfernung von umgebendem Myometrium erfolgte mit sterilen Einmalskalpellen (Feather Fig. 21, Köln) eine mechanische Zerkleinerung des Endometriums in ca. 1 mm große Stücke. Nun wurde Kollagenase (2 mg/ml, Merck, Darmstadt) zur enzymatischen Dissoziierung zugegeben und die Lösung mit einer Pipette gemischt. Die so entstandene Suspension wurde sechs mal 20 Minuten bei 37°C zur Inkubation in den Brutschrank gestellt und im Intervall jeweils mit einer Pipette gemischt.

Die Reaktion wurde mit 8 ml 10 % FCS-RPMI-Medium gestoppt, die Suspension über einen 70 µm Filter (Becton Dickinson, New Jersey) in ein 50 ml Flacon-Röhrchen pipettiert und der Filter mit 10 ml DPBS mit Ca/Mg gespült. Durch diese erste Filtration wurden unverdaute Stücke entfernt.

Das Filtrat wurde zur Trennung von Epithel- und Stromazellen über einen 40 µm Filter (Becton Dickinson, New Jersey) gegeben. Epitheliale Drüsenzellen verblieben auf dem Filter und Stromazellen gelangten in das zweite Filtrat. Die Drüsen wurden mit 3 ml 10 % FCS-RPMI-Medium auf eine Petrischale gespült, gleichmäßig auf sechs Wells einer 48 Lochplatte (Costar, New Jersey) verteilt und in den Brutschrank gestellt.

Das zweite Filtrat mit den Stromazellen wurde für 5 Minuten bei 200×g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Pellets in 20 ml 10 % FCS-RPMI-Medium resuspendiert. Diese Lösung wurde in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Corning, New York) gegeben und für 60 Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit waren die stromalen Zellen adhärent, und frei schwimmende Blutzellen wurden durch Spülung mit 10 ml DPBS mit Ca/Mg entfernt. Die Flask wurde mit 20 ml 10 % FCS-RPMI-Medium gefüllt und in den Brutschrank gestellt.

Stromazellen und Epithelzellen wurden analog zu den Makrophagen stimuliert und eingefroren.

### **2.2.3. Herstellung der Medien**

Die Kulturmedien für Stroma- und Epithelzellen enthielten alle 5 ml L-Glutamin (Gibco BRL, Berlin), 5 ml Gentamycin (Gibco BRL, Berlin) und 5 ml Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Berlin). Es wurden RPMI 1640-Medien (Bio-Whittaker, Verviers) mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an fötalem Kälberserum (FCS, PAA, Linz) verwendet. Zur Kultivierung wurde 10 % FCS-Medium verwendet, die Stimulation der Zellen erfolgte in 2,5 % FCS-Medium.

## **2.3. Zellkultur**

### **2.3.1. Mediumwechsel der Makrophagen**

Bis zum konfluenten Wachstum der Makrophagen wurde alle 3-4 Tage das Medium gewechselt. Das verbrauchte Medium wurde dabei in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und 5 min lang bei 20°C und 200×g zentrifugiert. Die Petrischale wurde mit 10 ml frischem, erwärmten Makrophagen-Medium gefüllt und in den Brutschrank gestellt. Nach der Zentrifugation wurde von dem alten Medium 5 ml in die Petrischale gegeben. Der Rest wurde verworfen.

### **2.3.2. Kultivierung der Makrophagen**

Sobald die Zellkulturen konfluent waren, erfolgte eine Passage der Zellen. Aufgrund der geringen Anzahl und des langsamen Wachstums der Makrophagen war es nicht möglich, genügend Kulturschalen für eine Stimulationsreihe von einer einzigen Patientin anzulegen. Deshalb konnte pro Schale nur eine Passage durchgeführt werden. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die adhärenen Zellen zweimal mit erwärmter DPBS ohne Ca/Mg gewaschen. Die Zellen wurden mit 3 ml Accutase (PAA, Linz) für 5-10 min im Brutschrank inkubiert. Durch mehrfaches, kräftiges Klopfen der Schale wurde der Ablösevorgang der Makrophagen unterstützt. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Wirkung der Accutase durch die Zugabe von 7 ml erwärmten Makrophagen-Medium gestoppt. Die Flüssigkeit mit den Zellen wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 800×g und 20°C zentrifugiert. 9 ml des Überstandes wurden abgesaugt und der verbliebene Rest mit 3 ml frischem, erwärmtem Medium vermischt. In zwei Petrischalen, die bereits 10 ml erwärmtes Makrophagen-

Medium enthielten, wurden jeweils 2 ml dieser Suspension gegeben und in den Brutschrank gestellt.

### **2.3.3. Stimulation der Makrophagen mit TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$**

#### **2.3.3.1. Ansetzen der Zytokine**

TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  wurden von der Firma R&D-Systems, Minneapolis, bezogen. Zu 50  $\mu$ g TNF- $\alpha$  und 100  $\mu$ g IFN- $\gamma$  wurden jeweils 495  $\mu$ l DPBS mit Ca/Mg und 5  $\mu$ l BSA (Pierce, Rockford) hinzugefügt. Um einen Wirkungsverlust durch häufiges Aufwärmen und Einfrieren zu verhindern, wurden die Lösungen in 0,5 ml Tubes (Eppendorf, Hamburg) zu je 20  $\mu$ l aliquotiert. Die Aliquots wurden in einem -20°C-Gefrierschrank aufbewahrt.

#### **2.3.3.2. Stimulation der Makrophagen**

Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit 1  $\mu$ g TNF- $\alpha$  und 2  $\mu$ g IFN- $\gamma$  stimuliert. Die Petrischale wurde mit 10 ml frischem, erwärmtem Makrophagen-Medium gefüllt und mit 10  $\mu$ l TNF- $\alpha$  und 10  $\mu$ l IFN- $\gamma$  stimuliert. Die Makrophagen wurden anschließend für 1 min, 10 min, 16 h, 24 h, 36 h oder 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium für spätere Untersuchungen bei -80°C eingefroren. Die Schale wurde dreimal mit DPBS ohne Ca/Mg gewaschen und die Makrophagen – wie unter 2.3.4. beschrieben – entnommen und eingefroren.

#### **2.3.4. Einfrieren der Makrophagen**

Bei Konfluenz der Makrophagen wurde die Schale dreimal mit DPBS ohne Ca/Mg gewaschen. Mit einem Zellschaber (Corning, New York) wurden nun die am Boden adhärennten Makrophagen abgeschabt. Die Restflüssigkeit mit den Zellen wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und in der Kühlzentrifuge für 5 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Makrophagen bei -80°C für die weitere Verwendung aufbewahrt.

## **2.4. Protein-Assay**

### **2.4.1. Herstellung des Lysispuffers**

Lysispuffer wurde hergestellt aus 20 ml TBS-Puffer [50 mM Tris (Sigma, Deisenhofen) +150 mM NaCl (Merck, Darmstadt)] und 200 µl Triton (Sigma, Deisenhofen). Zum Ansetzen von PMSF (Sigma, Deisenhofen) wurden 34,84 mg in 100 % Ethanol oder 100 % Methanol gelöst. Lysispuffer dient zur Zelllysierung, PMSF ist ein Proteaseinhibitor. Es wurde 5 µl PMSF zu 1 ml Lysispuffer hinzugefügt.

### **2.4.2. Präparation von Endometriosegewebe und Endometrium**

Die Gewebeproben wurden aus der -80°C Gefriertruhe entnommen und auf Eis gestellt. In einer Petrischale wurden mit zwei sterilen Einmalskalpellen die Proben auf Eis in Stücke von 0,3 mm zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und je nach Menge wurden 100-200 µl Lysispuffer zugegeben. Anschließend wurden die Gewebeproben – wie unter 2.4.3. beschrieben – weiter verarbeitet.

### **2.4.3. Bestimmung des Proteingehaltes**

Der Proteinassay erfolgte nach der BCA-Methode (Pierce, Rockford). Die Proben wurden je nach Pelletmenge in 10-200 µl Lysispuffer suspendiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer halben Stunde wurde für 10 Minuten bei 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und das Pellet verworfen. Nun wurde die BSA-Standardreihe hergestellt. 150 µl einer Ampulle Albumin Standard mit einer Konzentration von 2 mg/ml wurde mit 150 µl destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:1 verdünnt. Damit erhielt man eine Konzentration von 1 mg/ml. Nun wurde in Glasröhrchen die Verdünnungsreihe zu unterschiedlichen Endkonzentrationen folgendermaßen hergestellt:

BSA [µl]	-	2	4	8	12	16	20	40	60	80
H <sub>2</sub> O dest. [µl]	100	98	96	92	88	84	80	60	40	20

**Tab. 1:** Die BSA- (Bovine Serum Albumin-) Verdünnungsreihe mit destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O dest.) dient als Standardreihe für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben.

Anschließend wurde die Probenreihe hergestellt. Es wurden 1 µl Probe mit 99 µl destilliertem Wasser verdünnt. Der Rest der Proben wurde erneut bei -80°C eingefroren. Die Working-Reagenz wurde aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B hergestellt. Die 100 µl der Probenreihe und der Standardreihe wurden jeweils mit 2 ml Working-Reagenz aufgefüllt, gemischt und für 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach lies man die Glasröhrchen auf Raumtemperatur abkühlen. Es erfolgte die Kalibration mittels der Standardreihe und hiernach wurden die Probenkonzentrationen bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Dazu wurde 1 ml Lösung in eine 10×4×45 mm Küvette (No./REF 67.742, Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert, die Ergebnisse mit Hilfe des BioPhotometers (Eppendorf, Hamburg) ermittelt und mit dem Thermaldrucker (Seiko, Chiba) ausgedruckt.

## **2.5. Westernblot**

### **2.5.1. Herstellung der Pufferlösungen**

Die unten angeführten Puffer wurden mit 3 l destilliertem Wasser angesetzt und der pH-Wert mit dem pH-Meter (WTW, Weilheim) und HCl (Merck, Darmstadt) bzw. NaOH (Fluka, Neu-Ulm) eingestellt. Der pH-Wert des Runningpuffers musste nicht titriert werden. Anschließend wurde den Lösungen 10 % Methanol hinzugefügt.

#### **Anodenpuffer I:**

- 109,02 g Trizma (Sigma, Deisenhofen)
- pH 10,4

#### **Anodenpuffer II:**

- 9,09 g Trizma
- pH 10,4

#### **Kathodenpuffer:**

- 9,09 g Trizma, 15,75 g Aminocaproicacid (Sigma, Deisenhofen)
- pH 9,4

#### **Runningpuffer:**

- 9 g Trizma, 43,2 g Glycin (Roth, Karlsruhe), 3 g SDS (Roth, Karlsruhe)
- pH 8,4

Zur Herstellung von 10×TBS wurde in 800 ml destilliertem Wasser 80 g NaCl (Merck, Darmstadt), 2 g KCl (Merck, Darmstadt) und 30 g Tris (Sigma, Deisenhofen) gelöst. Es wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 7,4 titriert und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

### **2.5.2. Westernblot**

Zunächst wurde ein 10 % Ready Gel (Bio-Rad, Hercules) in die Biorad-Elektrophoresekammer eingespannt. Der Runningpuffer wurde eingefüllt, der Kamm des Gels vorsichtig entfernt und die Kammern mit Runningpuffer ausgespült. Damit die Elektroosmose einen konstanten Wert erreicht, wurde für 10 min bei 0,02 A ein Gelvorlauf gestartet. Der Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) wurde auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden aus der -80°C Gefriertruhe entnommen und auf Eis gestellt. Der Laemmli-Samplepuffer wurde unter dem Abzug aus 950 µl Laemmlipuffer (Bio-Rad, Hercules) und 50 µl Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) angesetzt. Anhand des Protein-Assays wurde bei 15-45 µg Proteingehalt die Proteinmenge (max. 16 µl) jeder Probe ausgerechnet und mit destilliertem Wasser zu einem einheitlichen Volumen (max. 16 µl) aufgefüllt. Zu einem Teil Probe und zu einem Teil RPN 800-Molekularmarker (Amersham, Buckinghamshire) wurden zwei Teile Laemmli-Samplepuffer hinzugefügt. Diese wurden für 3 Minuten auf 95°C im Thermoblock erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Gelvorlauf wurde gestoppt. In die erste Kammer wurde der Molekularmarker pipettiert und nachfolgend wurden die Proben eingebracht. Die Elektrophorese wurde bei 0,02 A gestartet, in den letzten 3 Minuten auf 0,03 A gesteigert und bei 150-160 V gestoppt.

Das Gel wurde von der Glasplatte entfernt und der Stackingteil mit einem Skalpell vorsichtig abgetrennt. Es wurde für 15 Minuten im Kathodenpuffer equilibriert. Sechs Filterpapiere (Schleicher & Schuell, Dassel) und eine PVDF-Membran (Amersham, Buckinghamshire) wurden passend zum Gel zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde 15 Sekunden in Methanol (Merck, Darmstadt), 5 min in destilliertem Wasser und anschließend 5 min im Anodenpuffer II equilibriert. In den letzten zwei Minuten wurden zwei Filterpapiere in Anodenpuffer I, ein Filterpapier in Anodenpuffer II und drei Filterpapiere in Kathodenpuffer gelegt. Für den Transfer wurde die untere Elektrode (Anode) des Semi-dry-Blotters (cti, Idstein) mit Anodenpuffer 1 befeuchtet. Nun

wurden erst die beiden Filterpapiere des Anodenpuffers I und dann das Filterpapier des Anodenpuffers II exakt übereinander auf die Graphitplatte gelegt. Mit einer 10 ml Pipette wurden die Luftbläschen aus den Filterpapieren ausgerollt. Anschließend wurden die PVDF-Membran und darüber das Gel platziert. Unter dem Gel liegende Luftblasen wurden mit Kathodenpuffer befeuchteten Fingern (Handschuhe!) entfernt. Nachdem die drei Filterpapiere des Kathodenpuffers luftbläschenfrei auf das Gel gelegt wurden, wurde der Deckel des Blotters (Kathode) mit Kathodenpuffer befeuchtet, auf den Gel-/Membran-/Filterpapierstapel gelegt und der Transfer bei 0,05 A gestartet. Nach 15 min wurde auf die doppelte Voltzahl (max. 14-15 V) erhöht und bei 22 V gestoppt. Die Banden des Molekulargewichtmarkers wurden mit Bleistift auf der PVDF-Membran verstärkt. Nun wurde die Membran für 1 Stunde in 5 % Milchpulver (Töpfer, Dietmannsried) auf einem Schüttler geblockt. Nach einer Stunde wurde die PVDF-Membran für 10 min in 1×TBS gelegt und anschließend über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C mit 100 µl anti-hCCR-1-Antikörper (R&D-Systems, Minneapolis) inkubiert. Dieser Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:200 mit 20 ml 1 % Milchpulver angesetzt. Am folgenden Tag wurde die Waschlösung mit 500 µl Tween20 (Promega, Madison) und 500 ml 1×TBS hergestellt und die Membran dreimal 10 min lang darin gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 2 µl anti-mouse IgG HRP-Antikörper (Promega, Madison) in 20 ml 1 % Milchpulver (Verdünnung 1:10.000) für 1,5 h in Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend wurde die PVDF-Membran dreimal 10 min in der Tween20-Lösung und 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Sie wurde 5 min mit der ECL-Lösung inkubiert, in eine Entwicklerkassette gelegt und zu unterschiedlichen Belichtungszeiten (15 sec - 5 min) entwickelt.

### 3. Ergebnisse

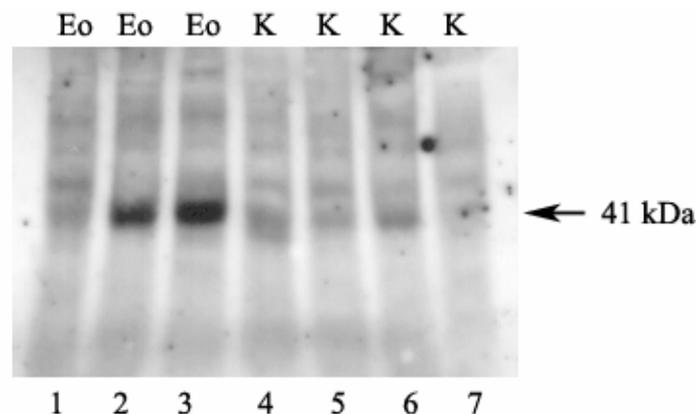
#### **3.1. Expression des CCR-1-Rezeptors in nativen und kultivierten**

##### **Peritonealmakrophagen**

Der Westernblot wurde mit zwei monoklonalen IgG-Antikörpern durchgeführt, die spezifisch für den menschlichen RANTES-Rezeptor CCR-1 sind. Das bekannte Molekulargewicht des Rezeptors beträgt 41 kDa.

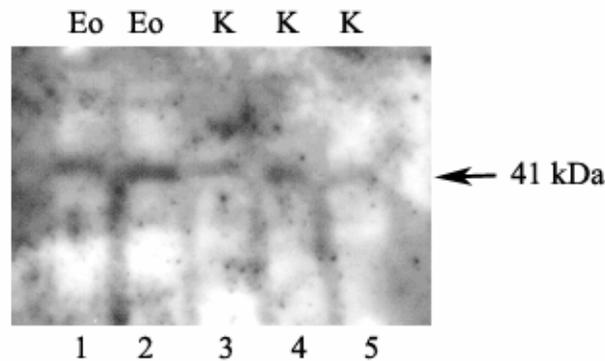
Zunächst wurden Peritonealmakrophagen kultiviert und der CCR-1-Proteingehalt mittels Westernblot bestimmt (Abb. 2); in einem zweiten Schritt wurde das CCR-1-Protein in nativen Peritonealmakrophagen von Kontroll- und Endometriosepatientinnen verifiziert (Abb. 3).

Abbildung 2 zeigt, dass kultivierte Peritonealmakrophagen von Endometriosepatientinnen (Spalten 1-3) im Vergleich zu kultivierten Makrophagen aus der Peritonealflüssigkeit von Kontrollpatientinnen ohne Endometriose (Spalten 4-7) eine 3-fach höhere Expression des CCR-1-Rezeptors aufweisen. Die Auswertung des Westernblots erfolgte mit dem AIDA-Programm, welches den Schwärzungsgrad der Proteinbande misst. Der Mittelwert des Proteingehaltes der Peritonealmakrophagen von Endometriosepatientinnen ( $274,02 \pm 136,7$ ) wurde dabei mit dem Mittelwert von Kontrollpatientinnen ( $81,39 \pm 45,83$ ) in Bezug gesetzt.



**Abb. 2:** Westernblot von kultivierten Peritonealmakrophagen. Eo = Endometriosepatientinnen, K = Kontrollpatientinnen. Der RANTES-Rezeptor CCR-1 mit einem Molekulargewicht von 41 kDa wird von Peritonealmakrophagen von Endometriosepatientinnen (1-3) dreimal mehr exprimiert als von Kontrollpatientinnen (4-7).

In Abbildung 3 erkennt man, dass native Peritonealmakrophagen einer Endometriosepatientin (Spalte 2) mehr CCR-1-Protein exprimieren als die von Kontrollpatientinnen (Spalten 3-5). In Spalte 1 wurden kultivierte Makrophagen aus dem Serum verwendet. Dabei ist bei Patientinnen mit Endometriose festzustellen, dass native Peritonealmakrophagen mehr CCR-1 exprimieren als kultivierte Monozyten aus dem Blut.

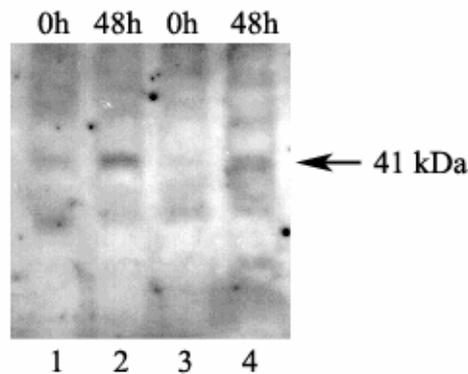


**Abb. 3:** Westernblot von nativen Peritonealmakrophagen (2-5) und kultivierten peripheren Blutmakrophagen (1). 1 und 2 stammen von Endometriosepatientinnen (Eo) und 3-5 von Kontrollpatientinnen (K). Der CCR-1-Rezeptor, der durch die 41 kDa-Molekularbande dargestellt ist, wird am stärksten in Peritonealmakrophagen von Endometriosepatientinnen exprimiert (2). Monozyten aus dem Blut von Endometriosepatientinnen (1) exprimierten den Rezeptor mehr als Makrophagen aus der Peritonealflüssigkeit von Kontrollpatientinnen (3-5), jedoch weniger als Peritonealmakrophagen von Endometriosepatientinnen. Jeweils 15 µg Proteine wurden geladen.

### 3.2. Effekt von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ auf die Expression des CCR-1-Rezeptors in Peritonealmakrophagen

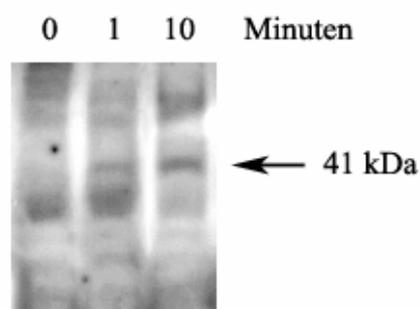
Um die Zytokinwirkung an Peritonealmakrophagen feststellen zu können, wurde bei zwei Endometriosepatientinnen (n=2) eine Unterkultur von derselben Makrophagenpopulation angelegt.

Nach 48-stündiger Stimulation der Makrophagen mit 2 µg IFN- $\gamma$  und 1 µg TNF- $\alpha$  (2+4) war ein zweifacher Anstieg der CCR-1-Expression festzustellen (Abb. 4).



**Abb. 4:** Westernblot von unstimulierten (1,3) im Vergleich zu 48 Stunden mit 2  $\mu\text{g}$  IFN- $\gamma$  und 1  $\mu\text{g}$  TNF- $\alpha$  stimulierten (2,4) Makrophagen. Bei zytokinstimulierten Makrophagen ist ein zweifacher Anstieg der CCR-1-Expression zu bemerken. 1-4 sind Peritonealmakrophagen von Endometriosepatientinnen (n=2). Der CCR-1-Rezeptor ist durch die 41 kDa-Proteinbande dargestellt. Jeweils 15  $\mu\text{g}$  Proteine wurden geladen.

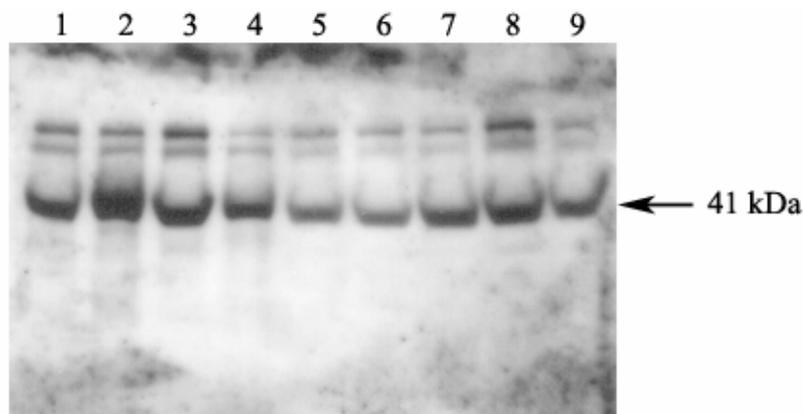
Um Unterschiede in der Wirkungsdauer der Zytokine festzustellen, wurde eine Stimulationsreihe über drei Zeiten hergestellt. Von n=3 Kontrollen wurde eine Makrophagenkultur unstimuliert und jeweils eine 1 Minute und 10 Minuten mit 2  $\mu\text{g}$  IFN- $\gamma$  und 1  $\mu\text{g}$  TNF- $\alpha$  stimuliert. Dabei zeigten Peritonealmakrophagen von Kontrollpatientinnen schon nach kurzer Stimulation eine zunehmende Expression des CCR-1-Rezeptors (Abb. 5).



**Abb. 5:** Westernblot einer Stimulationsreihe von Peritonealmakrophagen von Kontrollpatientinnen. Bereits nach kurzer Stimulation mit 2  $\mu\text{g}$  IFN- $\gamma$  und 1  $\mu\text{g}$  TNF- $\alpha$  ist eine zunehmende CCR-1-Expression zu bemerken. Die Proteinbande bei 41 kDa stellt den CCR-1-Rezeptor dar. Es wurden jeweils 15  $\mu\text{g}$  Proteine geladen.

### 3.3. Expression des CCR-1-Rezeptors in Endometriosegewebe und Endometrium

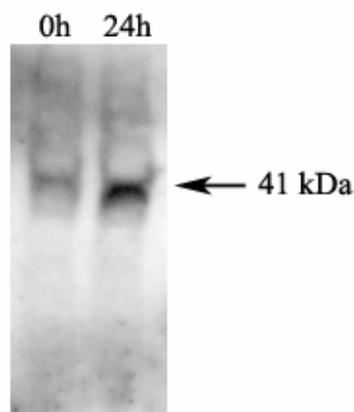
Natives, direkt nach der operativen Entnahme schockgefrorenes Gewebe wurde für die Bestimmung des CCR-1-Proteins aufgetaut und - wie unter 2.4.2. beschrieben - verarbeitet. Das Endometriosegewebe (n=10) stammte vom Ovar oder Darm und Endometrium wurde von Patientinnen mit Endometriose oder Adenomyosis uteri (n=5) oder von gesunden Patientinnen (n=5) verwendet. In allen Gewebearten wurde mittels Westernblot der CCR-1-Rezeptor nachgewiesen (Abb. 6). Die Resultate wurden durch zwei weitere Westernblots (ohne Abbildung) bestätigt. Es zeigte sich, dass Endometriosegewebe (Mittelwert:  $108,94 \pm 24,23$ ) 2,5-fach mehr CCR-1-Protein enthielt als Endometrium von Patientinnen ohne Endometriose (MW:  $43,52 \pm 22,2$ ). Die CCR-1-Expressionen waren beim Endometrium mit Adenomyosis uteri und beim Endometrium mit Endometriose (MW:  $66,1 \pm 15,12$ ) im Vergleich zum Endometrium von gesunden Kontrollen etwa gleich erhöht.



**Abb. 6:** Westernblot von nativem Gewebe. 1+2=Endometriose AFS-Stadium IV, 3=Endometriose AFS-Stadium III, 4=Endometriose AFS-Stadium I, 5-7=Endometrium ohne Endometriose, 8+9=Endometrium bei Endometriose AFS-Stadium III. Der CCR-1-Rezeptor wird am meisten von dem Endometriosegewebe (1-4) exprimiert, und zwar 2,5-fach mehr als von dem Endometrium von Kontrollpatientinnen und 1,65-fach mehr als von dem Endometrium von Endometriosepatientinnen. Das Endometrium von Endometriosepatientinnen (8+9) bildet wiederum 1,5-fach mehr CCR-1-Protein als das Endometrium von Kontrollpatientinnen (5-7). Jeweils 15  $\mu$ g Proteine wurden geladen. Die Molekularbande um 41 kDa weist die Expression des CCR-1-Proteins nach.

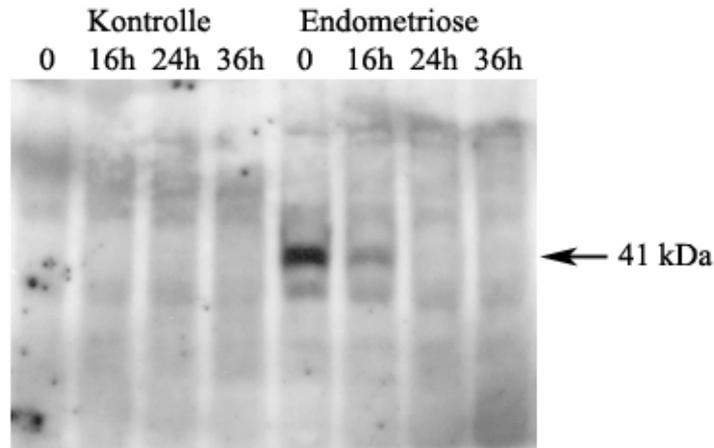
### 3.4. Effekt von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ auf die Expression des CCR-1-Rezeptors in Stromazellen von Endometriosegewebe und Endometrium

Um die Wirkung der Zytokine auf einzelne Zellarten festzustellen, wurde frisches Endometrium oder Endometriosegewebe in Stroma- und Epithelzellen aufgetrennt und kultiviert. Stromazellen wurden zu unterschiedlichen Stimulationszeiten mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  inkubiert. Abbildung 7 zeigt in Spalte 1 unstimulierte, kultivierte Stromazellen von Endometriosegewebe und in Spalte 2 die 24-stündige zytokinstimulierte Zellkultur von derselben Gewebeprobe. Man bemerkt unter Zytokineinfluß eine deutliche Zunahme der Expression des CCR-1-Proteins.



**Abb. 7:** Westernblot von kultivierten Stromazellen. 0 h und 24 h sind Stromazellen von einer Endometriosepatientin. Nach 24-stündiger Stimulation mit 2  $\mu\text{g}$  IFN- $\gamma$  und 1  $\mu\text{g}$  TNF- $\alpha$  ist eine deutliche Zunahme der CCR-1-Expression zu bemerken. Die Molekularbande um 41 kDa weist die Expression des CCR-1-Proteins nach.

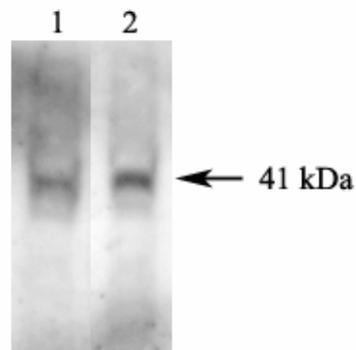
In Abbildung 8 wurde Endometrium von einer Kontrollpatientin mit dem Endometrium einer Patientin mit gleichzeitiger Endometriose und Adenomyosis uteri miteinander verglichen. Die beiden Stromazellkulturen wurden mit 2  $\mu\text{g}$  IFN- $\gamma$  und 1  $\mu\text{g}$  TNF- $\alpha$  zu denselben Stimulationszeiten inkubiert. Die Stromazellen von dem Endometrium der Kontrollpatientin exprimierten auch nach Stimulation keinen CCR-1-Rezeptor. Unstimulierte Stromazellen von der Endometriosepatientin enthielten den CCR-1-Rezeptor, wohingegen nach der Zytokinstimulation die Expression deutlich down-reguliert wurde.



**Abb. 8:** Westernblot von kultivierten Stromazellen. Die Stromazellen wurden jeweils von dem Endometrium von einer Kontrollpatientin und von einer Patientin mit Endometriose und Adenomyosis uteri gewonnen. Auch nach Zytokinstimulation mit 2  $\mu\text{g}$  IFN- $\gamma$  und 1  $\mu\text{g}$  TNF- $\alpha$  exprimierten Stromazellen von der Kontrollpatientin kein CCR-1-Protein. Bei den Stromazellen von der Endometriosepatientin wurde der CCR-1-Rezeptor mit zunehmender Stimulationsdauer deutlich down-reguliert. Der Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 41 kDa.

### 3.5. Expression des CCR-1-Rezeptors in Epithelzellen

Wir haben mit Hilfe des Westernblots nachgewiesen, dass in einem Pool von Epithelzellen der CCR-1-Rezeptor vorhanden war. Abbildung 9 zeigt einen Vergleich der Expression des RANTES-Rezeptors von unstimulierten, kultivierten Stromazellen (Spalte 1) mit der Rezeptorexpression von unstimulierten, kultivierten Epithelzellen (Spalte 2). Es ist hierbei zu bemerken, dass Epithelzellen mehr CCR-1-Protein exprimieren als Stromazellen. Leider konnten wir aufgrund der geringen Ausbeute keine Stimulationsreihe von Epithelzellen herstellen.



**Abb. 9:** Westernblot von einem Pool aus unstimulierten, kultivierten Epithelzellen (2) im Vergleich zu unstimulierten, kultivierten Stromazellen von einer Endometriosepatientin (1). Epithelzellen exprimieren hierbei mehr CCR-1-Protein, 41 kDa-Bande, als Stromazellen.

## **4. Diskussion**

Während der letzten Jahre wurden zahlreiche Untersuchungen publiziert, die einen Zusammenhang zwischen Endometriose und Störungen des Immunsystems vermuten lassen. Da die retrograde Menstruation einen physiologischen Prozess darstellt (38), wurden nach Veränderungen im Immunsystem Endometriosekranker gesucht, die eine Implantation der Endometrioseherde begünstigen. Unterschiede sowohl in der zellulären als auch in der humoralen Immunabwehr wurden im Vergleich zu Gesunden entdeckt. Veränderte B-Zellaktivierung verbunden mit hohen Immunglobulinspiegeln, erhöhte Konzentrationen von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten, sowie hohe Spiegel an Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren wurden bei Frauen mit Endometriose beschrieben (8,32,36,37,42,66-68,73,74,78,113,119). Endometriale Zellen zeigten sich ferner resistent gegenüber der Apoptose (23).

Gegenstand aktueller Forschungen ist die Aufdeckung von Genpolymorphismen im Zusammenhang mit Endometriose (9,16,54,61,115,121). Diskutiert wird beispielsweise die Variabilität am Genlocus von Pro12Ala an PPAR- $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor) (Dogan et al., zur Publikation angenommen). Semino et al. gehen ferner davon aus, dass das HLA-B7-Allel, welches bei ungefähr 6 % der weißen Bevölkerung zu finden ist, die zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen inhibiert (105). Die Aktivität dieser Zellen ist in der Peritonealflüssigkeit und im Serum von Endometriosepatientinnen im Vergleich zu fertilen Patientinnen nachweislich vermindert (66).

Haney et al. (40) berichteten über Makrophagen als die häufigste Subpopulation der Leukozyten in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen. Weitere Studien zeigten, dass der Aktivierungsgrad der Makrophagen erhöht ist (37,95), und dass deren Konzentration in der Peritonealflüssigkeit proportional zum Schweregrad der Endometriose gesteigert ist (60). Da aktivierte Makrophagen die dominierenden Immunzellen in der Peritonealflüssigkeit sind, spielen vermutlich auch ihre sezernierten Produkte eine wesentliche Rolle bei der Endometriose. In Betracht kommen dabei unter anderem Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und das Chemokin RANTES.

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) wird von Makrophagen gebildet, aber auch von Lymphozyten, Neutrophilen, NK-Zellen und einigen nicht-hämatopoetischen Zellen (66), wie z.B. endometrialen Stroma- und Epithelzellen (51,84). Seine Hauptfunktion besteht darin, eine Kaskade von Zytokinen und anderen Faktoren, die mit Entzündungsreaktionen verbunden sind, auszulösen. Die Konzentration von TNF- $\alpha$  ist in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose erhöht (86) und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (26,88). Es ist noch weitgehend ungewiss, woher die erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen stammen, aber *in vitro* Studien zeigten, dass Peritoneal- (35,58) und Blutmakrophagen (15) dieser Patientinnen ebenfalls eine gesteigerte TNF- $\alpha$ -Proteinsekretion aufwiesen. Braun et al. (14) haben kürzlich eine klinische Studie über die Beziehung der Peritonealflüssigkeit zur endometrialen Proliferation veröffentlicht. Dabei zeigte sich, dass die in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen die Proliferation von autologen und heterologen endometrialen Zellkulturen von Frauen mit Endometriose steigerten. Nach Zugabe des löslichen TNF-Rezeptors Etanercept wurde diese Proliferation blockiert.

Ein weiteres immunomodulatorisches Zytokin ist Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Abhängig von den Milieubedingungen übt es proliferierende, differenzierende, hemmende oder apoptotische Funktionen aus. IFN- $\gamma$  wird von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen produziert (62). Endometriale Stromazellkulturen produzierten ebenfalls IFN- $\gamma$  (110). Die Konzentrationen von Makrophagen und T-Lymphozyten, die IFN- $\gamma$  mRNA bildeten, sind im Endometriosegewebe höher als im Endometrium (19,62).

Die Kombination von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induzierte in Endothelzellen (72) und in eutopen und ektopen endometrialen Stromazellen eine erhöhte RANTES-Produktion (7). Dabei geht man davon aus, dass einerseits IFN- $\gamma$  die Zellen für den stimulierenden Effekt von TNF- $\alpha$  sensibilisiert und andererseits IFN- $\gamma$  als eine Art „Makrophagen-aktivierender Faktor“ die Makrophagen zur Produktion von TNF- $\alpha$  stimuliert (30). Da Makrophagen die vorherrschenden Immunzellen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen sind und die beiden erwähnten Zytokine, die von Makrophagen sezerniert werden, ebenfalls erhöht vorhanden sind, wurde in dieser Forschungsarbeit der Effekt beider Mediatoren auf die Expression des Rezeptors CCR-1 untersucht.

RANTES ist ein 8 kDa  $\beta$ -Chemokin, das überwiegend chemotaktisch auf Monozyten wirkt. Dieses  $\beta$ -Chemokin (auch CC-Chemokin genannt) bindet mit unterschiedlicher Affinität an CCR-1- bis CCR-5-Rezeptoren. Die höchste Affinität besitzt dabei der CCR-1-Rezeptor (108). Er wird unter anderem von Makrophagen gebildet und wirkt chemotaktisch auf diese Immunzellen und auf T-Gedächtniszellen, Eosinophile, Basophile, NK-Zellen und dendritische Zellen (30). Die Konzentration von RANTES ist in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen erhöht und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (60). Weitere Forschungsergebnisse zeigten, dass RANTES nicht nur von Immunzellen gebildet wird, sondern auch von eutopen und ektopen endometrialen Stromazellen (42). Die Produktion von RANTES *in vitro* erfolgte jedoch erst nach Stimulation der Stromazellen mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Dabei lagen RANTES mRNA positive Stromazellen in der Nähe von TNF- $\alpha$  positiven Epithel- und Stromazellen (Hornung et al., 2001). Eine ähnliche Studie wurde an Primaten durchgeführt (3). Hierbei wurde die RANTES-Produktion in endometrialen Epithelzellen untersucht. Nach 72-stündiger Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  erhielt man im Vergleich zur basalen Produktion einen nahezu 500-fachen Anstieg der RANTES-Bildung.

In beiden, voneinander unabhängigen Forschungsarbeiten wurde der Ligand RANTES nach Stimulation im endometrialen Gewebe erhöht nachgewiesen. Aufgrund dieser Resultate wurde in der vorliegenden Studie die Expression des RANTES-Rezeptors CCR-1 quantifiziert und dessen veränderter Status nach einer Stimulation verifiziert.

Andere tierexperimentelle Untersuchungen beschrieben die Wirkung von RANTES im Sinne einer Produktion von proinflammatorischen Mediatoren auf dendritische Zellen von Mäusen. RANTES induzierte die Expression von Transkripten für die CXC-Chemokine KC und MIP-2, die CC-Chemokine MIP-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  und die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 (Interleukin-6). Außerdem wurde nach vier Stunden eine Autoinduktion des RANTES-Transkriptes beobachtet. Die Reaktionen waren chemokinspezifisch, denn obwohl MIP-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  strukturelle Homologen von RANTES sind und auch an die CCR-1- und CCR-5-Rezeptoren binden, waren sie nicht in der Lage, die Chemokin- oder Zytokinsynthese zu stimulieren (29).

In menschlichen Monozyten wurden ähnliche, jedoch nicht in allen Fällen übereinstimmende Ergebnisse beobachtet. Von den untersuchten 5600 Genen stimulierte RANTES konsistent 42. Dabei waren unter anderem Transkripte für IL-1 $\beta$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, C5a- und CCR-1-Rezeptoren vorhanden. Andere Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden nicht stimuliert (70).

Zusammenfassend kann man sagen, dass RANTES sowohl die Bildung seines eigenen Rezeptors, als auch die seines eigenen Transkriptes induziert. Weshalb dieser doppelte Verstärkermechanismus erfolgt, ist noch unklar. Da Chemokine parakrin oder autokrin wirken, aber nicht endokrin, könnte spekuliert werden, dass durch diese Wirkungsweise eine einzelne Zelle in die Lage versetzt wird, ähnlich einer Kettenreaktion, benachbarte Zellen zu stimulieren und unzählige Immunzellen anzulocken. Durch diesen Effekt vermögen Chemokine ihre lokal begrenzte Wirkung zu verstärken und eine weit reichende, komplexe Reaktion hervorzurufen. Es scheint jedoch ein limitierender Faktor vorhanden zu sein, denn nicht alle Stromazellen bilden RANTES (45). Ob und wie diese Stromazellen übersprungen werden, damit die Kaskade nicht unterbrochen wird, ist noch unbekannt.

Chemokine sind Entzündungsmediatoren, die die chemotaktischen und zytotoxischen Funktionen verschiedener Zellen, wie z.B. Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen und Lymphozyten vermitteln. Die meisten Chemokine aktivieren mehr als einen Rezeptor auf der Oberfläche von Leukozyten. Andererseits reagiert ein Rezeptor auf mehrere Chemokine. So binden die  $\beta$ -Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2, MCP-3 und Leukotaktin-1 (122) mit unterschiedlicher Affinität an den CCR-1-Rezeptor.

Der CCR-1-Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 41 kDa (108) und gehört zur Großfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die sieben transmembranäre Domänen besitzen (92). Die Chemokinese der CC-Rezeptor-exprimierenden Zellen wird über Phospholipase C-Aktivierung, intrazelluläre Kalziumfreisetzung und Exozytose vermittelt. Diese durch CCR-1-vermittelte Reaktionen auf RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MCP-2 werden über zwei verschiedene Mechanismen reguliert. Einmal über die Phosphorylierung mittels Rezeptor sowie über einen noch unbekanntem Mechanismus, der unabhängig von der Phosphorylierung zu sein scheint (87).

Hornung et al. zeigten, dass CCR-1 und CCR-5 in U937-Zellen und Peritonealmakrophagen exprimiert wurden. Die Expression von CCR-1 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  konnte in beiden Zellarten hochreguliert werden (43).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Westernblot das CCR-1-Protein in eutopem und ektopem Endometrium, Stromazellen, Epithelzellen, Peritonealmakrophagen und Blutmakrophagen verifiziert. Daneben wurden die Effekte von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf die Rezeptorexpression untersucht.

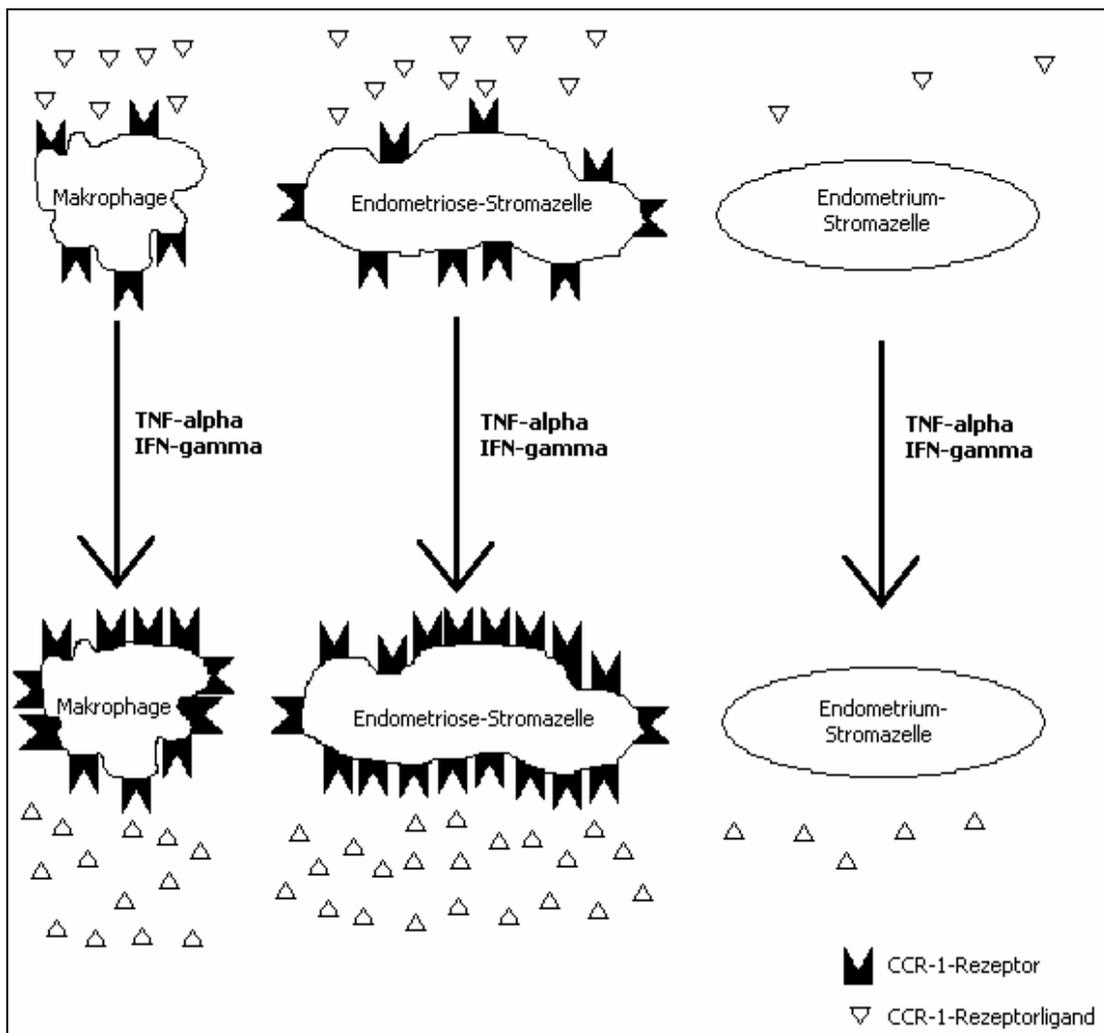
Native Peritonealmakrophagen von Endometriosepatientinnen exprimierten mehr CCR-1 als native Makrophagen von Kontrollpatientinnen. Beim Vergleich der kultivierten Peritonealmakrophagen beider Patientengruppen zeigte sich, dass der CCR-1-Rezeptor auf Makrophagen bei Endometriose dreimal stärker exprimiert wurde. Die 48-stündige Stimulation der Peritonealmakrophagen mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  führte ferner zu einem deutlichen Anstieg des CCR-1-Rezeptors. Während der Stimulationsdauer von 0 min, 1 min und 10 min bemerkten wir in Makrophagen von Kontrollen eine zunehmende Hochregulierung des Rezeptors.

In einem Fall konnten wir in kultivierten Blutmakrophagen von Endometriosepatientinnen ebenfalls den CCR-1-Rezeptor nachweisen.

Da RANTES, ein Chemokin mit der höchsten Affinität für CCR-1, in Endometrium- und Endometriosezellkulturen nachgewiesen wurde (45,46), haben wir den CCR-1-Rezeptor in eutopen und ektopen Endometrium bestimmt. Unsere Ergebnisse demonstrierten, dass CCR-1 in Endometriosegewebe 2,5-mal mehr exprimiert wurde als im normalen Endometrium. Um Unterschiede in verschiedenen Zellarten zu identifizieren, wurden Stroma- und Epithelzellkulturen angelegt. Unsere Zellkulturen waren von hohem Reinheitsgrad von 95 % und enthielten nach der etablierten Methode von Ryan et al. (94) nur sehr geringe Kontaminationen. In beiden Zellarten konnte der Rezeptor nachgewiesen werden. Stromazellen vom Endometriosegewebe waren in der Lage, den CCR-1-Rezeptor zu exprimieren. Zudem zeigte die 24-stündige Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  die hochregulierte Expression des Rezeptors. Im Endometrium von Endometriosepatientinnen wurden bezüglich der Stimulation andere Beobachtungen gestellt. Eine Stimulationsreihe mit 0 min, 16 h, 24 h und 36 h zeigte,

dass die Rezeptorexpression kontinuierlich down-reguliert wurde. Endometriale Stromazellen von gesunden Patientinnen exprimierten dagegen kein CCR-1, auch nach Stimulation wurde der Rezeptor nicht synthetisiert.

Aufgrund der geringen Ausbeute an Epithelzellen war es uns nicht möglich, diese zu stimulieren. Wir haben jedoch nachgewiesen, dass der CCR-1-Rezeptor auch in dieser Zellart exprimiert wurde. Die erhobenen Daten werden in Abb. 10 verdeutlicht.



**Abb. 10:** Nach Stimulation von Makrophagen und Endometriose-Stromazellen wurde der CCR-1-Rezeptor vermehrt exprimiert. Im Endometrium von gesunden Kontrollen wurden CCR-1-Rezeptoren weder vor, noch nach Stimulation exprimiert.

Bei Vorläuferzellen der Monozyten, den hämatopoietischen Stammzellen (CD34), wurde über ähnliche Ergebnisse berichtet. Mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  stimulierte CD34+-Zellkulturen exprimierten signifikant MIP-1 $\alpha$ -Rezeptoren. Mit TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) stimulierte Zellkulturen zeigten keinen Einfluß auf die Rezeptor-expression, wohingegen Kulturen von Kontrollen eine erniedrigte Expression des MIP-1 $\alpha$ -Rezeptors aufwiesen. Durch Immunfluoreszenz wurden die Rezeptoren CCR-1, CCR-4 und CCR-5 identifiziert, wobei mehr CCR-1- und CCR-5- als CCR-4-Rezeptoren exprimiert wurden (25).

Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte in monozytischen U937-Zellen die Rezeptor-expression nach Zugabe von IFN- $\gamma$  auf. Dabei wurde nach Stimulation die mRNA-Expression von CCR-1, CCR-3 und CCR-5 hochreguliert. Es wurde auch die Wirkung der  $\beta$ -Chemokine RANTES und MIP-1 $\alpha$  untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass mit IFN- $\gamma$  behandelte U937-Zellen mit einer höheren intrazellulären Kalziumfreisetzung auf die  $\beta$ -Chemokine reagierten als unstimulierte U937-Zellen (124).

Penton-Rol et al. (83) berichteten im selben Jahr über den inhibierenden Effekt von IFN- $\gamma$  auf die Expression des CCR-2-Rezeptors in menschlichen Monozyten. Andere Chemokinrezeptoren wie CCR-1, CCR-3 und CCR-5 wurden nicht wesentlich beeinflusst (83).

In menschlichen Neutrophilen bewirkte der Zusatz von IFN- $\gamma$  eine Hochregulierung der CCR-1- und CCR-3-Rezeptoren. Durch diese Hochregulation sensibilisiert IFN- $\gamma$  die Zellen auf CC-Chemokine wie RANTES und MIP-1 $\alpha$ , mit einer Chemotaxis zu reagieren (13).

Nicht nur IFN- $\gamma$ , sondern auch das Zytokin GM-CSF (Granulocyte-Makrophage Colony Stimulating Factor) regulierte in Neutrophilen die Expression von CCR-1-mRNA und -Protein hoch, woraufhin RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MCP-3 in der Lage waren, eine Migration der Zellen zu bewirken. Unstimulierte Zellen zeigten keine Chemotaxis (17).

In einer kürzlich veröffentlichten Forschungsarbeit wurde RANTES und dessen Rezeptor, CCR-1, in oralen Flechten (OLP) untersucht. Auch in dieser entzündlichen Erkrankung exprimierten T-Zellen und Mastzellen RANTES und CCR-1. Der Überstand von T-Zelllinien, die von OLP-Patienten isoliert wurden, stimulierte in einer menschlichen, leukämischen Mastzelllinie (HMC-1) die CCR-1 mRNA-Expression. In

diesem Überstand wurde IFN- $\gamma$  entdeckt. Primär wurde jedoch die Wirkung von TNF- $\alpha$  überprüft, und es stellte sich dabei heraus, dass das Zytokin die mRNA-Expression von CCR-1, CCR-4 und CCR-5 in HMC-1 stimulierte (123). Man ging folglich davon aus, dass das im Überstand von T-Zellen vorhandene TNF- $\alpha$  in Mastzellen die CCR-1-Expression hochregulierte.

Viele verschiedene Zytokine beeinflussen die CC-Rezeptoren in unterschiedlicher Weise. So verursachte IFN- $\alpha$ , ähnlich wie IFN- $\gamma$ , eine erhöhte Expression der CCR-1- und CCR-3-Rezeptoren in menschlichen Blutmonozyten (125). Colantonio et al. (21) berichteten über einen additiven Effekt von IFN- $\alpha$  und IL-12 auf die Expression von CCR-1, jedoch nur in undifferenzierten Th1-Zellen. In bereits differenzierten Zellen übten IL-12 und IFN- $\alpha$  unterschiedliche Wirkungen aus. Während IL-12 die Expression von CCR-1 erhöhte, bewirkte IFN- $\alpha$  keine Hochregulierung. Die Ergebnisse wurden dadurch untermauert, dass die mit IL-12 behandelten Th1-Zellen eine verstärkte Reaktion zu MIP-1 $\alpha$ , im Sinne einer erhöhten intrazellulären Kalziummobilisierung aufwiesen (21).

Die CCR-1 mRNA-Expression wurde ferner durch IL-2 in adherenten NK-Zellen (52) und durch TGF- $\beta$ 1 in Astrozyten der Maus (39) stimuliert.

Die Expression des CCR-2-Rezeptors wurde in Monozyten stark durch LPS (bacterial lipopolysaccharide) und geringer durch TNF- $\alpha$  supprimiert, wohingegen IL-2 stimulierend wirkte. Das Endotoxin beeinflusste dabei nicht die Transkription, sondern reduzierte die Halbwertszeit der CCR-2-mRNA von 90 Minuten auf 45 Minuten. Zwei andere Rezeptoren, CCR-1 und CCR-5, wurden durch LPS ebenfalls geringgradig down-reguliert (103).

Weitere Forschungsarbeiten wiesen den Rezeptor auch in anderen Körperzellen nach, so enthielten auch Thrombozyten den CCR-1-Rezeptor (20) und synthetisierten RANTES (63). Die Hauptfunktion der Thrombozyten ist die Hämostase und die Instandhaltung der Gefäßwand, zusätzlich wurde über eine Rolle in Entzündungsreaktionen und Abwehrmechanismen diskutiert (20).

Weber et al. (117) beschrieben die unterschiedliche Expression der RANTES-Rezeptoren CCR-1 und CCR-5 in Monozyten, T1-Helferzellen und T-Gedächtniszellen. Menschliche Blutmonozyten exprimierten hohe CCR-1-Spiegel und niedrige CCR-5-

Spiegel, wohingegen Th1-Zellen und T-Gedächtniszellen generell wenig CCR-1 und viel CCR-5 bildeten. CCR-3, ein RANTES-Rezeptor der mit Th2-Zellen und Eosinophilen assoziiert ist, wurde nicht von Monozyten oder Th1-ähnlichen Klonen exprimiert. Die deutlichen Unterschiede in der CCR-1- und CCR-5-Expression dieser Zellen lassen darauf schließen, dass diese Rezeptoren während der entzündlichen Rekrutierung der genannten Leukozytenarten selektiv verwendet werden.

Einen weiteren Beweis für eine gewisse Rezeptorselektivität liefert die klinische Untersuchung von Kaufmann et al. (57). Das veränderte Rezeptorprofil der Zelloberfläche während des Differenzierungsprozesses der Monozyten zu Makrophagen wurde dabei beschrieben. Während Monozyten vornehmlich CCR-2-Rezeptoren besaßen und auf MCP-1 reagierten, enthielten Makrophagen vor allem CCR-1- und CCR-5-Rezeptoren. Aus diesem Grund zeigten differenzierte Makrophagen eine starke chemotaktische Reaktion auf MIP-1 $\alpha$  und nur eine schwache auf MCP-1. In undifferenzierten Monozyten fielen die Reaktionen auf diese  $\beta$ -Chemokine entsprechend umgekehrt aus.

Endometriose ist vermutlich eine Erkrankung mit entzündlicher Komponente, die im Gegensatz zur Endometritis nicht lokal begrenzt ist. Immer mehr Forschungsergebnisse untermauern diese Aussage. Neben den bereits beschriebenen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und dem Chemokin RANTES wurden weitere inflammatorische Substanzen entdeckt, die bei Endometriosepatientinnen erhöht waren. Darunter gehörten Zytokine, wie IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 und IL-10, Chemokine, wie MCP-1 und Eotaxin und Wachstumsfaktoren, wie TGF, PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (endothelial cell growth factor), VEGF (vascular endothelial cell-derived growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), CSF-1 (colony-stimulating factor-1) und GM-CSF (1,4,6,10,50,66,75,79,85,90,91,112,114). Alle diese Mediatoren induzieren durch eine zellvermittelte Kaskadenreaktion komplexe physiologische Reaktionen, deren Ursache bei der Endometriose noch nicht geklärt ist. Wir haben bei Endometriosepatientinnen einen Rezeptor, der auf  $\beta$ -Chemokine reagiert, nachgewiesen. Dieser CCR-1-Rezeptor wurde wie sein Ligand, RANTES, vermehrt exprimiert. Der veränderte Rezeptorstatus, den unsere Ergebnisse verdeutlichen, entspricht somit dem der propagierten veränderten Immunitätslage dieser Patientinnen.

Therapeutische Ansätze, die diesen Rezeptor unterdrücken und somit die Wirkung der Chemokine verhindern würden, könnten in Betracht gezogen werden. Die im Zusammenhang mit der veränderten Immunabwehr stehenden Symptome der Endometriose könnten dadurch in einem gewissem Ausmaß supprimiert werden.

## **5. Zusammenfassung**

Endometriose ist durch das heterotope Vorkommen von Endometrium außerhalb der Uterushöhle charakterisiert. Klassische Symptome dieser benignen Erkrankung sind Dysmenorrhoe, Dyspareunie, chronische Unterbauchschmerzen und Infertilität. Die genaue Ätiologie der Endometriose ist noch nicht völlig geklärt. Die Theorie der retrograden Menstruation verbunden mit Veränderungen der zellvermittelten und humoralen Immunität findet jedoch eine breite Akzeptanz. In diesem Zusammenhang wird dem Chemokin RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) eine Schlüsselrolle zugesprochen. Dieser inflammatorischer Mediator ist wie seine Zielzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten, und deren sezernierenden Produkte IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen vermehrt vorzufinden. RANTES agiert hauptsächlich über den CCR-1-Rezeptor. Der CCR-1-Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 41 kDa und gehört zur Großfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er wird durch sieben transmembranäre Segmente auf der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert. Zu diesen Zellen gehören Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophile und Mastzellen, aber auch in anderen Körperzellen, wie z.B. Astrozyten und Thrombozyten wurde der RANTES-Rezeptor CCR-1 beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der CCR-1-Rezeptor mittels Westernblot in Peritonealmakrophagen, Blutmonozyten, Endometriosegewebe, Endometrium und in Stroma- und Epithelzellen nachgewiesen. In den Zellen von Endometriosepatientinnen wurde das CCR-1-Protein im Vergleich zu den Zellen von Kontrollpatientinnen vermehrt exprimiert. Lediglich in den Stromazellen von Patientinnen ohne Endometriose wurde kein CCR-1 entdeckt. Auch in einem Pool von Epithelzellen war der CCR-1-Rezeptor vorhanden.

Da der Spiegel der Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  ebenfalls bei Endometriose erhöht ist, wurde deren Wirkung auf die Expression des CCR-1-Rezeptors in Peritonealmakrophagen und Stromazellen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Zytokine in Peritonealmakrophagen beider Patientinnengruppen die CCR-1-Expression im Sinne einer Up-regulation beeinflussten. Die Stromazellen reagierten auf die Zytokinstimulation

unterschiedlich: Während die Endometriosezellen den Rezeptor hochregulierten, wurde in den Endometriumzellen der Patientinnen mit Endometriose das CCR-1-Protein nach einem kurzem Anstieg down-reguliert. In den Endometriumstromazellen von Patientinnen ohne Endometriose wurde auch nach Stimulation kein CCR-1-Rezeptor exprimiert.

Auf der Grundlage unserer Resultate könnten neue therapeutische Ansätze entwickelt werden, um die klinisch wichtigen Fertilitätschancen zu erhöhen. In Betracht käme hierbei der Einsatz von CCR-1-Rezeptorblockern. Durch diese neue Therapieoption hoffen wir, zunächst die Inflammation reduzieren zu können, um dadurch die mit der Endometriose assoziierten Symptome zu mildern, und ferner eine Erhöhung der Schwangerschaftsraten zu erzielen.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Akoum, A., Lemay, A., Paradis, I., Rheault, N., Maheux, R. (1996)  
Secretion of interleukin-6 by human endometriotic cells and regulation by proinflammatory cytokines and sex steroids.  
Hum. Reprod., 11: 2269-2275
2. Akoum, A., Turcot-Lemay, L., Lemay, A., Maheux, R., McColl, S. (1996)  
Elevated concentration and biologic activity of monocyte chemotactic protein-1 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis.  
Fertil. Steril., 66: 17-23
3. Altman, G.B., Gown, A.M., Luchtel, D.L., Baker, C. (1999)  
RANTES production by cultured primate endometrial epithelial cells.  
Am. J. Reprod. Immunol., 42: 168-174
4. Anderson, D.J., Hill, J.A. (1987)  
Interleukin-1 and endometriosis.  
Fertil. Steril., 48: 894-895
5. Arici, A., MacDonald, P.C., Casey, M.L. (1994)  
Regulation of monocyte chemotactic protein-1 gene expression in human endometrial cells in cultures.  
Mol. Cell. Endocrinol., 107: 189-197
6. Arici, A., Tazuke, S.I., Attar, E., Kliman, H.J., Olive, D.L. (1996)  
Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells.  
Mol. Hum. Reprod., 2: 40-45
7. Arima, K., Nasu, K., Narahara, H., Fujisawa, K., Matsui, N., Miyakawa, I. (2000)  
Effects of lipopolysaccharide and cytokines on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells.  
Mol. Hum. Reprod., 6: 246-251
8. Badawy, S.Z.A., Cuenca, V., Marshall, L., Munchback, R., Rinas, A.C., Coble, D.A. (1984)  
Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis.  
Fertil. Steril., 42: 704-708
9. Baranova, H., Bothorishvilli, R., Canis, M., Albuisson, E., Perriot, S., Glowaczower, E., Bruhat, M.A., Baranov, V., Malet, P. (1997)  
Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population.  
Mol. Hum. Reprod., 3: 775-780

10. Bergqvist, A., Bruse, C., Carlberg, M., Carlström, K. (2001)  
Interleukin 1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in endometriotic tissue and in endometrium.  
*Fertil. Steril.*, 75: 489-495
11. Bischoff, F.Z., Simpson, J.L. (2000)  
Heritability and molecular genetic studies of endometriosis.  
*Hum. Reprod. Update*, 6: 37-44
12. Blumenthal, R.D., Samoszuk, M., Taylor, A.P., Brown, G., Alisaukas, R., Goldenberg, D.M. (2000)  
Degranulating eosinophils in human endometriosis.  
*Am. J. Pathol.*, 156: 1581-1588
13. Bonecchi, R., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Bernasconi, S., Locati M., Power, C., Proudfoot, A., Wells, T.N.C., Mackay, C., Mantovani, A., Sozzani, S. (1999)  
Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN- $\gamma$  in human neutrophils.  
*J. Immunol.*, 162: 474-479
14. Braun, D.P., Ding, J., Dmowski, W.P. (2002)  
Peritoneal fluid-mediated enhancement of eutopic and ectopic endometrial cell proliferation is dependent on tumor necrosis factor- $\alpha$  in women with endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 78-727-732
15. Braun, D.P., Rana, N., Gebel, H., Dmowski, W.P., House, R. (1996)  
Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 65: 1125-1129
16. Chang, C.-C., Hsieh, Y.-Y., Tsai, F.-J., Tsai, C.-H., Tsai, H.-D., Lin, C.-C. (2002)  
The proline form of p53 codon 72 polymorphism is associated with endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 77: 43-45
17. Cheng, S.S., Lai, J.J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. (2001)  
Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils.  
*J. Immunol.*, 166: 1178-1184
18. Cheret, A., Le Grand, R., Caufour, P., Neildez, O., Matheux, F., Theodoro, F., Vaslin, B., Dormont, D. (1999)  
RANTES, IFN-gamma, CCR1, and CCR5 mRNA expression in peritoneal blood, lymph node, and bronchoalveolar lavage mononuclear cells during primary simian immunodeficiency virus infection of macaques.  
*Virology*, 255: 285-293

19. Chiang, C.M., Hill, J.A. (1997)  
Localization of T cells, interferon-gamma and HLA-DR in eutopic and ectopic human endometrium.  
*Gynecol. Obstet. Invest.*, 43: 245-250
  
20. Clemetson, K.J., Clemetson, J.M., Proudfoot, A.E.I., Power, C.A., Baggiolini, M., Wells, T.N.C. (2000)  
Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets.  
*Blood*, 96: 4046-4054
  
21. Colantonio, L., Iellem, A., Clissi, B., Pardi, R., Rogge, L., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D. (1999)  
Upregulation of integrin  $\alpha 6/\beta 1$  and chemokine receptor CCR1 by interleukin-12 promotes the migration of human type 1 helper T cells.  
*Blood*, 94: 2981-2989
  
22. Dmowski, W.P. (1981)  
Die derzeitigen Möglichkeiten zur Behandlung der Endometriose.  
*Obstet. Gynecol. Annu.*, 10: 279-311
  
23. Dmowski, W.P., Ding, J., Shen, J., Rana, N., Fernandez, B.B., Braun, D.P. (2001)  
Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis.  
*Hum. Reprod.*, 16: 1802-1808
  
24. Drakes, M.L., Zahorchak, A.F., Takayama, T., Lu, L., Thomson, A.W. (2000)  
Chemokine and chemokine receptor expression by liver-derived dendritic cells: MIP-1 $\alpha$  production is induced by bacterial lipopolysaccharide and interaction with allogeneic T cells.  
*Transpl. Immunol.*, 8: 17-29
  
25. Dürig, J., de Wynter, E.A., Kasper, C., Cross, M.A., Chang, J., Testa, N.G., Heyworth, C.M. (1998)  
Expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  receptors in human CD34+ hematopoietic cells and their modulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$ .  
*Blood*, 92: 3073-3081
  
26. Eisermann, J., Odem, R.R., Gast, M.J., Collins, J.L., Pineda, J. (1988)  
Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery.  
*Fertil. Steril.*, 50: 573-579

27. Elsner, J., Petering, H., Höchstetter, R., Kimmig, D., Wells, T.N.C., Kapp, A., Proudfoot, A.E.J. (1997)  
The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3.  
*Eur. J. Immunol.*, 27: 2892-2898
28. Feinman, R., Henriksen-DeStefano, D., Tsujimoto, M., Vilček, J. (1987)  
Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes.  
*J. Immunol.*, 138: 635-640
29. Fischer, F.R., Luo, Yi, Luo, M., Santambrogio, L., Dorf, M.E. (2001)  
RANTES-induced chemokine cascade in dendritic cells.  
*J. Immunol.*, 167: 1637-1643
30. García-Velasco, J.A., Arici, A. (1999)  
Chemokines and human reproduction.  
*Fertil. Steril.*, 71: 983-993
31. Getchell, T.V., Subhedar, N.K., Shah, D.S., Hackley, G., Partin, J.V., Sen, G., Getchell, M.L. (2002)  
Chemokine regulation of macrophage recruitment into the olfactory epithelium following target ablation: involvement of macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant protein-1.  
*J. Neurosci. Res.*, 15: 784-793
32. Gleicher, N., El-Roeiy, A., Confino, E., Friberg, J. (1987)  
Is endometriosis an autoimmune disease?  
*Obstet. Gynecol.*, 70: 115-122
33. Greb, R.R., Heinig, J., Kiesel, L. (2002)  
Endometriose  
*Geburtsh. Frauenheilk.*, 62: R21-R40
34. Halban, J. (1924)  
Metastatic hysteroadenosis.  
*Wien. Klin. Wochenschr.*, 37: 1205-1206
35. Halme, J. (1989)  
Release of tumor necrosis factor- $\alpha$  by human peritoneal macrophages in vivo and in vitro.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161: 1718-1725
36. Halme, J., Becker, S., Hammond, M.G., Raj, M.H.G., Raj, S. (1983)  
Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145: 333-337

37. Halme, J., Becker, S., Haskill, S. (1987)  
Altered maturation and function of peritoneal macrophages: Possible role in pathogenesis of endometriosis.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 156: 783-789
38. Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F., Raj, S.G., Talbert, L.M. (1984)  
Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis.  
*Obstet. Gynecol.*, 64: 151-154
39. Han, Y., Wang, J., Zhou, Z.-H.L., Ransohoff, R.M. (2000)  
TGF $\beta$ 1 selectively up-regulates CCR1 expression in primary murine astrocytes.  
*GLIA*, 30: 1-10
40. Haney, A.F., Muscato, J.J., Weinberg, J.B. (1981)  
Peritoneal fluid cell population in infertile patients.  
*Fertil. Steril.*, 35: 696-698
41. Hesselgesser, J., Ng, H.P., Liang, M., Zheng, W., May, K., Bauman, J.G., Monahan, S., Islam, I., Wei, G.P., Ghannam, A., Taub, D.D., Rosser, M., Snider, R.M., Morrissey, M.M., Perez, H.D., Horuk, R. (1998)  
Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor.  
*J. Biol. Chem.*, 273: 15687-15692
42. Hill, J.A., Faris, H.M.P., Schiff, I., Anderson, D.J. (1988)  
Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 50: 216-222
43. Hornung, D., Bentzien, F., Wallwiener, D., Kiesel, L., Taylor, R.N. (2001)  
Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid.  
*Mol. Hum. Reprod.*, 7: 163-168
44. Hornung, D., Dohrn, K., Sotlar, K., Greb, R.R., Wallwiener, D., Kiesel, L., Taylor, R.N. (2000)  
Localization in tissues and secretion of eotaxin by cells from normal endometrium and endometriosis.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85: 2604-2508
45. Hornung, D., Klingel, K., Dohrn, K., Kandolf, R., Wallwiener, D., Taylor, R.N. (2001)  
RANTES mRNA expression in normal endometrium and endometriotic implants: Assessment of autocrine/paracrine regulation by in situ hybridization.  
*Am. J. Pathol.*, 158: 1949-1954

46. Hornung, D., Ryan, I.P., Chao, V.A., Vigne, J.-L., Schriock, E.D., Taylor, R.N. (1997)  
Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82: 1621-1628
47. Hornung, D., Waite, L.L., Ricke, E.A., Bentzien, F., Wallwiener, D., Taylor, R.N. (2001)  
Nuclear peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  have opposing effects on monocyte chemotaxis in endometriosis.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 3108-3114
48. Horuk, R. (1994)  
Molecular properties of the chemokine receptor family.  
*Trends Pharmacol. Sci.*, 15:159-165
49. Howard, O.M.Z., Dong, H.F., Shirakawa, A.-K., Oppenheim, J.J. (2000)  
LEC induces chemotaxis and adhesion by interacting with CCR1 and CCR8.  
*Blood*, 96: 840-845
50. Hsu, C.-C., Yang, B.-C., Wu, M.-H., Huang, K.-E. (1997)  
Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 76: 1059-1064
51. Hunt, J.S., Chen, H.-L., Hu, X.-L., Tabibzadeh, S. (1992)  
Tumor necrosis factor- $\alpha$  messenger ribonucleic acid and protein in human endometrium.  
*Biol. Reprod.*, 47: 141-147
52. Inngjerdingen, M., Damaj, B., Maghazachi, A.A. (2001)  
Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells.  
*Blood*, 97: 367-375
53. Jarmin, D.I., Nibbs, R.J.B., Jamieson, T., de Bono, J.S., Graham, G.J. (1999)  
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 regulate chemokine and chemokine receptor expression in bone marrow macrophages.  
*Exp. Hematol.*, 27: 1735-1745
54. Kado, N., Kitawaki, J., Obayashi, H., Ishihara, H., Koshihara, H., Kusuki, I., Tsukamoto, K., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshikawa, T., Honjo, H. (2002)  
Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women.  
*Hum. Reprod.*, 17: 897-902
55. Kale, S., Shuster, M., Shangold, J. (1971)  
Endometrioma in a cesarean scar: case report and review of the literature.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 111: 596-597

56. Karck, U. (2002)  
Endometriose, 116-125  
In: Keck, C., Neulen, J., Behre, H.M., Brechwoldt, M.: Bd.1 Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie  
2. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York,
57. Kaufmann, A., Salentin, R., Gemsa, D., Sprenger, H. (2001)  
Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages.  
J. Leukoc. Biol., 69: 248-252
58. Keenan, J., Chen, T., Chadwell, N. (1995)  
IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis.  
Am. J. Reprod. Immunol., 34: 381-385
59. Kennedy, S. (1998)  
The genetics of endometriosis.  
J. Reprod. Med., 43: 263-268
60. Khorram, O., Taylor, R.N., Ryan, I.P., Schall, T.J., Landers, D.V. (1993)  
Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 169: 1545-1549
61. Kitawaki, J., Obayashi, H., Ishihara, H., Koshiba, H., Kusuki, I., Kado, N., Tsukamoto, K., Hasegawa, G., Nakamura, N., Honjo, H. (2001)  
Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata.  
Hum. Reprod., 16: 51-55
62. Klein, N.A., Pérgola, G.M., Tekmal, R.R., Montoya, I.A., Dey, T.D., Schenken, R.S. (1994)  
Cytokine regulation of cellular proliferation in endometriosis.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 734: 322-333
63. Klinger, M.H.F., Wilhelm, D., Bubel, S., Sticherling, M., Schröder, J.-M., Kühnel, W. (1995)  
Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 $\alpha$  within human platelets and their release during storage.  
Int. Arch. Allergy Immunol., 107: 541-546
64. Lebovic, D.I., Bentzien, F., Chao, V.A., Garrett, E.N., Meng, Y.G., Taylor, R.N. (2000)  
Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta.  
Mol. Hum. Reprod., 6: 269-275

65. Lebovic, D.I., Chao, V.A., Martini, J.-F., Taylor, R.N. (2001)  
IL-1 $\beta$  induction of RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene expression in endometriotic stromal cells depends on a nuclear factor- $\kappa$ B site in the proximal promoter.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 4759-4764
66. Lebovic, D.I., Mueller, M.D., Taylor, R.N. (2001)  
Immunobiology of endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 75: 1-10
67. Leiva, M.C., Hasty, L.A., Lyttle, C.R. (1994)  
Inflammatory changes of the endometrium in patients with minimal-to-moderate endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 62: 967-972
68. Leiva, M.C., Hasty, L.A., Pfeifer, S., Mastroianni, L., Lyttle, C.R. (1993)  
Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 168: 592-598
69. Liang, M., Mallari, C., Rosser, M., Ng, H.P., May, K., Monahan, S., Bauman, J.G., Islam, I., Ghannam, A., Buckman, B., Shaw, K., Wei, G.-P., Xu, W., Zhao, Z., Ho, E., Shen, J., Oahn, H., Subramanyam, B., Vergona, R., Taub, D., Dunning, L., Harvey, S., Snider, R.M., Hesselgesser, J., Morrissey, M.M., Perez, H.D., Horuk, R. (2000)  
Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC chemokine receptor-1.  
*J. Biol. Chem.*, 275: 19000-19008
70. Locati, M., Deuschle, U., Massardi, M.L., Martinez, F.O., Sironi, M., Sozzani, S., Bartfai, T., Mantovani, A. (2002)  
Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes.  
*J. Immunol.*, 168: 3557-3562
71. Luciano, A.A. (1982)  
Die Behandlung der Endometriose – ein Leitfadent  
*Contemp. Obstet./Gyn.*, 19: 211-212, 215-216, 218, 220-222, 227-228, 234
72. Marfaing-Koka, A., Devergne, O., Gorgone, G., Portier, A., Schall, T.J., Galanaud, P., Emilie, D. (1995)  
Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells.  
*J. Immunol.*, 154: 1870-1878
73. Mathur, S., Garza, D.E., Chihal, H.J., Rust, P.F., Himm, R.J., Williamson, H.O. (1988)  
Endometrial antigens involved in the autoimmunity of endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 50: 860-863

74. Mathur, S., Peress, M.R., Williamson, H.O., Youmans, C.D., Maney, S.A., Garvin, A.J., Rust, P.F., Fudenberg, H.H. (1982)  
Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 50: 259-266
75. McLaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, D.S., Millican, S.A., Muller, K.H., Sharkey, A.M., Smith, S.K. (1996)  
Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis.  
*Hum. Reprod.*, 11: 220-223
76. Meyer, R. (1919)  
Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa.  
*Zentralbl. Gynäkol.*, 36: 745-750
77. Nomiya, H., Hieshima, K., Nakayama, T., Sakaguchi, T., Fujisawa, R., Tanase, S., Nishiura, H., Matsuno, K., Takamori, H., Tabira, Y., Yamamoto, T., Miura, R., Yoshie, O. (2001)  
Human CC chemokine liver-expressed chemokine/CCL16 is a functional ligand for CCR1, CCR2 and CCR5, and constitutively expressed by hepatocytes.  
*Int. Immunol.*, 13: 1021-1029
78. Nothnick, W.B. (2001)  
Treating endometriosis as an autoimmune disease.  
*Fertil. Steril.*, 76: 223-231
79. Oral, E., Arici, A. (1996)  
Peritoneal growth factors and endometriosis.  
*Semin. Reprod. Endocrinol.*, 14: 257-267
80. Olive, D.L., Schwartz, L.B. (1993)  
Endometriosis  
*N. Engl. J. Med.*, 328: 1759-1769
81. Ortiz, B.D., Krensky, A.M., Nelson, P.J. (1996)  
Kinetics of transcription factors regulating the RANTES chemokine gene reveal a developmental switch in nuclear events during T-lymphocyte maturation.  
*Mol. Cell. Biol.*, 16: 202-210
82. Pakianathan, D.R., Kuta, E.G., Artis, D.R., Skelton, N.J., Hébert, C.A. (1997)  
Distinct but overlapping epitopes for the interaction of a CC-chemokine with CCR1, CCR3, and CCR5.  
*Biochemistry*, 36: 9642-9648

83. Penton-Pol, G., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Mancinelli, R., Sica, A., Sozzani, S., Mantovani, A. (1998)  
Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN- $\gamma$ .  
*J. Immunol.*, 160: 3869-3873
84. Philippeaux, M.-M., Piguet, P.F. (1993)  
Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and its mRNA in the endometrial mucosa during the menstrual cycle.  
*Am. J. Pathol.*, 143: 480-486
85. Punnonen, J., Teisela, K., Ranta, H., Bennett, B., Punnonen, R. (1996)  
Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 174: 1522-1526
86. Rana, N., Gebel, H., Braun, D.P., Rotman, C., House, R., Dmowski, W.P. (1996)  
Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in woman with endometrisis.  
*Fertil. Steril.*, 65: 925-930
87. Richardson, R.M., Pridgen, B.C., Haribabu, B., Snyderman, R. (2000)  
Regulation of the human chemokine receptor CCR1.  
*J. Biol. Chem.*, 275: 9201-9208
88. Richter, O., Mallmann, P., van der Ven, H., Krebs, D. (1998)  
TNF-alpha secretion by peritoneal macrophages in endometriosis.  
*Zentralbl. Gynäkol.*, 120: 332-336
89. Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E., Dmowski, W.P., Becker, J.L. (1993)  
Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.  
*Fundam. Appl. Toxicol.*, 21: 433-441
90. Rier, S.E., Parsons, A.K., Becker, J.L. (1994)  
Altered interleukin-6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 61: 294-299
91. Rier, S.E., Zarmakoupis, P.N., Hu, X., Becker, J.L. (1995)  
Dysregulation of interleukin-6 responses in ectopic endometrial stromal cells: Correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80: 1431-1437
92. Rossi, D., Zoltnik, A. (2000)  
The biology of chemokines and their receptors.  
*Annu. Rev. Immunol.*, 18: 217-242

93. Rottman, J.B., Slavin, A.J., Silva, R., Weiner, H.L., Gerard, C.G., Hancock, W.W. (2000)  
Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent.  
Eur. J. Immunol., 30: 2372-2377
94. Ryan, I.P., Schriock, E.D., Taylor, R.N. (1994)  
Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro.  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 642-649
95. Ryan, I.P., Tseng, J.F., Schriock, E.D., Khorram, O., Landers, D.V., Taylor, R.N. (1995)  
Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis.  
Fertil. Steril., 63: 929-932
96. Sampson, J.A. (1927)  
Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 14: 422-469
97. Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., Goeddel, D.V. (1990)  
Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES.  
Nature, 347: 669-671
98. Schall, T.J., Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M., Krensky, A.M. (1988)  
A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family.  
J. Immunol., 141: 1018-1025
99. Schill, T., Strik, D., Germer, U. (2000)  
Endometriose, 100-103  
In: Diedrich, K.: Gynäkologie und Geburtshilfe  
1. Auflage, Springer, Berlin
100. Schweppe, K.-W. (1998)  
Endometriose  
Kohlhammer, Stuttgart
101. Schweppe, K.-W. (1988)  
Medikamentöse Behandlung der Endometriose.  
Gynäkologie, 21:52-57

102. Schweppe, K.W., Kindermann, G. (1988)  
Endometriose, 13.1-13.27  
In: Friedberg, V., Thomsen, K.: Bd. 3, Teil 2, Gynäkologie und Geburtshilfe  
1. Auflage, Thieme, Stuttgart
103. Sica, A., Saccani, A., Borsatti, A., Power, C.A., Wells, T.N.C., Luini, W.,  
Polentarutti, N., Sozzani, S., Mantovani, A. (1997)  
Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine  
receptors in human monocytes.  
J. Exp. Med., 185: 969-974
104. Sidell, N., Han, S.W., Parthasarathy, S. (2002)  
Regulation and modulation of abnormal immune responses in endometriosis.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 955: 159-173
105. Semino, C., Semino, A., Pietra, G., Mingari, M.C., Barocci, S., Venturini, P.L.,  
Ragni, N., Melioli, G. (1995)  
Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like  
T cells in the genetic control of endometriosis.  
Fertil. Steril., 64: 909-916
106. Stefansson, H., Geirsson, R.T., Steinthorsdottir, V., Jonsson, H., Manolescu, A.,  
Kong, A., Ingadottir, G., Gulcher, J., Stefansson, K. (2002)  
Genetic factors contribute to risk of developing endometriosis.  
Hum. Reprod., 17: 555-559
107. Struyf, S., De Meester, I., Scharpé, S., Lenaerts, J.-P., Menten, P., Wang, J.M.,  
Proost, P., Van Damme, J. (1998)  
Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine  
receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC  
chemokine inhibitor.  
Eur. J. Immunol., 28: 1262-1271
108. Su, S.B., Mukaida, N., Wang, J., Nomura, H., Matsushima, K. (1996)  
Preparation of specific polyclonal antibodies to a C-C chemokine receptor, CCR1,  
and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes.  
J. Leukoc. Biol., 60: 658-666
109. Surrey, E.S., Halme, J. (1991)  
Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation  
in vitro: a model for endometriosis?  
Fertil. Steril., 56: 672-679
110. Tabibzadeh, S. (1991)  
Cytokine regulation of human endometrial function.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 622: 89-98

111. Tabibzadeh, S., Satyaswaroop, P.G., von Wolff, M., Strowitzki, T. (1999)  
Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF-alpha and by oestrogen withdrawal.  
*Mol. Hum. Reprod.*, 5: 1141-1149
112. Taketani, Y., Kuo, T.-M., Mizuno, M. (1992)  
Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 167: 265-270
113. Taylor, R.N., Ryan, I.P., Moore, E.S., Hornung, D., Shifren, J.L., Tseng, J.F. (1997)  
Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis.  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 828: 194-207
114. Tseng, J.F., Ryan, I.P., Milam, T.D., Murai, J.T., Schriock, E.D., Landers, D.V., Taylor, R.N. (1996)  
Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81: 1118-1122
115. Vigano, P., Infantino, M., Lattuada, D., Lauletta, R., Ponti, E., Somigliana, E., Vignali, M., DiBlasio, A.M. (2003)  
Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphisms in endometriosis.  
*Mol. Hum. Reprod.*, 9: 47-52
116. Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G. Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000)  
Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations.  
*J. Leukoc. Biol.*, 67: 699-704
117. Weber, C., Weber, K.S.C., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., Nelson, P.J. (2001)  
Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and Th1-like/CD45RO+ T cells.  
*Blood*, 97: 1144-1146
118. Weed, J.C., Arquembourg, P.C. (1980)  
Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility?  
*Clin. Obstet. Gynecol.*, 23: 885-893
119. Weil, S.J., Wang, S., Perez, M.C., Lyttle, C.R. (1997)  
Chemotaxis of macrophages by a peritoneal fluid protein in women with endometriosis.  
*Fertil. Steril.*, 67: 865-869

120. Wheeler, J.M. (1989)  
Epidemiology of endometriosis-associated infertility.  
J. Reprod. Med., 34: 41-47
121. Wieser, F., Schneeberger, C., Tong, D., Tempfer, C., Huber, J.C., Wenzl, R. (2002)  
PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis.  
Fertil. Steril., 77: 309-312
122. Zhang, S., Youn, B.-S., Gao, J.-L., Murphy, P.M., Kwon, B.S. (1999)  
Differential effects of leukotactin-1 and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  on neutrophils mediated by CCR1.  
J. Immunol., 162: 4938-4942
123. Zhao, Z.Z., Sugerman, P.B., Walsh, L.J., Savage, N.W. (2002)  
Expression of RANTES and CCR1 in oral lichen planus and association with mast cell migration.  
J. Oral Pathol. Med., 31: 158-162
124. Zella, D., Barabitskaja, O., Burns, J.M., Romerio, F., Dunn, D.E., Revello, M.G., Gerna, G., Reitz Jr., M.S., Gallo, R.C., Weichold, F.F. (1998)  
Interferon- $\gamma$  increases expression of chemokine receptors CCR1, CCR3, and CCR5, but not CXCR4 in monocytoid U937 cells.  
Blood, 91: 4444-4450
125. Zella, D., Barabitskaja, O., Casareto, L., Romerio, F., Secchiero, P., Reitz Jr., M.S., Gallo, R.C., Weichold, F.F. (1999)  
Recombinant IFN- $\alpha$  (2b) increases the expression of apoptosis receptor CD95 and chemokine receptors CCR1 and CCR3 in monocytoid cells.  
J. Immunol., 163: 3169-3175

Eigene Publikationen:

Finas, D., Xu, H., Dogan, S., Friedrich, M., Diedrich, K., Hornung, D.  
Secretion of RANTES by stimulated and unstimulated peritoneal macrophages from women with and without endometriosis  
(Publikation in Vorbereitung)

Wieser, F., Dogan, S., Klingel, K., Diedrich, K., Taylor, RN., Hornung, D.  
Expression and regulation of CCR-1 in peritoneal macrophages from women with and without endometriosis  
Fertil. Steril., 2005; 83 (6): 1878-1881

Dogan, S., Machicao, F., Wallwiener, D., Haering, H.-U., Diedrich, K., Hornung, D.  
Association of PPAR- $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor) Pro12Ala polymorphism with endometriosis.  
Fertil. Steril., 2004; 81 (5): 1411-1413

## 7. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AIDA	Automatic Image Data Analysis
AZ	Aktenzeichen
BCA	bicinchonic acid
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
C5a	Gerinnungsfaktor
ca.	circa
Ca/Mg	Kalzium/Magnesium
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSF	colony stimulating factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
ECL	enhanced chemilumineszenz
EGF	endothelial growth factor
Eo	Endometriose
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
FCS	fetal calf serum
Fig.	figure
g	Gramm
×g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GnRH	gonadotropin releasing hormone
h	Stunde
H <sub>2</sub> O dest.	destilliertes Wasser

hCCR	menschlicher (human) CC-Chemokinrezeptor
HCl	Salzsäure
HLA	Histokompatibilitäts-Antigen (human leukocyte antigen)
HMC	leukämische Mastzelllinie
HRP	horseradish peroxidase
I.E.	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
K	Kontrolle (-patientin)
KC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
max.	maximal
MCP	Monozyten chemotaktisches Protein
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer

No.	Nummer
OLP	orale Flechten (oral lichen planus)
OP	Operation
PDGF	platelet-derived growth factor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rAFS	revised American Fertility Society
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
REF.	Referenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPN	recombinant protein molecular weight marker
SDS	sodiumdodecylsulfate
sek	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Th1	T1-Helferzelle
Th2	T2-Helferzelle
TNF	Tumor necrosis factor
U	Umdrehung
U937	human histiocytic lymphoma cell type
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

## **8. Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. D. Hornung für ihre hervorragende Betreuung, für ihr beständiges Engagement, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre kritische Durchsicht der Manuskripte. Ohne ihren sanften Druck wäre es wohl kaum zu einem erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit gekommen.

Herrn Prof. Dr. D. Wallwiener danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Frauenklinik der Universität Tübingen durchzuführen.

Bei allen Kolleginnen der Arbeitsgruppe Hornung und der Forschungsabteilung bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Unterstützung. Insbesondere Karin Roob und Daniela Köndgen gebührt Dank für die gelegentliche Übernahme der Zellkulturen und für die Vorbereitung der Experimente. Frau Böhner und Frau Wroblewski von der pathologischen Abteilung danke ich für die hilfsbereite und freundliche Mithilfe beim Sammeln der Proben.

Den technischen Assistentinnen Frau Lykaitis, Frau Dreher, Frau Ponya und Frau Keinath-Nagel sowie der Röntgenärztin Frau Dr. Kaepler der Röntgenabteilung des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in Tübingen danke ich sehr für die problemlose Benutzung des Filmentwicklers.

Meiner Freundin Silke Maier danke ich für ihre Geduld und ihre Aufmunterungen.

Zu guter Letzt möchte ich mich aber ganz herzlich bei meinen Eltern, Melek und Kazim Dogan, meinen beiden Brüdern, Ismail und Zeki, und vor allem meinen beiden lieben Schwestern Dilber und Nuran für ihre Unterstützung bedanken. Meiner Schwester Nuran gebührt ein besonderer Dank, sie hat versucht, durch ihre gutgemeinten Ermahnungen und Aufmunterungen mich von meiner zeitweiligen Schreibfaulheit zu kurieren.

## **9. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Songül Dogan  
Geburtsdatum: 31. August 1978  
Geburtsort: Ludwigsburg  
Eltern: Kazim und Melek Dogan  
Geschwister: Dilber, Ismail, Nuran und Zeki Dogan  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1985-1989 Oststadtschule II - Grundschule, Ludwigsburg  
1989-1995 Elly-Heuss-Knapp-Realschule, Ludwigsburg  
1995-1998 Mathilde-Planck-Schule - Gymnasium, Ludwigsburg

### **Studium**

Seit SS 1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen  
21.03.2001 Ärztliche Vorprüfung  
21.03.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
14.09.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
18.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung