

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Anatomie

**Toll-like Rezeptor 3 und Toll-like Rezeptor 4 im gesunden und
pathologisch veränderten humanen Endometrium**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Svenja Isolde Renate Allhorn
aus Düren

2009

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. E. Winterhager
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. S. Kasimir-Bauer

Tag der mündlichen Prüfung: 15. März 2010

Publikation:

Allhorn S., Böing C., Koch A.A., Kimmig R., Gashaw I. (2008):
TLR3 and TLR4 expression in healthy and diseased human endometrium.
Reprod. Biol. Endocrinol. 6, 40.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Toll-like Rezeptoren	6
1.1.1 TLR3	8
1.1.2 TLR4	9
1.2 Endometrium	10
1.2.1 Endometriose.....	11
1.2.2 Endometriumkarzinom.....	14
2 Material und Methoden	18
2.1 Humane Gewebeproben	18
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.2.1 RNA-Extraktion	21
2.2.2 Reverse Transkription mit DNase-Verdau	21
2.2.3 Semiquantitative PCR.....	22
2.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	23
2.2.4.1 Quantifizierung mittels Real-Time PCR	23
2.2.4.2 Standardherstellung	24
2.3 Proteinlokalisierung	26
2.3.1 Immunhistochemie.....	26
2.3.2 Immunfluoreszenz	28
2.4 Statistische Auswertung	29
3 Ergebnisse	30
3.1 TLR3- und TLR4-Expression im gesunden zyklischen Endometrium und in Endometriose	30
3.2 TLR3- und TLR4-Expression im gesunden postmenopausalen Endometrium, in endometrialer Hyperplasie und im Endometriumkarzinom.....	38
4 Diskussion	45
4.1 TLR3 und TLR4 im gesunden Endometrium.....	45
4.2 Deregulation der TLR3- und TLR4-Expression in Endometriose	47
4.3 Deregulation der TLR3- und TLR4-Expression im Endometriumkarzinom	51
5 Zusammenfassung	53
6 Literaturverzeichnis	54

7 Anhang	68
7.1 Abkürzungsverzeichnis	68
7.2 Abbildungsverzeichnis	70
7.3 Tabellenverzeichnis	71
8 Danksagung	72
9 Lebenslauf	73

1 Einleitung

1.1 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und vermitteln eine evolutionär sehr alte Form der Immunantwort. Der Name Toll-like Rezeptor bzw. Toll-artiger Rezeptor bezieht sich auf die Ähnlichkeit der Proteine mit dem in *Drosophila melanogaster* entdeckten Proteinrezeptor Toll. Dieser ist bei der Erkennung grampositiver Bakterien und Pilze und somit im Immunsystem von *Drosophila* von zentraler Bedeutung (Bilak *et al.*, 2003). In der humanen TLR-Familie konnten bisher 10 Mitglieder (TLR1-10) identifiziert werden (Takeda und Akira, 2005). TLR1-9 werden jeweils durch spezifische Liganden aktiviert (Abbildung 1), während für TLR10 bisher noch kein Ligand beschrieben werden konnte (Takeda *et al.*, 2003).

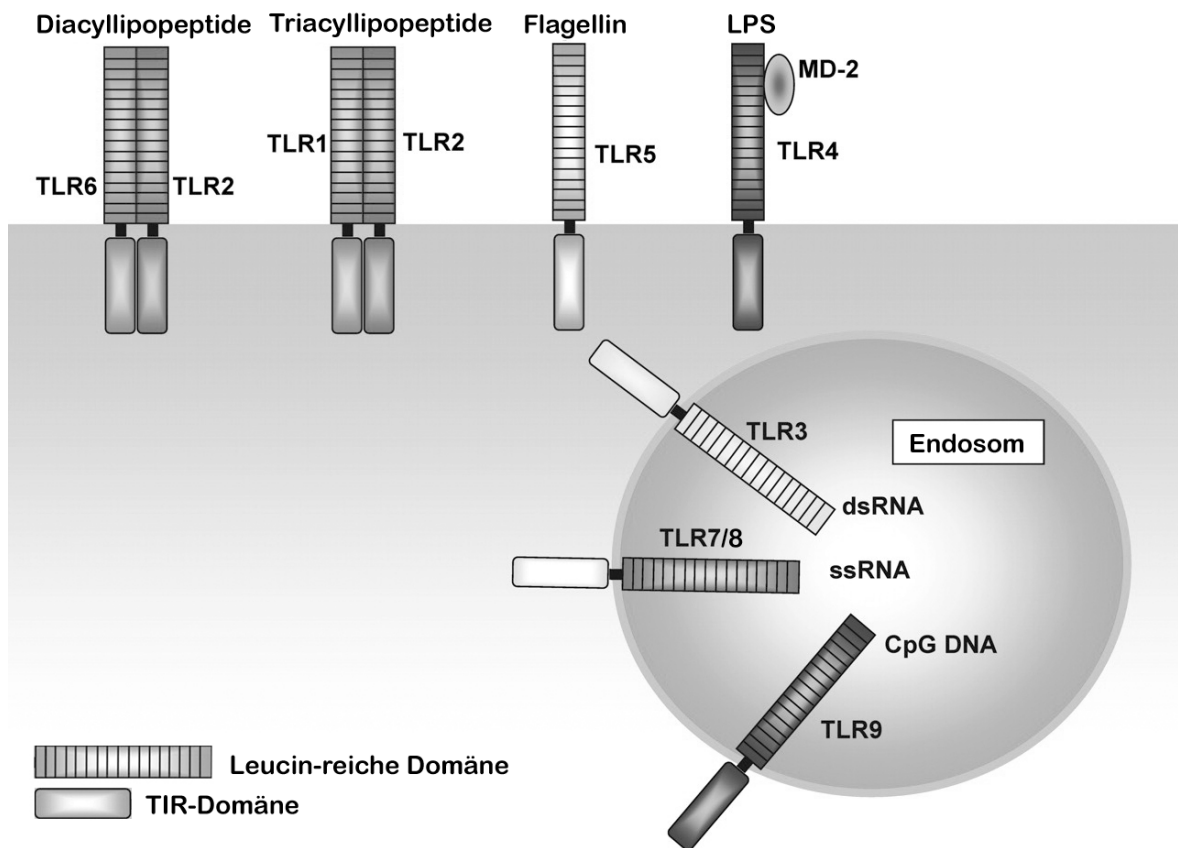


Abbildung 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (modifiziert nach Takeda und Akira, 2005)

Toll-like Rezeptoren sind Transmembranmoleküle, die durch eine extrazelluläre, Leucin-reiche Domäne und eine zyttoplasmatische, dem Interleukin-1-Rezeptor ähnelnde (Toll/IL1 Rezeptor = TIR) Domäne charakterisiert sind. Funktionell spielen TLRs bei der Erkennung von Pathogenen eine entscheidende Rolle und modulieren darüber hinaus die

Immunantwort auf das fremde Antigen (Fearon und Locksley, 1996). TLRs gehören zur Familie der mustererkennenden Rezeptoren (pattern recognition receptors = PRRs), die krankheitsassoziierte Moleküle (pathogen associated molecular patterns = PAMPs) identifizieren können. Diese PAMPs entsprechen verschiedenen funktionalen Bestandteilen von Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen.

TLR1, TLR2 und TLR6 erkennen mikrobielle Lipopeptide, wobei eine Unterscheidung zwischen Triacyl- und Diacyllipopeptiden durch die Heterodimerisierung von TLR2 mit TLR1 bzw. TLR6 ermöglicht wird. TLR4 identifiziert Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellmembran gramnegativer Bakterien, TLR5 hingegen Flagellin, das in begeißelten Bakterien vorkommt. TLR3 ist an der Erkennung viraler, doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA) beteiligt, während TLR7 und TLR8 die von Viren abstammende Einzelstrang-RNA (ssRNA) identifizieren können. Bakterielle und virale CpG-(Cytosin-phosphatidyl-Guanosin)-Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Motive werden von TLR9 erkannt (Takeda und Akira, 2005).

Toll-like Rezeptoren, die durch bakterielle und fungide PAMPs aktiviert werden (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6), werden auf der Zelloberfläche exprimiert. Diejenigen TLRs, die Motive von Nukleinsäuren erkennen können (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), sind primär in endosomalen Vesikeln zu finden (Hopkins und Sriskandan, 2005) (Abbildung 1).

Mithilfe von Adaptormolekülen, die sich an der intrazellulären Domäne der Toll-like Rezeptoren anlagern, werden spezifische intrazelluläre Signalwege induziert. Hierbei spielen das Adaptormolekül MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) und TRIF (TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β) eine entscheidende Rolle (Akira und Takeda, 2004). Es können zwei TLR-Signalkaskaden unterschieden werden: Zum einen der MyD88-abhängige Signalweg, den alle TLR-Mitglieder außer TLR3 nutzen, und zum anderen der MyD88-unabhängige Signalweg, über den nur TLR3- und TLR4-Signale vermittelt werden (Akira und Takeda, 2004). Die TLR-induzierten Signalkaskaden führen zur Produktion verschiedener inflammatorischer Zytokine wie Nuclear factor kappa B (NF κ B) oder Interferon β (IFN β) (Takeda und Akira, 2005; Fearon und Locksley, 1996) (Abbildung 2).

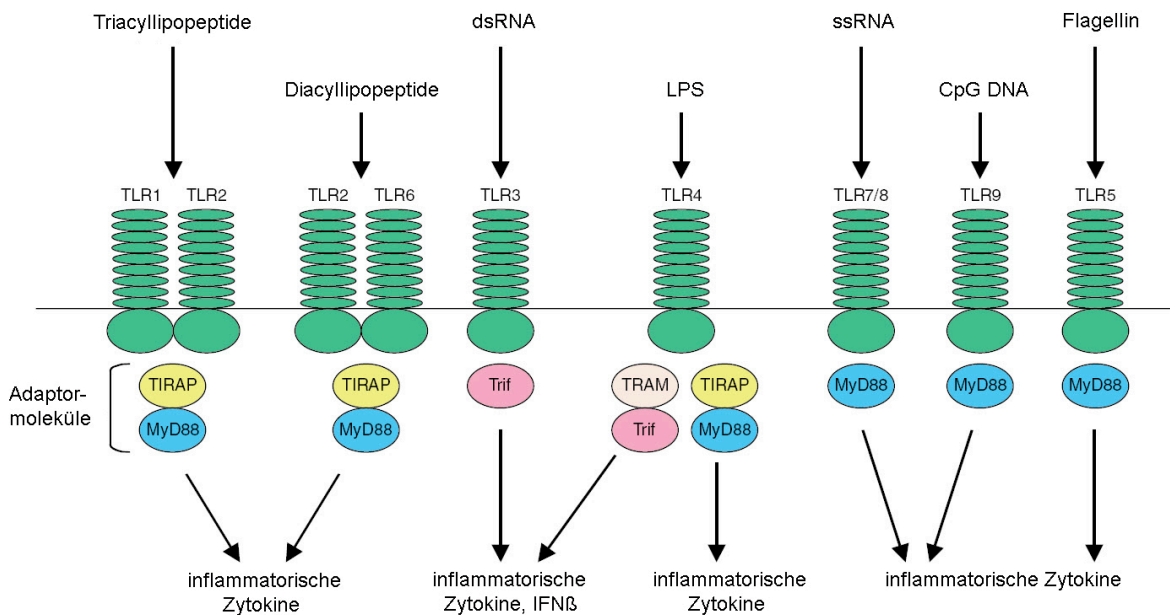


Abbildung 2: TLR-Signalkaskaden (modifiziert nach Kawai und Akira, 2006)

Die MyD88-abhängige Signalübertragung wird von TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 und TLR9 benutzt und führt zur Freisetzung von NF κ B und somit zur Induktion von inflammatorischen Zytokinen. Die Signalkaskade von TLR2 und TLR4 benötigt zusätzlich das Adaptormolekül TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) für den MyD88-abhängigen Signalweg. Die MyD88-unabhängige Signaltransduktion, die zusätzlich zu einer Induktion von IFN β führt, wird bei TLR3 und TLR4 beobachtet. Hierbei ist das Adaptormolekül TRIF von entscheidender Bedeutung. Für die TLR4-vermittelte, MyD88-unabhängige Signalkaskade wird zusätzlich das Adaptormolekül TRAM (TRIF-related adaptor molecule) benötigt.

Im Folgenden sollen nun die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle, TLR3 und TLR4, näher beschrieben werden.

1.1.1 TLR3

TLR3 ist im Rahmen der zellulären Immunantwort auf virale dsRNA von entscheidender Bedeutung. So zeigten TLR3-defiziente Mäuse eine beeinträchtigte Immunantwort auf dsRNA und Poly(I:C) (Polyinosinsäure: Polycytidylsäure), ein Immunostimulanz, das virale Infektionen anregt (Alexopoulou *et al.*, 2001). Eine Aktivierung der TLR3-Signalkaskade über den MyD88-unabhängigen Signalweg führt zu einer Expression von IFN β und IFN-induzierbaren Genen und somit zu einer antiviralen und immunstimulatorischen Antwort (Takeda und Akira, 2005) (siehe Abbildung 2). Hierbei spielt das Adaptormolekül TRIF eine zentrale Rolle. So zeigten TRIF-defiziente Mäuse eine beeinträchtigte TLR3-medierte IFN β -Expression (Yamamoto *et al.*, 2003).

Das humane TLR3-Protein wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert. Zunächst wurde eine Beschränkung der TLR3-Expression auf dendritische Zellen angenommen (Muzio *et al.*, 2000). Matsumoto *et al.* (2002) zeigten jedoch eine TLR3-Expression in der

Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC5. Es folgten mehrere Studien, die eine TLR3-Expression auch in epithelialen Zelllinien demonstrierten. Cario und Podolsky (2000) konnten die Expression von TLR3 in primären intestinalen Zellen zeigen, während Sha *et al.* (2004) diese auch im Flimmerepithel nachweisen konnten. Im weiblichen Genitaltrakt ist TLR3 in vaginalen und zervikalen Epithelzellen (Fichorova und Ingalls, 2002), in endometrialen Epithelzellen und Zelllinien (Young *et al.*, 2004; Schaefer *et al.*, 2004) wie auch in uterinen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Eriksson *et al.*, 2006) exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass in humanen endometrialen Epithelzellen eine TLR3-Stimulierung durch dsRNA zu einer Induktion proinflammatorischer und antiviraler Zytokine führt (Jorgenson *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass TLR3 die primäre Abwehr gegen eingedrungene Erreger darstellt. So wurde durch Zufuhr von TLR3 auf vaginale Schleimhautepithelien von Mäusen ein Schutz vor genitalen Herpes simplex 2-Infektionen erreicht (Ashkar *et al.*, 2004).

1.1.2 TLR4

TLR4 erkennt Lipopolysaccharide aus der Zellmembran gramnegativer Bakterien und fungiert als Übermittler des Signals in das Zellinnere (Akashi *et al.*, 2000). TLR4 ist jedoch nicht eigenständig funktionsfähig, sondern agiert mit Hilfe des Oberflächenproteins CD14 (cluster of differentiation) und dem „myeloid differentiation protein 2“ (MD-2) (Shimazu *et al.*, 1999). Hierbei spielt CD14 bei der Erkennung von LPS eine entscheidende Rolle (Jiang *et al.*, 2000), während MD-2, das mit der extrazellulären TLR4-Domäne auf der Zelloberfläche einen Komplex bildet, in Verbindung mit einer verstärkten LPS-Immunreaktion gebracht wird (Schromm *et al.*, 2001). TLR4 erkennt neben LPS weitere exogene Liganden wie Taxol, das Fusionsprotein des respiratorischen Synzytialvirus (RSV) oder das Chlamydia heat shock Protein 60 (CHSP60), aber auch endogene Liganden wie das Hitzeschockprotein 60 (HSP60) und Fibrinogen (Takeda und Akira, 2005). Darüber hinaus interagieren HSP70 und HSP90 mit dem TLR4-MD2-Komplex und sind so an der LPS-Erkennung beteiligt (Triantafilou und Triantafilou, 2004). Wie bereits erörtert, kann die TLR4-Signalkaskade über einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg initiiert werden. Hierbei induziert die MyD88-abhängige Signaltransduktion die Produktion von NF κ B und führt so zur Aktivierung inflammatorischer Zytokine. Die MyD88-unabhängige Signalkaskade bedingt hingegen überwiegend eine Produktion von IFN β und IFN-induzierbaren Genen (Akira und Takeda, 2004) (Abbildung 3).

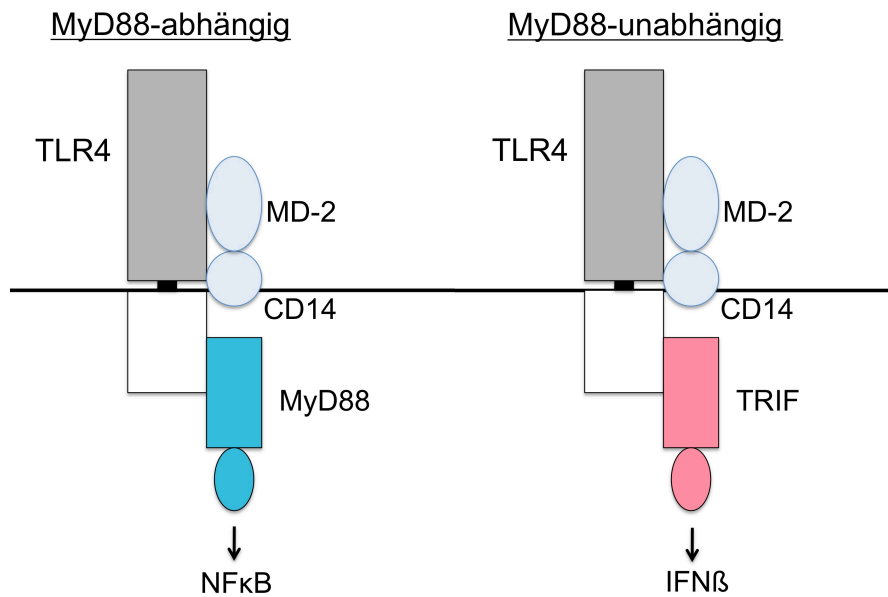


Abbildung 3: TLR4-Signalkaskade

Vereinfachte Darstellung der MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signaltransduktion.

Im humanen weiblichen Genitaltrakt konnte TLR4 vor allem im endozervikalen, endometrialen und tubären Epithel lokalisiert werden, während in der Vagina und Ektozervix bisher keine TLR4-Expression nachgewiesen werden konnte (Fazeli *et al.*, 2005). Im humanen Endometrium wurde TLR4 in endometrialen Epithel- und Stromazellen (Hirata *et al.*, 2005) sowie in uterinen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beschrieben (Eriksson *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte die Funktionalität der TLR4-Signalkaskade in diesen Zellen nachgewiesen werden (Schaefer *et al.*, 2004; Hirata *et al.*, 2005).

Im folgenden Kapitel werden Aufbau und Funktion des Endometriums sowie zwei in diesem Gewebe vorkommende Pathologien, die Endometriose und das Endometriumkarzinom, näher beschrieben.

1.2 Endometrium

Das menschliche Endometrium säumt als Schleimhautschicht den Uterus und ist aus einer einschichtigen, hochprismatischen Epithelschicht und der Lamina propria mucosa aufgebaut. Die Lamina propria mucosa besteht aus dem Stratum functionale und dem Stratum basale, wobei ersteres den zyklischen Veränderungen unterliegt und bei der Menstruation abgestoßen wird. Dieses Geschehen wird durch die Steroidhormone Östrogen und Progesteron kontrolliert, die die Expression von Wachstumsfaktoren und Immunsystemkomponenten wie Zytokinen und die Rekrutierung von Immunzellen regulieren. Das Endometrium dient als Implantationsort für die befruchtete Blastozyste

und ist entscheidend an der Entstehung und Erhaltung einer Schwangerschaft beteiligt. Darüber hinaus findet hier ein Kontakt mit aufsteigenden Erregern aus dem Genitaltrakt statt. So bedarf eine Infektion einer adäquaten Immunantwort, wohingegen die Präsenz von allogenem Spermia oder die Entstehung eines Fetus toleriert werden muss. Dies setzt ein Gleichgewicht zwischen Toleranz und Immunantwort voraus, das die Gesundheit und Funktion des Endometriums sichert, jedoch eine mikrobielle Infektion verhindert. TLRs könnten in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen, da sie entscheidend an der Immunregulation beteiligt sind.

Im Folgenden werden zwei endometriale Erkrankungen vorgestellt, die pathogenetisch mit einer Immunderegulation assoziiert werden.

1.2.1 Endometriose

Endometriose ist eine häufige, gutartige gynäkologische Erkrankung, die chronisch verläuft und zu Unterbauchschmerzen und Infertilität führen kann. Sie ist charakterisiert durch das Vorhandensein von endometrialem Gewebe außerhalb des Cavum uteri und wird nach ihrer Lokalisation in drei Formen unterteilt: Endometriosis genitalis interna (Adenomyosis uteri) mit Invasion in das Myometrium des Uterus, Endometriosis genitalis externa (außerhalb des Uterus im kleinen Becken, z.B. Beckenperitoneum, Ovar) und Endometriosis extragenitalis (außerhalb des kleinen Beckens, z.B. Perikard, Pleura). Die häufigste Form stellt die Endometriosis genitalis externa dar, die zumeist das Beckenperitoneum und hier vor allem das Ligamentum (Lig.) sacrouterinum betrifft (Schindler und Schweppe, 1989) (Abbildung 4).

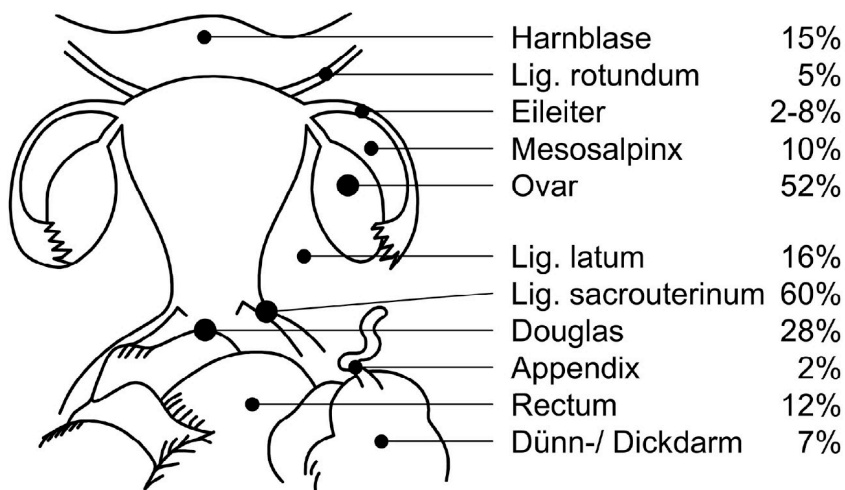


Abbildung 4: Verteilungshäufigkeit von Endometrioseherden im Bauchraum (Schindler und Schweppe, 1989)

Diese so genannte peritoneale Endometriose verursacht eine entzündliche Reaktion im Bauchraum und entspricht somit einer sterilen Entzündung im kleinen Becken (Brosens und Brosens, 2000). Die Prävalenz der peritonealen Endometriose beläuft sich auf 6-10% in der weiblichen Population und ist somit eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen (Rier und Yeaman, 1997).

Die Endometriose betrifft meist Frauen im reproduktiven Alter, wobei die Diagnose aufgrund von verschiedenen Symptomen und Anzeichen häufig erst nach längerer Krankheitsdauer gestellt wird. Es wird angenommen, dass zwischen den ersten charakteristischen Symptomen und der Diagnosestellung im Durchschnitt 8 Jahre vergehen (Giudice und Kao, 2004). Zu den Krankheitsanzeichen gehören neben chronischen Unterleibsschmerzen auch Dysmenorrhö, Dyspareunie, perimenstruelle Schmerzen sowie schmerzhafte Defäkation (Schindler und Schweppe, 1989). Die Diagnosestellung ist derzeit nur durch eine direkte Betrachtung des Bauchraums mit Entnahme von Biopsien möglich. Dies kann entweder laparoskopisch oder offen chirurgisch erfolgen. Die verdächtigen Läsionen werden entfernt und histologisch bei Vorhandensein von endometrialem Stroma und Drüsen als Endometriose definiert.

Obwohl die Endometriose bereits 1860 zum ersten Mal beschrieben wurde (von Rokitansky, 1860), bleiben Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung weiterhin ungeklärt. In der Literatur werden für die Entstehung der Endometriose unterschiedliche Theorien diskutiert. Die Coelom-Metaplasie-Theorie erklärt die Entwicklung der Läsionen durch Stimuli-bedingte metaplastische Umwandlung von pluripotentem Coelomepithel zu Endometrium (Ridley, 1968). Diese Theorie könnte erklären, warum Endometriose auch im Retroperitoneum und an Orten, die nicht direkt am Peritoneum lokalisiert sind (z.B. Pleura), entstehen kann. Weiterhin ließen sich demnach Beobachtungen über die Entwicklung von Endometrioseherden bei östrogenbehandelten Männern begründen, welche am Utriculus prostaticus gefunden werden konnten (Schrodt *et al.*, 1980). Beim Utriculus prostaticus handelt es sich um die embryonalen Überreste der Müller-Gänge, die im Rahmen der männlichen Sexualentwicklung im Fetus zurückgebildet werden.

Die meist akzeptierte Theorie für die peritoneale Endometriose postuliert eine retrograde Menstruation von endometrialem Gewebe durch die Eileiter in den Bauchraum (Sampson, 1927). Abbildung 5 verdeutlicht diese als Implantationstheorie oder Sampson's Theorie bezeichnete Überlegung, die durch mehrere Studien gestützt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass das Menstruationsgewebe vitale endometriale Zellen enthält, die kultiviert werden können (Kettel und Stein, 1951) und in der Lage sind, an ektopen Stellen zu adhären und zu persistieren (Ridley und Edwards, 1958).

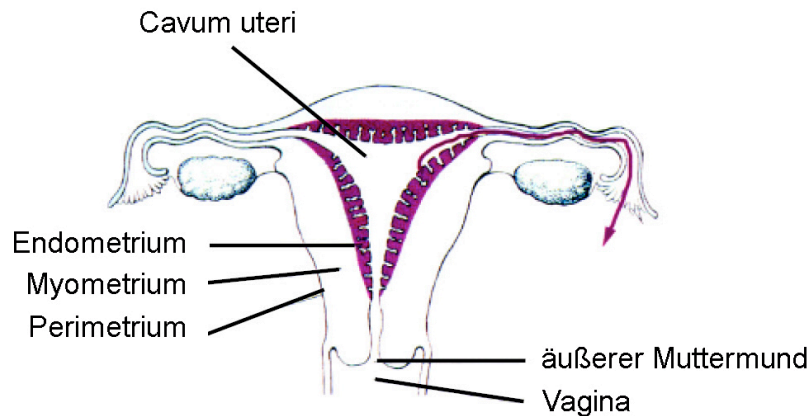


Abbildung 5: Implantationstheorie der Endometriose

Schematische Darstellung der retrograden Menstruation durch die Eileiter in die Peritonealhöhle (siehe roter Pfeil) (modifiziert nach Nisolle und Donnez, 1997)

Des Weiteren findet sich bei Frauen mit anatomisch bedingten Abflußstörungen des Menstruationsgewebes über die Vagina ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Endometriose (Sanfilippo *et al.*, 1986). Ferner ist der Douglas-Raum, der tiefste Punkt des Peritonealraums, eine häufige Lokalisation für endometriotische Läsionen im Bauchraum (Schindler und Schweppe, 1989) (siehe auch Abbildung 4). Eine retrograde Menstruation kommt bei über 90% aller Frauen vor (Halme *et al.*, 1984). Da jedoch nur ein Teil dieser Frauen an Endometriose erkrankt, müssen zusätzliche Faktoren für die Entwicklung der Endometriose verantwortlich sein.

Weitere Erklärungsmodelle zur Pathogenese der Endometriose beinhalten genetische Faktoren, Umweltfaktoren sowie eine gestörte zelluläre Immunabwehr. Im Hinblick auf die Beteiligung des Immunsystems wird eine Immunderegulation diskutiert, die durch eine Aktivierung peritonealer Makrophagen mit erhöhter Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und angiogenen Faktoren charakterisiert ist (Guo, 2007).

Toll-like Rezeptoren könnten hierbei von Bedeutung sein. So konnte gezeigt werden, dass Endometriose mit einer erhöhten Expression inflammatorischer Schlüsselregulatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Iwabe *et al.*, 2002) oder NF κ B (Gonzalez-Ramos *et al.*, 2007) einhergeht. Beide Mediatoren sind in der TLR-Signalkaskade zu finden (Fearon und Locksley, 1996). Des Weiteren ist das Zytokin Interleukin (IL-) 8, das chemotaktisch auf Monozyten und Neutrophile wirkt und eine hohe angiogene Potenz besitzt, ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Endometriose. So wurden bei Patientinnen mit Endometriose erhöhte IL-8 Level in peritonealen Flüssigkeiten gefunden, wobei die Menge an IL-8 mit der Erkrankungsschwere korrelierte (Arici, 2002). Young *et al.* (2004) konnten durch Stimulierung von TLR3 eine IL-8 Produktion in der epithelialen Endometrium-Zelllinie RL95-2 erreichen. Des Weiteren wird TLR4 in sterilen Entzündungen aktiviert (Jiang *et al.*, 2006), welche die Endometriose darstellt.

1.2.2 Endometriumkarzinom

Das Endometriumkarzinom ist eine der häufigsten gynäkologischen, bösartigen Erkrankungen in Europa und Nordamerika und betrifft meist postmenopausale Frauen (Amant *et al.*, 2005). Histologisch werden Endometriumkarzinome in verschiedene Typen unterteilt, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Das endometrioides Adenokarzinom stellt mit einem Anteil von 60% die häufigste Form des Endometriumkarzinoms dar (Stauber und Weyerstrahl, 2001), weshalb sich die vorliegende Studie auf diese Form des endometrialen Karzinoms beschränkt.

Tabelle 1: Häufigkeit der verschiedenen histologischen Formen des Endometriumkarzinoms (Stauber und Weyerstrahl, 2001)

Karzinom	Häufigkeit (%)
endometrioides Adenokarzinom: - glanduläres - glandulär papilläres - sekretorisches - solides - mit Plattenepithelmetaplasien	ca. 60%
Adenokankroid	ca. 21%
adenosquamöses Karzinom	ca. 7%
klarzelliges Adenokarzinom	ca. 6%
serös-papilläres Adenokarzinom	ca. 5%
muzinöses Adenokarzinom	ca. 0,5%
mukoepidermoides Adenokarzinom	ca. 0,5%

Die Erkrankung ist durch eine übermäßige Proliferation der endometrialen Drüsen mit folgender Dedifferenzierung gekennzeichnet, wodurch das stromale Kompartiment des Gewebes verdrängt wird. Unter molekularbiologischen und klinischen Gesichtspunkten können zwei Typen des Endometriumkarzinoms unterschieden werden: Typ I (östrogenabhängig) und Typ II (östrogenunabhängig). Hierbei haben Typ-I-Karzinome eine günstigere Prognose, exprimieren meist Östrogen- und Progesteronrezeptoren und entsprechen histopathologisch endometrioiden Karzinomen (Amant *et al.*, 2005).

Häufig gehen den Typ-I-Karzinomen präneoplastische Vorstufen wie die atypische endometriale Hyperplasie voraus (Bokham, 1983) (Abbildung 6), die in dieser Studie ebenfalls untersucht wurden.

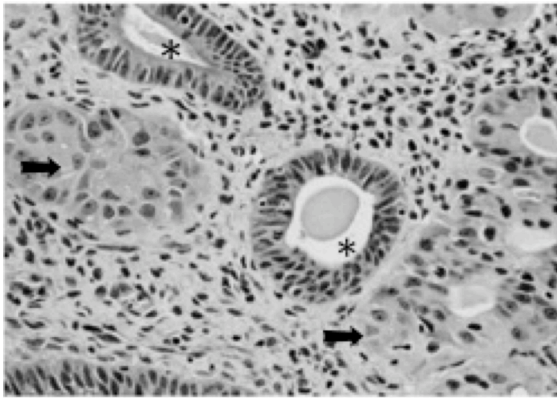


Abbildung 6: Atypische endometriale Hyperplasie (modifiziert nach Steven und Silverberg, 2000)

Die Abbildung zeigt atypische hyperplastische Drüsen mit apolarer Zellordnung und vergrößerten, rundlichen Nuklei mit prominenten Nukleoli (siehe Pfeile). Zum Vergleich sind in der Bildmitte und am oberen Bildrand zwei hyperplastische Drüsen ohne atypische Veränderungen zu sehen (siehe Sterne).

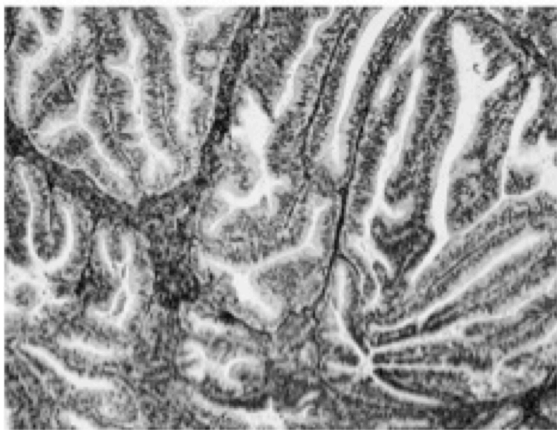


Abbildung 7: Gut differenziertes endometrioides Adenokarzinom (nach Steven und Silverberg, 2000)

Das Stroma zwischen den Drüsen wird durch das Zusammenwachsen der Drüsen verdrängt.

Klinisch imponieren Endometriumkarzinome zumeist durch postmenopausale Blutungen. Eine diagnostische Abklärung erfolgt mittels fraktionierter Kürettage (getrennte Gewinnung bzw. Ausschabung der Gebärmutter Schleimhaut). Das hierbei gewonnene Material wird auf das Vorhandensein von Neoplasien untersucht und gegebenenfalls in Hinblick auf die Art der endometrialen Hyperplasie bzw. des Tumortyps und Tumorgradings beurteilt. Beim histopathologischen Grading nach den Kriterien der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) wird der Differenzierungsgrad durch den Anteil an nichtplatteneithelialen soliden Tumorarealen (undifferenzierten Anteilen) festgelegt (FIGO, 2000) (Tabelle 2). In Abbildung 7 ist ein gut differenziertes endometrioides Adenokarzinom dargestellt.

Tabelle 2: Grading des endometrioiden Endometriumkarzinoms nach FIGO (2000)

Grading	Charakteristika
G1	gut differenziert (reif): < 10% undifferenzierte Anteile
G2	mäßig differenziert (mittelreif): 10-50% undifferenzierte Anteile
G3	schlecht differenziert/ undifferenziert (unreif): > 50% undifferenzierte Anteile

Die Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms (Staging) erfolgt ebenfalls nach der FIGO-Klassifikation und berücksichtigt die myometrale Tumordinfiltration, den pelvinen und paraaortalen Lymphknotenbefall sowie die extrauterine Tumorausdehnung (FIGO, 2000). In der Ätiologie des Endometriumkarzinoms wird eine Dysbalance zwischen Östrogen und Progesteron postuliert. Dabei werden Östrogen-abhängige Endometriumkarzinome mit einer verlängerten Östrogenexposition bei fehlendem suffizientem Progesteron assoziiert (Grady *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass bei steigender Konzentration an zirkulierendem Östrogen auch das Risiko eines Endometriumkarzinoms ansteigt (Zeleniuch-Jacquotte *et al.*, 2001). So wurde bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom, die mit dem partiellen Östrogenrezeptor-Agonist Tamoxifen behandelt wurden, ein gehäuftes Auftreten von Endometriumkarzinomen beobachtet (Singh *et al.*, 2007).

Neben der Steroidhormonwirkung wird die Rolle der Inflammation an der Pathogenese des Endometriumkarzinoms diskutiert. Es ist bekannt, dass die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α eine Schlüsselrolle in der Tumorentwicklung spielt (Coussens und Werb, 2002). In der endometrialen Hyperplasie und im Endometriumkarzinom konnten TNF α wie auch der Transkriptionsfaktor NF κ B nachgewiesen werden (Vaskivuo *et al.*, 2002). Hierbei wurde eine verminderte Expression von TNF α und NF κ B im Endometriumkarzinom festgestellt, wobei die Expressionslevel mit zunehmendem Grading zurückgingen und im undifferenzierten G3-Karzinom kaum noch nachweisbar waren. Diese inflammatorischen Mediatoren sind in der TLR-Signalkaskade zu finden (Fearon und Locksley, 1996), weshalb eine Regulation der TLR-Expression im endometrialen Karzinom anzunehmen ist.

Obwohl TLR3 und TLR4 bereits im humanen Endometrium nachgewiesen werden konnten, gibt es bisher keine Untersuchungen zum Expressionsverhalten in pathologisch verändertem Endometrium. Im Rahmen dieser Studie wird die TLR3- und TLR4-Expression in Endometriose und im endometrioiden Endometriumkarzinom untersucht, da eine Beteiligung der Toll-like Rezeptoren an Erkrankungen, die mit einer Immunderegulation assoziiert sind, anzunehmen ist.

Zunächst wird die TLR3- und TLR4-mRNA- sowie Protein-Expression im gesunden menstruellen Gewebe und postmenopausalen Endometrium ermittelt, die daraufhin mit der TLR3- bzw. TLR4-Expression in peritonealer Endometriose, endometrialer Hyperplasie und endometrioidem Adenokarzinom verglichen wird. So kann eine mögliche Regulation im pathogenen Gewebe nachgewiesen werden, die auf eine Beteiligung der Rezeptoren an der Pathogenese dieser Erkrankungen hinweisen würde.

2 Material und Methoden

2.1 Humane Gewebeproben

Das für diese Arbeit verwendete Gewebematerial wurde zum einen von der gynäkologischen Klinik des Universitätsklinikums Essen (Prof. Dr. Kimmig) und zum anderen von der Pathologie des Universitätsklinikums Essen (Prof. Dr. Schmid) zur Verfügung gestellt. Hierbei stammte das prämenopausale und das gesunde postmenopausale endometriale Gewebe aus der Frauenklinik, welches im Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen bearbeitet und archiviert wurde. Das erkrankte postmenopausale Endometriumgewebe (endometriale Hyperplasien und Endometriumkarzinome) wurde aus dem Archiv der Frauenklinik zur Verfügung gestellt, während die Pathologie des Universitätsklinikums Essen die entsprechenden Paraffinschnitte der Proben bereitstellte. Die Gewebeentnahme für die wissenschaftlichen Untersuchungen wurde von der örtlich zuständigen Ethikkommission und von den Patientinnen schriftlich genehmigt.

Das endometriale Gewebe stammte von 51 prämenopausalen Frauen mit regelmäßigem Menstruationszyklus (25-35 Tage). Hiervon unterzogen sich 43 Patientinnen aufgrund von Infertilität, chronischen Unterbauchschmerzen oder Dysmenorrhö einer laparoskopischen Intervention oder es wurde aufgrund eines Uterus myomatosus eine Hysterektomie durchgeführt. Das menstruelle Gewebe wurde von 8 gesunden Probandinnen mit regelmäßigem Menstruationszyklus während der ersten drei Tage der Menstruationsblutung gewonnen. Vorerkrankungen und Operationen, sowie die allgemeine Anamnese und Medikamenteneinnahme wurden den Krankenakten entnommen bzw. von den gesunden Probandinnen erfragt. Präoperativ wurde eine systemische Infektion durch im Blut bestimmte Parameter wie Leukozytenzahl und das C-reaktive Protein (CRP) ausgeschlossen. Bei 16 der 51 prämenopausalen Frauen wurde die Diagnose Endometriose gestellt, das endometriale Gewebe der weiteren 35 Frauen zeigte keine pathologischen Veränderungen.

Das Zyklusstadium wurde durch die morphologische Evaluation der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitte nach den Kriterien von Noyes (Noyes *et al.*, 1950) beurteilt. Ferner wurde der von den Patientinnen angegebene Zyklustag zur Zyklusphasenbestimmung herangezogen. Die gesunden Gewebeproben wurden in folgende Stadien eingeteilt: Proliferationsphase (P, Tag 5-14, n=16), Sekretionsphase (S, Tag 15-28, n=11) und Menstruationsphase (M, Tag 1-3, n=8). Das eutope endometriale Gewebe der Patientinnen mit Endometriose wurde nach den gleichen Kriterien beurteilt und eingeteilt in: Proliferationsphase (P, Tag 5-14, n=13) und Sekretionsphase (S, Tag

15-28, n=3). Von 4 der erkrankten Patientinnen in der Proliferationsphase (aus der oben genannten Kohorte) konnte zusätzlich ektopes Endometrium gewonnen werden. Diese Gewebeproben wurden im Folgenden als korrespondierend bezeichnet und ermöglichten die vergleichende Betrachtung von eutopem und ektopem endometriotischen Endometrium. Das Patientenalter des prämenopausalen Patientenkollektivs lag zwischen 19 und 52 Jahren (Mittelwert: 37 Jahre). Details zu den prämenopausalen Patientengruppen mit Angaben zu Patientenalter und Operationsindikationen sind in Tabelle 3 zu finden. Als Ausschlusskriterium galt jede Hormoneinnahme, die in den letzten 3 Monaten vor der Gewebeentnahme erfolgte.

Tabelle 3: Charakterisierung der Patientengruppen

* Patientinnen ohne bekannte Endometriose vor der Operation, SD = Standardabweichung

	Anzahl (n)	Alter (Mittelwert)	Alter (SD)	Indikation zur Operation
Prämenopausal, Kontrollen (proliferativ und sekretorisch)	27	37	8,6	Myome (n=7), nicht- endometriotische Ovarialzyste (n=2), Infertilität (n=5), Dysmenorrhö (n=11), Unterbauchschmerzen (n=1), Uterusprolaps (n=1)
Prämenopausal, gesund, menstruell	8	39	10,7	Keine Operation
Prämenopausal, Endometriose (proliferativ und sekretorisch)	16	36	6,8	Endometriose (n=8), Ovarialzyste (n=2), Infertilität (n=1), Dysmenorrhö (n=5*)
Postmenopausal, Kontrollen	6	68	10,2	Hochaufgebautes Endometrium (n=4), Uterusprolaps (n=2)
Postmenopausal, Hyperplasien	8	64	13	Hochaufgebautes Endometrium, Verdacht auf Karzinom
Postmenopausal, Endometriumkarzinom	16	67	12,8	Hochaufgebautes Endometrium, Endometriumkarzinom

Das postmenopausale endometriale Gewebe stammte von 30 Patientinnen, die aufgrund von hochaufgebautem Endometrium, Uterusprolaps, bei Verdacht auf oder der Diagnose Endometriumkarzinom behandelt wurden (Tabelle 3). Als postmenopausal wurden Frauen im Klimakterium bezeichnet, bei denen seit mindestens 12 aufeinanderfolgenden Monaten eine Amenorrhö bestand. Hiervon wiesen 6 Patientinnen keine endometrialen

Abnormalitäten auf und dienten als Kontrollgruppe. Bei 8 der Patientinnen wurde eine atypische endometriale Hyperplasie festgestellt, während bei 16 Frauen ein endometrioides Adenokarzinom diagnostiziert wurde. Das Grading der Endometriumkarzinome erfolgte nach postoperativen histopathologischen Kriterien basierend auf der FIGO-Klassifikation (FIGO, 2000): G1 (gut differenziert, n=5), G2 (mäßig differenziert, n=6), G3 (undifferenziert, n=5). Das Alter des postmenopausalen Patientenkollektivs lag zwischen 37 und 86 Jahren (Mittelwert: 66 Jahre). Details zum Patientenalter in den einzelnen Patientengruppen können Tabelle 3 entnommen werden. Keine der Patientinnen erhielt in den letzten 3 Monaten vor der Operation eine hormonelle Therapie.

Das gesamte prämenopausale und das gesunde postmenopausale Gewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen in eine 4°C kalte Moscona-Lösung (Tabelle 4) überführt und für die Versuche in das Labor des Instituts für Anatomie des Universitätsklinikums Essen gebracht. Dort wurde ein Teil eines jeden Gewebes zur RNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff (-196°C) tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der verbliebene Teil des Biopsats wurde für morphologische Auswertungen und immunhistochemische Färbungen in 4% Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet bzw. frisch für Kryostatschnitte in Tissue Tek (Qiagen, Hilden) eingefroren und bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Moscona-Lösung

Moscona-Lösung
140 mM NaCl
4 mM KCl
12 mM NaHCO ₃
0,2 mM KH ₂ PO ₄
0,4 mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂
0,9 mM D-Glucose Monohydrat

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Aus dem prämenopausalen endometrialen Gewebe wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) isoliert. Die Gewebe wurden in 1ml RLT-Lysepuffer (Qiagen) mit Hilfe eines Homogenisators (Kinematika, Luzern, Schweiz) bei einer Geschwindigkeit von 19000 Umdrehungen/Minute homogenisiert. Zur feineren Lyse wurden die Homogenate durch eine Kanüle (20 Gauge, Beckton Dickinson, Fraga, England) aufgezogen. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen). Die Gesamt-RNA wurde in 60µl Ribonuklease (RNase)-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt und erfolgte in einer 1:50 Verdünnung in Quarzküvetten. Mit Hilfe des RNA/DNA Calculator Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) konnten die jeweiligen Konzentrationen gemessen und in µg/µl angegeben werden.

Die Gesamt-RNA des postmenopausalen Gewebes wurde von Andrea Koch im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation mit Hilfe des „RNeasy Midi Kit“ (Qiagen) isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Reverse Transkription mit DNase-Verdau

Die Reverse Transkription (RT) beinhaltet die Synthese von cDNA (complementary DNA) aus mRNA (messenger RNA), die daraufhin als Template für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) fungierte. Vorab wurde ein Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau vorgenommen, bei dem mögliche Restbestände der genomischen DNA durch das Enzym abgebaut wurden. Gemäß dem Protokoll von Invitrogen (Hamburg) wurde das Ausgangsmaterial von 1µg Gesamt-RNA mit einer entsprechenden Menge HPLC (high performance liquid chromatography) gereinigtem Wasser auf ein Volumen von 8,5µl aufgefüllt. Es wurde 1µl 10xDNase Puffer (Invitrogen) und 0,5µl DNase I (1U/µl, Invitrogen) hinzugefügt und eine Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgte die 10 minütige Erhitzung der Proben auf 65°C in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) zur Inaktivierung des Enzyms.

Nach dem DNase-Verdau wurden je 15µl des RT-Mastermixes (Tabelle 5) auf die Proben gegeben. Die Umschreibung in cDNA erfolgte für eine Stunde im Thermocycler bei 37°C mit Hilfe des Enzyms M-MLV RT (moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase, Invitrogen). Als Oligonukleotid-Primer dienten Oligo-dT16-Nukleotide (Invitrogen). Es folgte ein abschließendes 5 minütiges Erhitzen auf 90°C zur Denaturierung des

RNA/DNA-Doppelstrangs und zur Inaktivierung des Enzyms. Die so entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des RT-Mastermixes

Substanz	Verwendetes Volumen [μ l]
RNA	1
First-Strand Buffer (5x) (Invitrogen)	5
10 mM dNTP-Mix (Genecraft)	1,25
Oligo dT16 (MWG)	0,5
0,1 M DTT (Invitrogen)	2
200 U M-MLV RT (Invitrogen)	0,5
RNase-freies Wasser	5,75

2.2.3 Semiquantitative PCR

Eine semiquantitative PCR wurde zum Nachweis der Transkripte und zur relativen Quantifizierung der TLR3- und TLR4-mRNA-Expression der Proben durchgeführt. Je 4 μ l der cDNA des RT-Ansatzes wurden zusammen mit genspezifischen Primern für TLR3 und TLR4 eingesetzt (Tabelle 6). Das verwendete PCR-Programm vervielfältigte die entsprechenden Sequenzen kompetitiv. Die Komponenten des PCR-Mastermixes sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 6:

Auflistung der in der semiquantitativen PCR und quantitativen Real-Time PCR verwendeten Primer (F= forward; R= reverse), ACTB = β -Aktin

Bezeichnung	5' - 3'-Sequenz
TLR3 F	GTATTGCCTGGTTTGTTAATTGG
TLR3 R	AAGAGTTCAAAGGGGGCACT
TLR4 F	AAGCCGAAAGGTGATTGTTG
TLR4 R	CTGAGCAGGGTCTTCTCCAC
ACTB F	ACCAACTGGGACGACATGGA
ACTB R	CAGAGGCGTACAGGGATAG

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes

Die Reaktion beinhaltet 36 Zyklen mit einer Primer-Anlagerung bei 60°C.

Substanz [Konzentration]	Verwendetes Volumen [μ l]
10x Puffer (Biotherm)	2,5
dNTPs 10mM	1
Primer F [25 pmol/ μ l]	1
Primer R [25 pmol/ μ l]	1
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,25
Wasser	13,25

Nach der Amplifikation wurden die Transkripte mit DNA-Probenpuffer (5x) versetzt, in einem 2%igen Agarose-Gel bei 120V elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg) unter UV-Licht sichtbar gemacht (Gel Imager, Intas, Göttingen). Als Puffer des Agarose-Gels wurde 1xTBE-Puffer verwendet (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung des DNA-Probenpuffers und TBE-Puffers

DNA-Probenpuffer	TBE-Puffer (10x):
25 mM Tris/HCl (pH 7,0)	890 mM Tris-Base
150 mM EDTA	890 mM Borsäure
0,05% Bromphenolblau	20 mM EDTA
25 % Glycerin	

2.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

2.2.4.1 Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Die Methode der quantitativen Real-time PCR beruht auf dem herkömmlichen Prinzip der PCR, bietet jedoch mittels Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus die Möglichkeit der Quantifizierung der gewonnenen DNA (daher qPCR). Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der DNA-Farbstoff SYBR Green I (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet, der in doppelsträngige DNA interkaliert, wodurch die Fluoreszenz des

Farbstoffs ansteigt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde der CT-Wert (Cycle Threshold) genutzt, der den erstmaligen signifikanten Fluoreszenzanstieg im Vergleich zur Hintergrund-Fluoreszenz beschreibt. Hierdurch konnte eine Messung zu Anfang des exponentiellen Anstiegs der PCR-Produkte gewährleistet werden. Jede Probe wurde in einem dreifachen Ansatz amplifiziert und die ermittelten CT-Werte über einen Mittelwert zusammengefasst. Die Amplifikation jedes Gens wurde mit dessen Standardreihe, welche für TLR3 und TLR4 DNA-Konzentrationen von 0,001 fg/μl bis 10 fg/μl enthielt, in Relation gebracht. Eine relative Quantifizierung erfolgte durch Normierung der TLR3- und TLR4-Expressionslevel zum housekeeping-Gen ACTB (β-Aktin), dessen Standardreihe die DNA-Konzentrationen von 0,01 fg/μl bis 100 fg/μl enthielt.

2.2.4.2 Standardherstellung

Zur Herstellung von Standardreihen für die quantitative Real-Time PCR wurden nach einer herkömmlichen PCR sichtbare DNA-Banden aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Mittels des MiniElute Gel Extraction Kits (Qiagen) wurden die PCR-Produkte nach Angaben des Herstellers aus dem Agarose-Gel aufgereinigt. Die DNA-Konzentrationen wurden daraufhin über die optische Dichte (OD) bestimmt. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten durch den RNA/DNA Calculator Gene Quant II (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England) in einer 1:50 Verdünnung. In 10er Verdünnungsschritten mit HPLC gereinigtem Wasser erfolgte die Herstellung der genspezifischen Standards für die qPCR. In Abbildung 8 ist beispielhaft die Standardreihe für das housekeeping-Gen ACTB dargestellt.

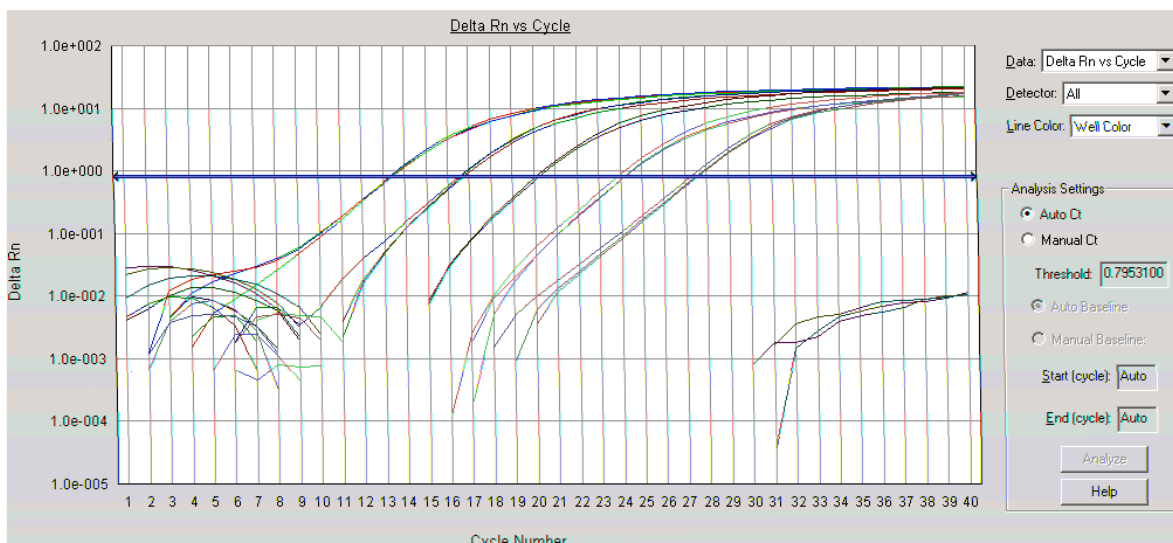


Abbildung 8:
Darstellung der Amplifikation für den ACTB-Standard bei der qPCR (Konzentrationen von 0,01fg/μl - 100fg/μl)

Die Bedingungen der quantitativen Real-Time PCR wurden zunächst für TLR3 und TLR4 optimiert. Es wurde 1µl cDNA des RT-Ansatzes mit 19µl qPCR MasterMix SYBR Green I (Tabelle 9 und 10) versetzt.

Tabelle 9: SYBR Green Master Mix für die quantitative Real-Time PCR

Substanz
SYBR Green I dye
AmpliTaq Gold
DNA Polymerase dNTPs (mit dUTP)
Referenz-Farbstoff Rox
Puffer

Tabelle 10: qPCR-Reaktionsansatz

Substanz [Konzentration]	Verwendetes Volumen [µl]
RT-Ansatz (1µg RNA in RT-Reaktion eingesetzt)	1
Primer F [25pmol/µl]	0,15
Primer R [25pmol/µl]	0,15
SYBR Green Master Mix (2x, ABI)	8,7
Wasser	10

Die Reaktion wurde in einem „ABI Prism 7300 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) auf einer 96-Well-Platte (96-Well optical reaction plate, Applied Biosystems) durchgeführt. Zum Verschließen der Platte wurde eine optisch adhäsive Folie (Applied Biosystems) benutzt. Das Amplifikationsprogramm beinhaltete folgende Schritte: Aktivierung der Taq-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen mit 15 sekundiger Erhitzung auf 95°C und anschließender einminütiger Abkühlung auf 60°C. Es folgte eine Schmelzkurvenanalyse durch Erhitzen der Proben von 65°C auf 95°C in 0,1°C-Schritten (Abbildung 9). So konnten die amplifizierten PCR-Produkte anhand ihrer Fragmentlänge spezifiziert werden.

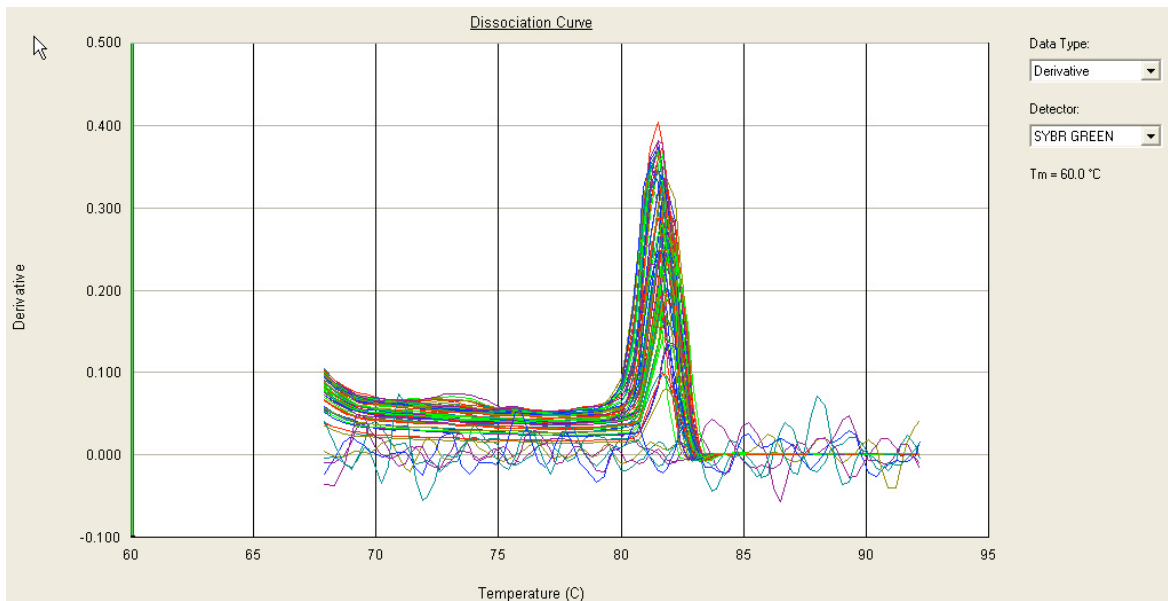


Abbildung 9: qPCR-Schmelzkurvenanalyse der Proben im TLR3-Lauf

Die Abbildung zeigt beispielhaft eine Schmelzkurvenanalyse der Proben, dessen TLR3-Expression untersucht wurde. Der DNA-Doppelstrang denaturiert hier bei einer Temperatur von ca. 82°C. Die 6 Proben, die nicht amplifiziert wurden, entsprechen Negativkontrollen.

Dreifache Negativkontrollen mit HPLC gereinigtem Wasser wurden zum Ausschluss von Verunreinigungen auf jeder Platte durchgeführt. Die Real-Time PCR-Läufe wurden mit der ABI 7300 System Software (Applied Biosystems) bearbeitet und danach mit dem Programm Excel 2003 (Microsoft Windows, Redmond, USA) ausgewertet.

2.3 Proteinlokalisierung

2.3.1 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen wurden zum spezifischen Nachweis von TLR3- und TLR4-Proteinen im humanen Endometrium genutzt. Auf diese Weise erfolgte die Lokalisation der Proteine im Gewebe und durch die Beurteilung der Färbeintensität der Präparate eine Quantifizierung der Proteinexpression.

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotomen (Reichert-Jung, Heidelberg) wurden von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe 6µm dicke Schnitte angefertigt. Das erkrankte postmenopausale Endometriumgewebe wurde in Form von Paraffinschnitten aus der Pathologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Die Gewebeschnitte wurden vor Versuchsbeginn deparaffiniert, rehydriert und mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Die Objekte wurden mit einem Lackstift (Pap-Pen, Dako, Glostrup, Dänemark) umkreist. Es folgte eine Epitop-Demaskierung durch Aufkochen in 0,01M Natrium-Citratpuffer (pH 6.0) (Merck, Darmstadt) in einer Mikrowelle für 2x5 Minuten. Die

Gewebeschnitte wurden nach Abkühlung in PBS mit 0,3% H₂O₂ in Methanol für 10 Minuten gequenchet.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden mit Arbeitsmaterialien des Vectastain Elite ABC Mouse Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Schnitte nach Waschen in PBS mit einer Pferde-Serum-Lösung (Vector Laboratories) in 30 minütiger Inkubation blockiert, bevor dann die primären TLR3- bzw. TLR4-Antikörper (Acris Antibodies, Hiddenhausen) auf die Schnitte gebracht wurden. Beide Antikörper wurden zuvor in veröffentlichten Studien erfolgreich getestet (TLR3: Muzio *et al.*, 2000; TLR4: Shimazu *et al.*, 1999). Nach Optimierung der Antikörper-Verdünnung für das verwendete endometriale Gewebe wurden die Antikörper in PBS- und Pferde-Serum-Lösung im Verhältnis 1:1 in den folgenden Konzentrationen hergestellt: anti-TLR3 1:50, anti-TLR4 1:10. Auf die Negativkontrollen wurde die zuvor benutzte Pferde-Serum-Lösung gebracht. Die Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe in PBS gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper für 30 Minuten aufgetragen wurde. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Komplex (ABC Reagenz, Vector Laboratories) für weitere 30 Minuten inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Dako) unter Mikroskop-Kontrolle gefärbt. Es folgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin sowie eine Differenzierung mit Ethanol-HCl-Lösung. Die Schnitte wurden nach der Färbung dehydriert und mit Histomount (Invitrogen) eingedeckt.

Die gefärbten Präparate wurden an einem Axiophot Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Nikon DS-U1 Kamera und der LUCIA Image Analysis Software (Nikon, Tokyo, Japan).

Neben der Proteinlokalisierung wurde eine Quantifizierung der Proteinexpression durchgeführt. Hierzu wurde ein subjektives System (Immunhistochemie-(IHC)-Score) entwickelt, welches die Färbeintensitäten der Präparate bewertete und unterteilte in: stark (3: +++), mittelstark (2: ++), schwach (1: +), oder negativ (0: -).

Das bei der Immunhistochemie verwendete Gewebe stammte aus dem in Tabelle 3 beschriebenen Patientenkollektiv und umfasste: prämenopausales Gewebe: Proliferationsphase (n=10), Sekretionsphase (n=10), Menstruationsphase (n=4); postmenopausales Gewebe: gesund (n=5), endometriale Hyperplasie (n=6), Endometriumkarzinom (n=13). Von jedem Gewebe wurden jeweils drei Schnitte angefertigt bzw. zur Verfügung gestellt, die gefärbt und beurteilt wurden.

2.3.2 Immunfluoreszenz

Zur Identifizierung von freien Zellen, die eine TLR4-Proteinexpression aufwiesen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen zur Kollokalisierung von TLR4 mit CD14 bzw. CD163 durchgeführt. Hierbei ist das Differenzierungsantigen CD14 auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiert, die als Vorläufer der dendritischen Zellen fungieren (Koski *et al.*, 2001). CD163 ist auf den meisten Subpopulationen von Makrophagen exprimiert (Fabriek *et al.*, 2005).

Mit einem Kryostaten (Leica, Wetzlar) wurden von dem gefrorenen Gewebe 7µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und danach getrocknet. Es folgte eine Fixierung mit 96%igem eisgekühlten Alkohol für 5 Minuten. Nach Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen der Antikörper durch eine 2x15 minütige Inkubation mit PBS/BSA (0,1% bovine serum albumin) blockiert. Daraufhin wurde das Gewebe mit dem ersten Antikörper für TLR4 in einer 1:10 Verdünnung mit PBS/BSA für 90 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/BSA wurde eine 45 minütige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper donkey-anti-mouse Alexa Fluor 488 (MoBiTech, Göttingen) mit einer Verdünnung von 1:300 durchgeführt. Durch die Verwendung dieses fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundär-Antikörpers musste die weitere Versuchsdurchführung im Dunkeln erfolgen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS/BSA wurde das Gewebe 2 Minuten mit 4% Formalin inkubiert, um eine Fixierung der Antigen-Primär-Sekundär-Antikörper-Komplexe zu gewährleisten, da sowohl der TLR4- als auch die CD-Antikörper aus der Maus stammten und Kreuzreaktionen der Antikörper verhindert werden sollten. Nach Auswaschen des Formalins mit PBS/BSA wurde das Gewebe mit dem primären Antikörper CD163 (HyCult Biotechnology, Uden, Niederlande) in einer 1:25 Verdünnung bzw. mit dem primären Antikörper CD14 (BioLegend, San Diego, USA) in einer 1:10 Verdünnung für 90 Minuten inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS/BSA folgte eine 45 minütige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper goat anti mouse Cy3 (Dianova, München) in einer 1:300 Verdünnung. Anschließend wurden weitere drei Waschschrritte mit PBS/BSA durchgeführt und kurz mit Aqua bidest gespült. Zur Detektion der Kerne erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 37°C mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) (Sigma, München) in einer Verdünnung von 1:200 in Methanol. Überschüssiges DAPI wurde anschließend durch kurzes Waschen mit Methanol entfernt, das Gewebe dann in Aqua bidest gewaschen und auf Objektträgern mit Mowiol (Sigma) fixiert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Laser Scanning Microscope (LSM 510, Zeiss). TLR4 wurde bei einer Wellenlänge von 488nm, CD163 und CD14 bei 535nm, und DAPI bei 366nm detektiert. Die unspezifische Hintergrundfärbung wurde durch die jeweilige Negativkontrolle herausgefiltert.

2.4 Statistische Auswertung

Die in der quantitativen Real-Time PCR und im IHC-Score ermittelten Expressionsunterschiede wurden mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests auf ihre Signifikanz hin mit dem Programm SPSS 14 für Windows (SPSS Inc., Chicago) überprüft. Des Weiteren wurden der Einstichproben-Median-Test nach Wilcoxon und der Kruksal-Wallis-Test berechnet. Expressionsunterschiede mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant, $P < 0,01$ als deutlich signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 TLR3- und TLR4-Expression im gesunden zyklischen Endometrium und in Endometriose

Zunächst erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR die Untersuchung der TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im zyklischen Endometrium gesunder Frauen. Generell zeigte sich im gesamten menstruellen Zyklus eine 135fach höhere und somit deutlich signifikant stärkere TLR4-mRNA-Expression im Vergleich zu TLR3 (Abbildung 10).

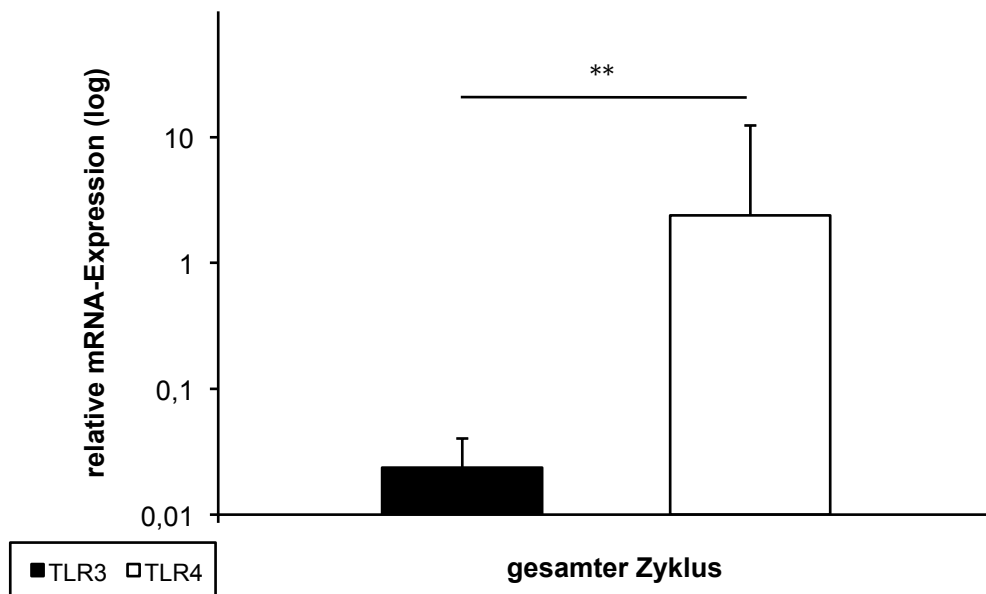


Abbildung 10: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im gesamten menstruellen Zyklus

TLR4-mRNA-Transkripte sind im Menstruationszyklus deutlich signifikant stärker exprimiert als TLR3-mRNA-Transkripte (** = $P < 0,01$). Die Balken repräsentieren die mittlere TLR3- und TLR4-mRNA-Expression der gesunden Frauen während des gesamten menstruellen Zyklus ($n=35$). Die mRNA-Expression wurde jeweils in 3-fach Ansätzen bestimmt. Die auf der y-Achse aufgetragene relative mRNA-Expression ist logarithmisch skaliert. Die Daten enthalten Fehlerindikatoren, die die Standardabweichungen in den Patientengruppen zeigen.

Im Folgenden wurden die einzelnen Zyklusphasen getrennt voneinander betrachtet (Abbildung 11). Hierbei war TLR4-mRNA in allen drei Zyklusphasen deutlich signifikant stärker exprimiert als TLR3-mRNA ($P < 0,01$). Dieser Expressionsunterschied war im menstruellen Gewebe besonders deutlich. Hier war das TLR4-Transkriptionslevel 564fach höher als jenes für TLR3.

Es konnten weder für TLR3- noch für TLR4-Transkripte signifikante Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Zyklusphasen und somit keine Regulation im menstruellen Zyklus beobachtet werden (Abbildung 11). Jedoch zeigten sich tendenzielle Zyklusschwankungen in der Expression beider Gene. So wurde TLR3-mRNA im Vergleich zur Proliferationsphase in der Sekretionsphase verstärkt exprimiert und fiel in der Menstruationsphase fast auf die Werte der Proliferationsphase ab. Die TLR4-mRNA-Expression hingegen stieg im Verlauf des Zyklus kontinuierlich an und zeigte in der Menstruationsphase ihr Expressionsmaximum.

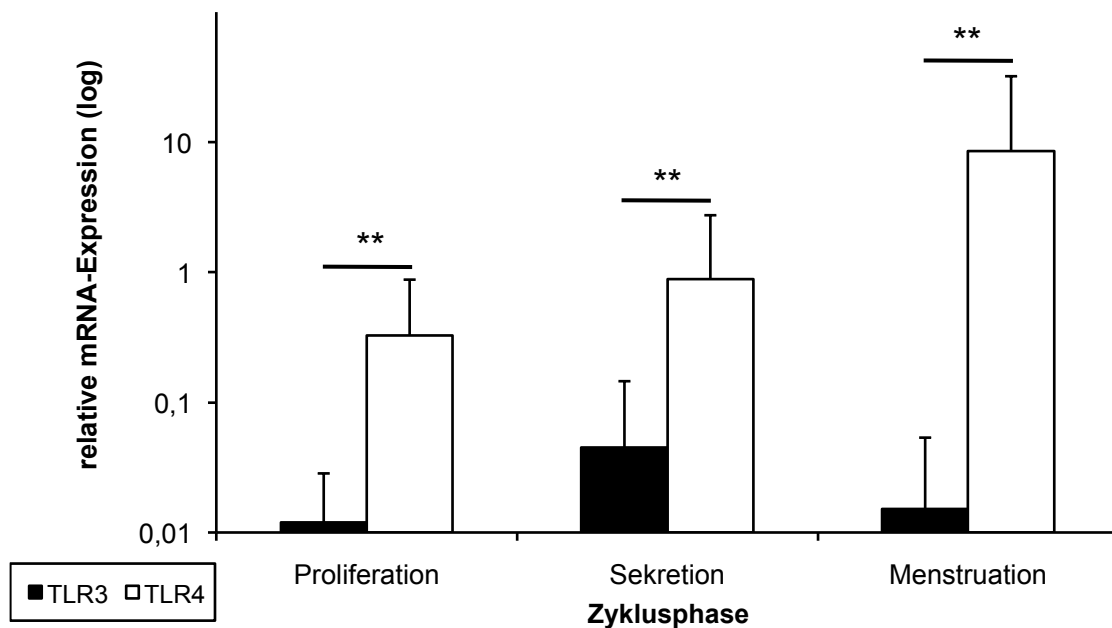


Abbildung 11: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in den einzelnen Zyklusphasen

Die TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im Endometrium zeigt keine Regulation im menstruellen Zyklus. Jedoch ist in allen Zyklusphasen eine deutlich signifikant höhere TLR4- als TLR3-Expression zu beobachten (** = $P < 0,01$). Die Balken repräsentieren die mittleren TLR3- und TLR4-mRNA-Expressionen der Patienten während der Proliferationsphase (n=16), Sekretionsphase (n=11) und Menstruationsphase (n=8), die in 3-fach Ansätzen bestimmt wurden. Die auf der y-Achse aufgetragene relative mRNA-Expression ist logarithmisch skaliert. Die Daten enthalten Fehlerindikatoren, die die Standardabweichungen in den Patientengruppen zeigen.

Zur Lokalisation von TLR3- und TLR4-Proteinen im humanen Endometrium und zur Quantifizierung der Proteinlevel wurden immunhistochemische Färbungen an endometrialen Gewebeschnitten durchgeführt.

Hierbei konnten TLR3- und TLR4-Proteine vor allem im luminalen und glandulären Epithel detektiert werden (Abbildung 12). TLR3-Proteine zeigten zum Teil ungleichmäßige Färbungen in den Drüsen (Abbildung 12A,B), TLR4-Proteine wurden zusätzlich in freien Immunzellen exprimiert (Abbildung 12F, siehe Pfeil).

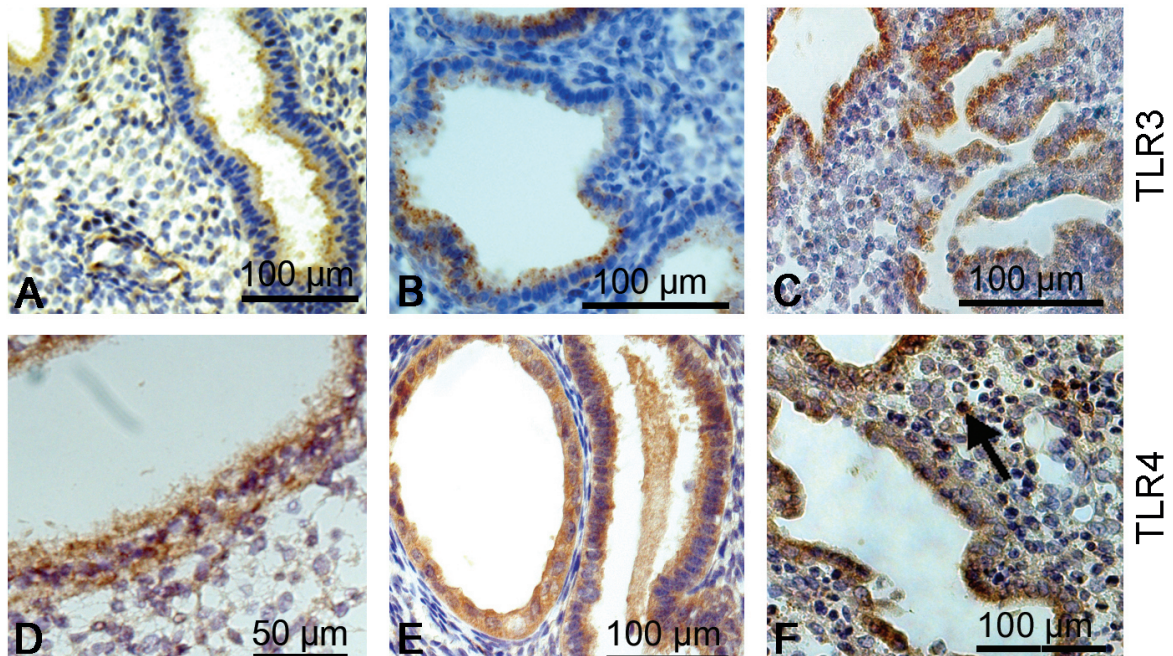


Abbildung 12: Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im gesunden zyklischen Endometrium

TLR3-Protein ist in spät proliferativem Endometrium (A) und in der späten Sekretionsphase (B) stark in luminalem und glandulärem Epithel exprimiert. Intensive TLR4-Färbungen können in der mittleren Proliferationsphase (D) und Sekretionsphase (E) beobachtet werden, wobei die Proteine bevorzugt im Epithel exprimiert sind. In der Menstruationsphase werden TLR3- (C) und TLR4- Proteine (F) vor allem in den bereits beschriebenen Lokalisationen angefärbt, wobei TLR4 zusätzlich in freien Immunzellen exprimiert wird (F, siehe schwarzer Pfeil).

Um die TLR4-exprimierenden Immunzellen identifizieren zu können, wurden exemplarisch Immunfluoreszenzfärbungen an Geweben in der Menstruationsphase durchgeführt (Abbildung 13), in denen zuvor, wie in Abbildung 12F zu sehen, TLR4-gefärbte freie Immunzellen beobachtet werden konnten. Die Immunfluoreszenzfärbungen ergaben TLR4-Expressionen auf CD14-positiven dendritischen Zellen und Monozyten (Abbildung 13A, siehe weißer Pfeil) sowie auf CD163-positiven Makrophagen (Abbildung 13B, siehe weißer Pfeil).

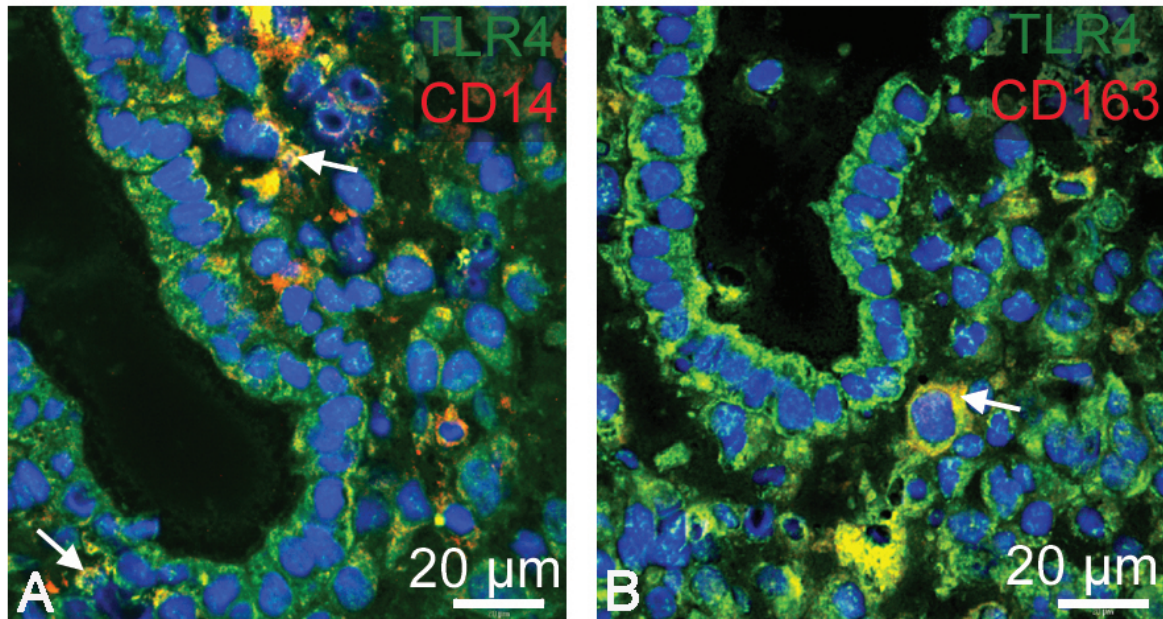


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen für TLR4 im menstruellen Gewebe

Immunfluoreszenzfärbungen wurden für TLR4, CD14 und CD163 an Gewebeschnitten in der Menstruationsphase durchgeführt. Die folgenden Farben repräsentieren die verschiedenen Rezeptoren: TLR4-Protein = grün, CD14 (A)/ CD163 (B) = rot, Zellkern = blau. Die gelbe Färbung zeigt die Kolokalisation von TLR4 mit CD14 (A) bzw. CD163 (B), welche exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert ist.

Die TLR3- und TLR4-Proteinexpression im menstruellen Zyklus wurde mittels des IHC-Scores bewertet und quantifiziert. Hierbei zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der TLR3- und TLR4-Expression im Endometrium während des menstruellen Zyklus (Abbildung 14). Auf Proteinebene konnte kein Unterschied zwischen den TLR3- und TLR4-Expressionstärken beobachtet werden, beide Rezeptoren waren hier gleichstark exprimiert. In der Menstruationsphase konnte sogar eine höhere TLR3-Proteinexpression im Vergleich zu TLR4 festgestellt werden. Diese Beobachtungen entsprechen somit nicht dem Expressionsverhalten der TLR3- und TLR4-mRNA im menstruellen Zyklus. Zudem stieg im Gegensatz zur mRNA-Expression sowohl die TLR4- als auch die TLR3-Proteinexpression kontinuierlich im Zyklus an und erreichte ihr Expressionsmaximum in der Menstruationsphase.

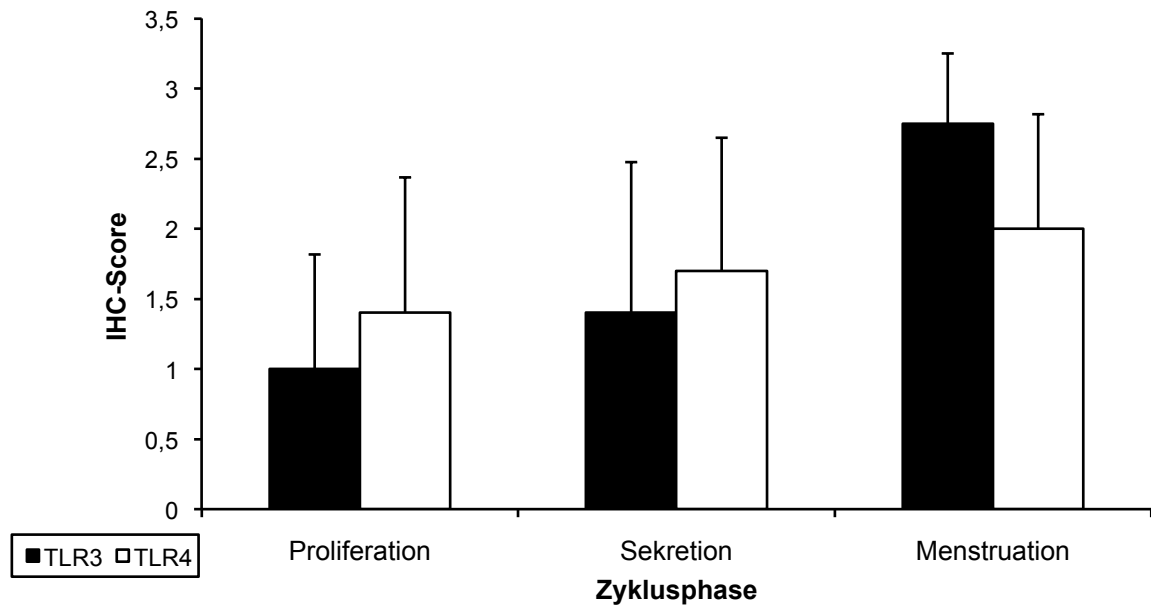


Abbildung 14: TLR3- und TLR4-Proteinexpression im zyklischen Gewebe

Im IHC-Score wurden die Schnitte nach ihrer Färbeintensität subjektiv beurteilt und daraufhin bewertet: 0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = mäßige Färbung, 3 = starke Färbung. Die Balken entsprechen den mittleren TLR3- und TLR4-IHC-Scores der Präparate in den einzelnen Zyklusphasen: Proliferationsphase (n=10), Sekretionsphase (n=10), Menstruationsphase (n=4). Die Standardabweichungen zwischen den Patienten sind durch Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

Um die potentielle Rolle von TLR3 und TLR4 in der Pathogenese der Endometriose zu untersuchen, wurde zunächst die TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in endometriotisch verändertem Gewebe im menstruellen Zyklus bestimmt. Die Ergebnisse wurden daraufhin mit den erhobenen Daten aus gesundem Gewebe in der jeweiligen Zyklusphase verglichen (Abbildung 15).

Alle Untersuchungen in endometriotischem Endometrium (e.E.) (Proliferations- und Sekretionsphase) ergaben höhere TLR4-Expressionslevel im Vergleich zu TLR3. Dieser Expressionsunterschied entsprach den Ergebnissen, die zuvor im gesunden zyklischen Endometrium beobachtet wurden.

Im proliferativen, eutopen Endometrium von Patientinnen mit Endometriose zeigte die TLR3-mRNA eine 4fach geringere und signifikant erniedrigte Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe (Abbildung 15A). TLR4-mRNA wurde in eutopem endometriotischem Endometrium in der Proliferationsphase 39fach und somit signifikant vermindert zum Vergleichswert des gesunden Gewebes exprimiert (Abbildung 15C). In der Sekretionsphase wurde ebenfalls, hier jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede, eine geringere TLR3- (Abbildung 15B) und TLR4- (P=0,08, Abbildung 15D) mRNA-Expression im eutopen endometriotischen Endometrium im Vergleich zu gesundem Gewebe beobachtet.

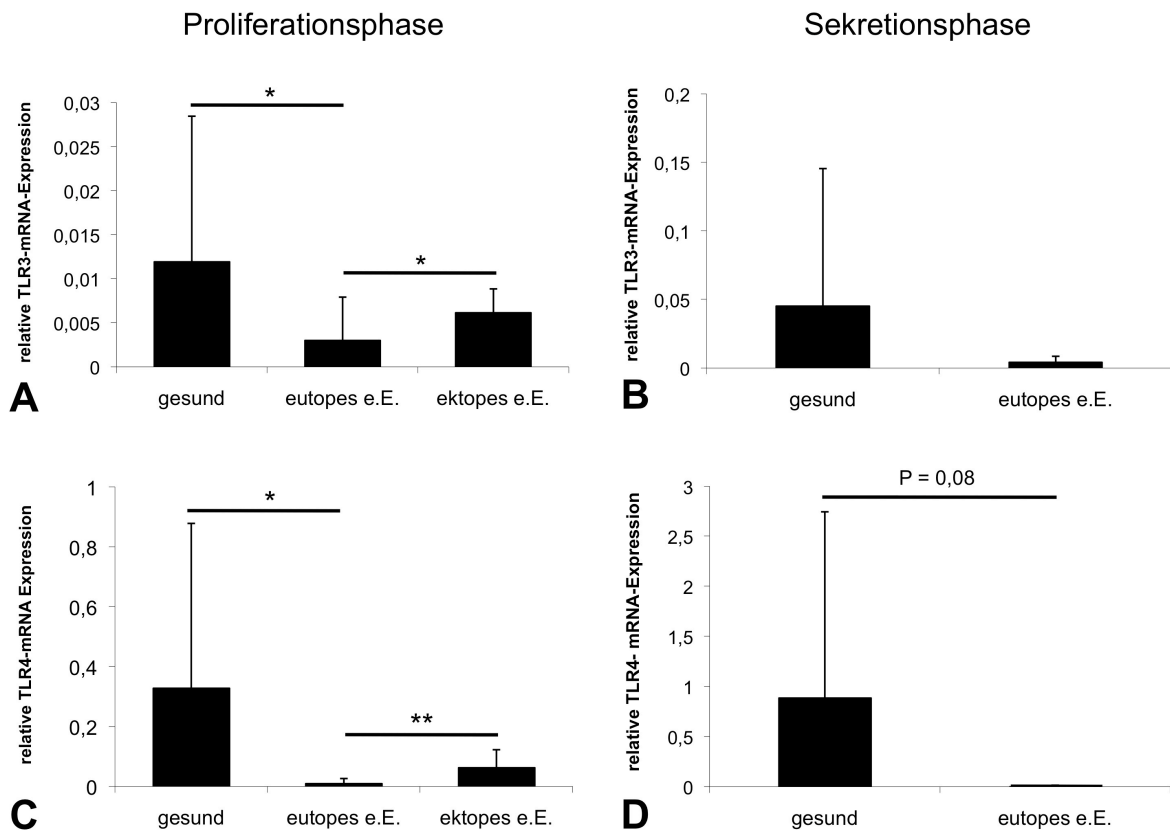


Abbildung 15: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in Endometriose

Die Balken zeigen die mittlere TLR3- (A, B) und TLR4- (C, D) mRNA-Expression von endometriotischem Endometrium (e.E.) in der Proliferationsphase (n=13) (A, C) und Sekretionsphase (n=3) (B, D) im Vergleich zu gesundem Endometriumgewebe (Proliferationsphase, n=16; Sekretionsphase, n=11). Zusätzlich wurden 4 korrespondierende ektote endometriotische Endometriumproben aus der Proliferationsphase untersucht (A, C). Die mRNA-Expression wurde jeweils in 3fach Ansätzen bestimmt. Es sind Mittelwerte mit Fehlerindikatoren aufgetragen, die die Standardabweichungen zwischen den Patienten angeben. Signifikante Expressionsunterschiede ($P < 0,05$) wurden mit einem Stern markiert, deutlich signifikante Unterschiede ($P < 0,01$) mit zwei Sternen.

Zur weiteren Untersuchung der Endometriose wurde die TLR3- und TLR4-mRNA-Expression von 4 korrespondierenden ektopen Endometrioseherden in der Proliferationsphase mit der Expression im zugehörigen eutopen endometriotischen Endometrium verglichen. Diese ektopen endometriotischen Läsionen zeigten eine signifikant höhere TLR3-mRNA-Expression im Vergleich zum eutopen endometriotischen Endometriumgewebe ($P < 0,05$, Abbildung 15A). TLR4-mRNA wurde in den Endometrioseherden sogar 26fach stärker exprimiert und wies so eine deutlich signifikante Zunahme der Expression im Vergleich zum eutopen endometriotischen Endometrium auf ($P < 0,01$, Abbildung 15C).

Zur Lokalisation von TLR3- und TLR4-Proteinen wurden im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abbildung 16).

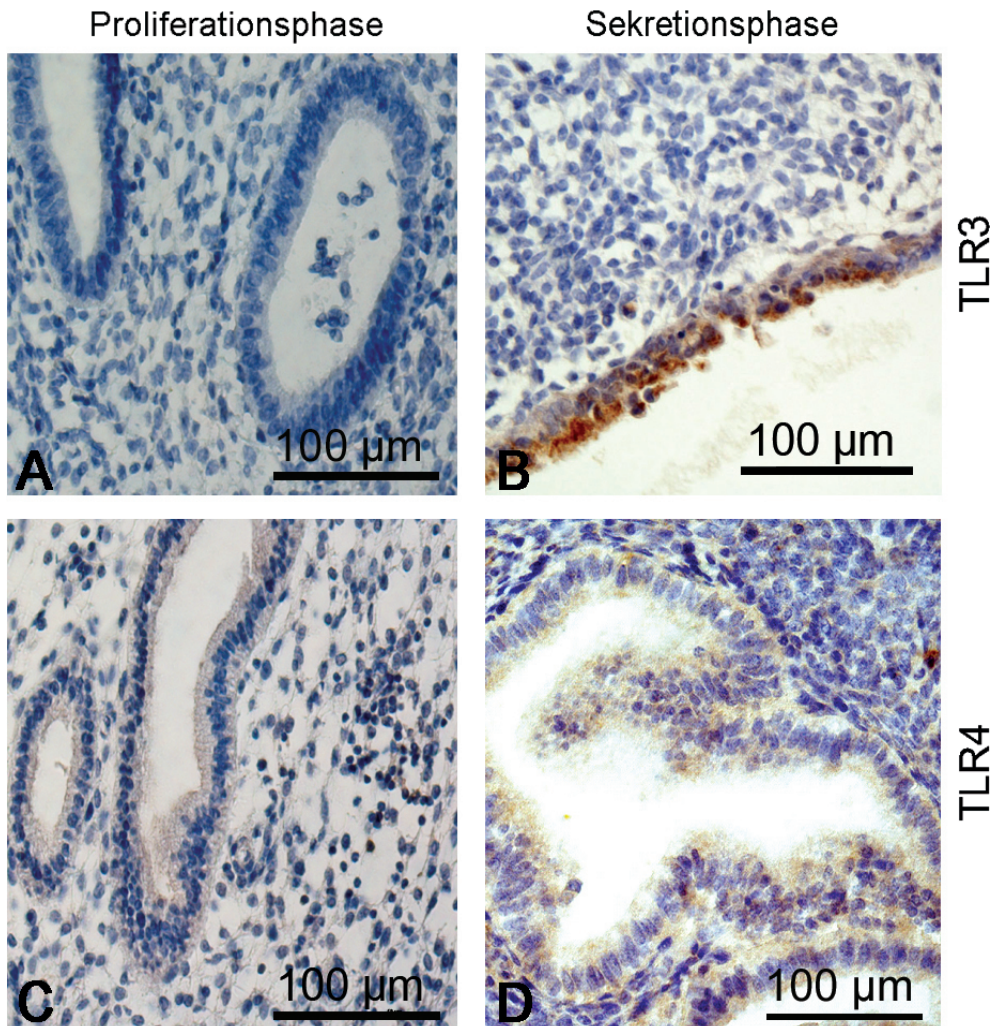


Abbildung 16: Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im eutopen endometriotischen Endometrium
 Im eutopen Endometrium von Patientinnen mit Endometriose sind TLR3- und TLR4-Proteine in der Proliferationsphase schwach exprimiert und zeigen keine spezifische Färbung (A,C). In der Sekretionsphase lässt sich für beiden Rezeptoren eine Lokalisation im glandulären Epithel erkennen (B,D).

Im proliferativen endometriotischen Endometrium war keine spezifische TLR3- und TLR4-Proteinexpression erkennbar (Abbildung 16A, C), wohingegen im sekretorischen Gewebe TLR3- und TLR4-Proteine in glandulärem Epithel nachgewiesen werden konnten (Abbildung 16B,D).

Die mittels Immunhistochemie gefärbten Gewebeschnitte einer an Endometriose erkrankten Patientin bestätigten eine lokale TLR3- und TLR4-Proteinzunahme in korrespondierenden Endometrioseherden gegenüber dem eutopen endometriotischen Endometrium während der Proliferationsphase (Abbildung 17). Im eutopen endometriotischen Endometrium zeigten TLR3- und TLR4-Proteine keine spezifische Färbung (Abbildung 17A,C), wohingegen in den korrespondierenden ektopen Herden eine Färbung der Proteine in den Drüsen beobachtet werden konnte (Abbildung 17B,D).

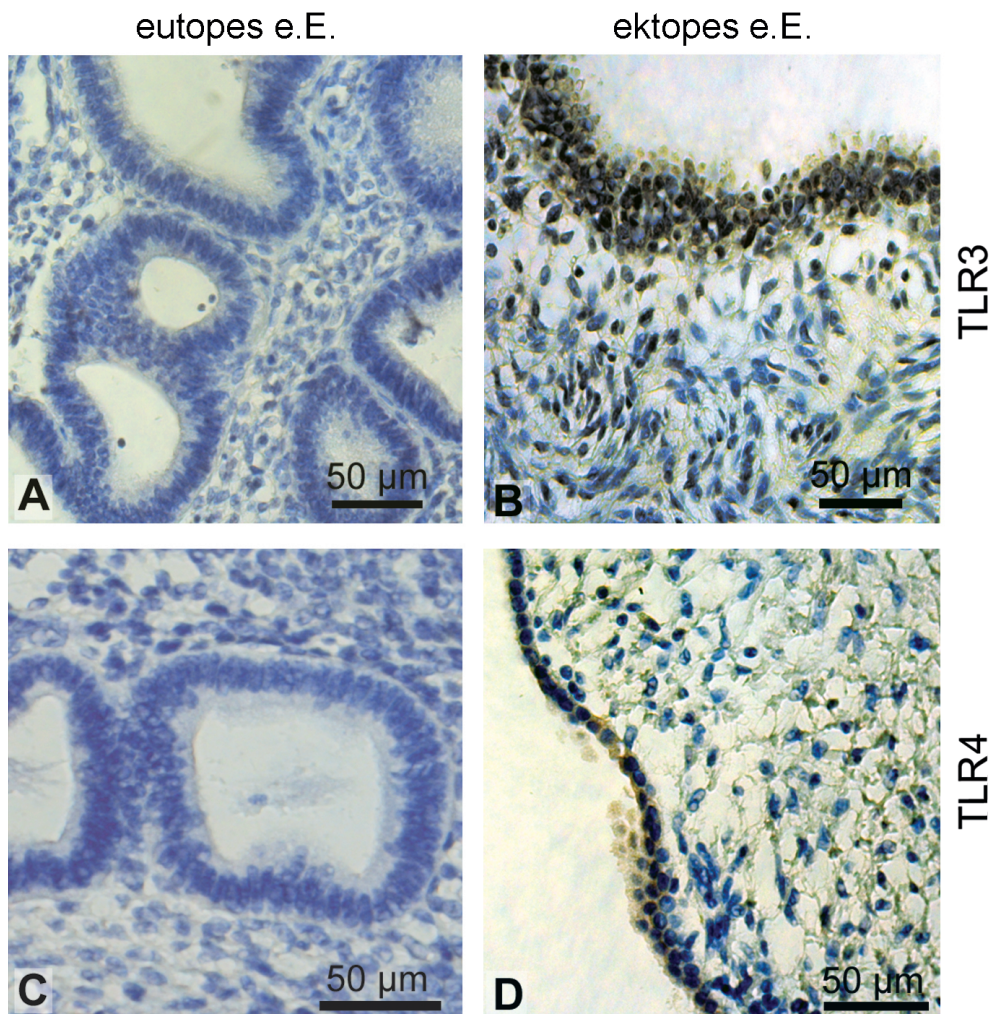


Abbildung 17: Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im eutopen und korrespondierenden ektope endometriotischen Endometrium (e.E.)

Immunhistochemische Färbungen für TLR3 (A, B) und TLR4 (C, D) wurden auf proliferativem eutopem (A,C) und ektope (B,D) Endometrium derselben Patientin mit Endometriose durchgeführt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Toll-like Rezeptor 3 und Toll-like Rezeptor 4 im eutopen Endometrium von Patientinnen mit Endometriose vermindert exprimiert werden. Lokal konnte in den korrespondierenden ektope endometriotischen Läsionen eine verstärkte Expression der beiden Rezeptoren beobachtet werden.

3.2 TLR3- und TLR4-Expression im gesunden postmenopausalen Endometrium, in endometrialer Hyperplasie und im Endometriumkarzinom

Die Untersuchungen der TLR3- und TLR4-Expressionsstärken im Krankheitsbild des endometrioiden Endometriumkarzinoms erfolgten im postmenopausalen Gewebe, da vorwiegend Patientinnen in der Postmenopause erkranken.

Zunächst wurde die TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im gesunden postmenopausalen Endometrium, welches im Folgenden als Kontrollgewebe diente, mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Die so ermittelten TLR3- und TLR4-mRNA-Expressionslevel wurden mit den bereits erhobenen Daten aus dem gesunden zyklischen Endometrium, beispielhaft in der Proliferationsphase, verglichen (Abbildung 18).

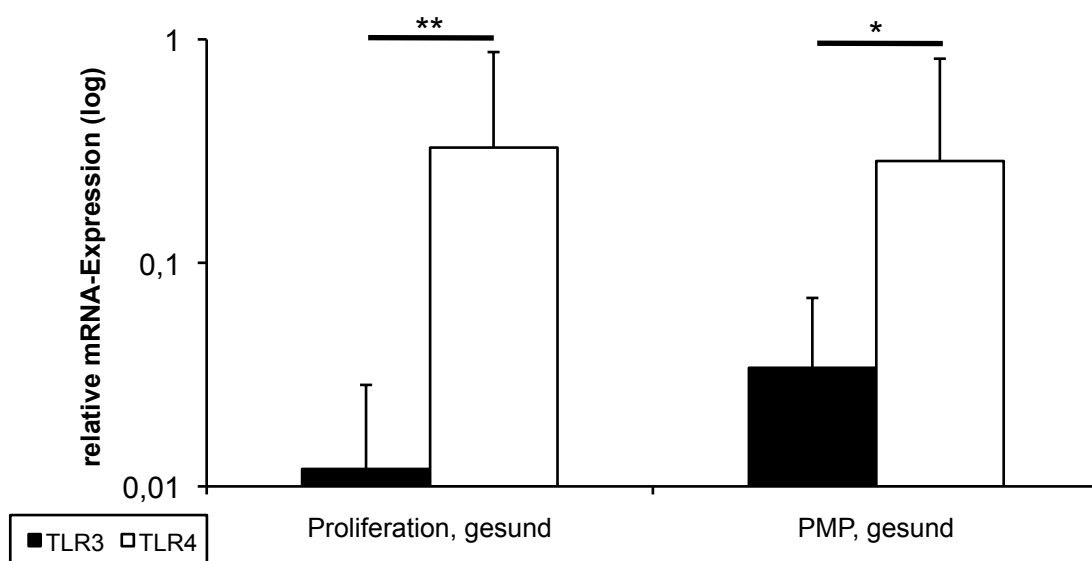


Abbildung 18: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im zyklischen proliferativen und im postmenopausalen Endometrium gesunder Frauen

Die Balken beschreiben die mittlere TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im Endometrium von zyklischen (Proliferationsphase, n=16) und postmenopausalen Gewebeproben (PMP, n=6), die in 3fach Ansätzen bestimmt wurden. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Die Daten enthalten Fehlerindikatoren, die die Standardabweichungen zwischen den Patientinnen anzeigen. Signifikante Expressionsunterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem Stern markiert, deutlich signifikante Unterschiede ($P < 0,01$) mit zwei Sternen.

Hierbei zeigten sich im gesunden postmenopausalen Gewebe höhere TLR3- und gleichstarke TLR4-Expressionslevel im Vergleich zum gesunden proliferativen Endometrium. TLR4-mRNA wurde in den gesunden postmenopausalen Kontrollen 8-fach höher und somit signifikant stärker exprimiert als TLR3-Transkripte ($P < 0,05$), was den Beobachtungen aus den zyklischen endometrialen Geweben entspricht.

Interessanterweise konnte in der atypischen endometrialen Hyperplasie und im endometrioiden Endometriumkarzinom eine Regulation der Expressionslevel beobachtet werden (Abbildung 19).

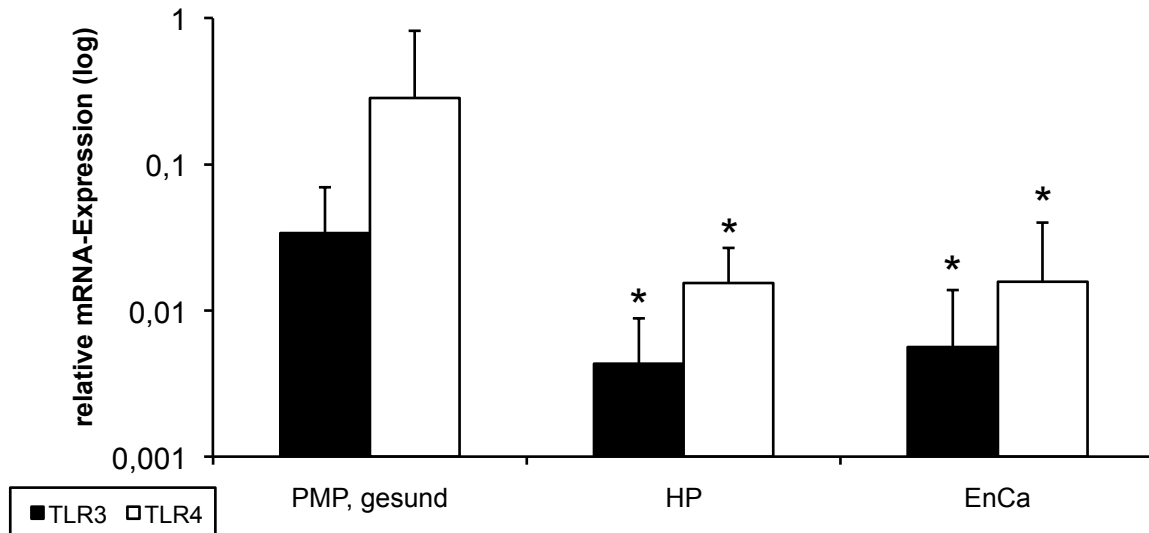


Abbildung 19: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im gesunden postmenopausalen Endometrium, in endometrialer Hyperplasie und im endometrioiden Endometriumkarzinom

Die Balken beschreiben die mittlere TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im Endometrium von gesunden postmenopausalen Patientinnen (PMP, n=6), und solchen die mit einer atypischen endometrialen Hyperplasie (HP, n=8) und einem endometrioiden Endometriumkarzinom (EnCa, n=16) diagnostiziert wurden. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Die Daten enthalten Fehlerindikatoren, die die Standardabweichungen zwischen den Patientinnen anzeigen. Die Sterne geben signifikante Expressionunterschiede ($P < 0,05$) zwischen den Proben an und beziehen sich jeweils auf das gesunde postmenopausale Kontrollgewebe.

Im hyperplastischen Endometrium wurde TLR3-mRNA 8-fach und somit signifikant geringer ($P < 0,05$) und TLR4-Transkripte 19-fach und signifikant vermindert ($P < 0,05$) gegenüber gesunden Kontrollen exprimiert. Die Ergebnisse zeigten weiterhin eine signifikante 6-fache Abnahme der TLR3-mRNA-Expression und für TLR4-mRNA eine signifikante 18-fach geringere Expression im endometrioiden Adenokarzinom im Vergleich zum gesunden postmenopausalen Endometrium.

Des Weiteren wurde die TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in den verschiedenen Differenzierungsstadien des endometrioiden Endometriumkarzinoms untersucht (Abbildung 20). Hierzu wurden die Malignome nach dem histopathologischen Grading gemäß der FIGO-Kriterien eingeteilt in: G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (undifferenziert).

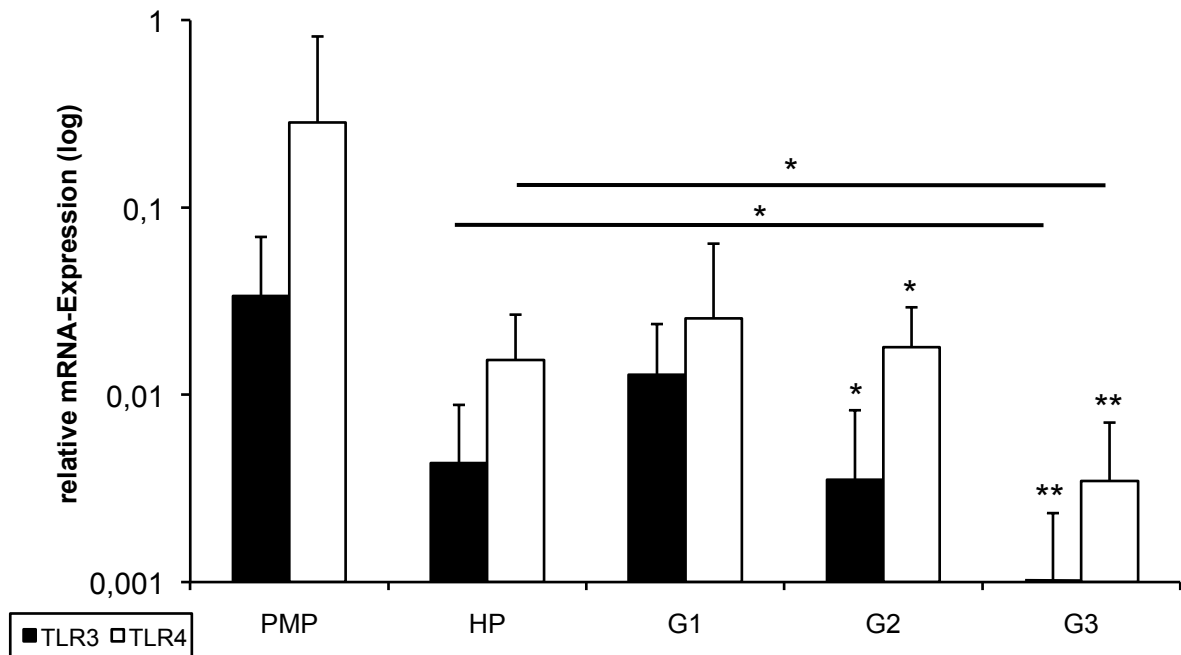


Abbildung 20: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in den verschiedenen Differenzierungsstadien des endometrioiden Endometriumkarzinoms

Die TLR3- und TLR4-mRNA-Expression wurde in den verschiedenen Differenzierungsstadien des endometrioiden Adenokarzinoms (G1, n=5; G2, n=6; G3, n=5) mittels qPCR untersucht und mit den Expressionsstärken im gesunden postmenopausalen Endometrium (PMP, n=6) und in der atypischen endometrialen Hyperplasie (HP, n=8) verglichen. Die y-Achse ist logarithmisch aufgetragen. Die Daten sind mit Fehlerindikatoren versehen, die die Standardabweichungen zwischen den Patientinnen aufzeigen. Signifikante Expressionsunterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem Stern markiert, deutlich signifikante Unterschiede ($P < 0,01$) mit zwei Sternen. Sterne ohne Strich beziehen sich jeweils auf das gesunde postmenopausale Kontrollgewebe.

Im gut differenzierten endometrioiden Adenokarzinom (G1) wurde ein 2- bzw. 3-facher Wiederanstieg der TLR3- bzw. TLR4-mRNA-Expression gegenüber der atypischen endometrialen Hyperplasie beobachtet. Im Vergleich zum gesunden postmenopausalen Gewebe zeigten die TLR3-Transkripte des G1-Karzinoms eine 3-fache und die TLR4-mRNA-Level eine 11-fache Expressionsabnahme. In mäßig differenziertem Karzinomgewebe (G2) fiel die Expression beider Rezeptoren weiter und präsentierte gegenüber gesundem postmenopausalem Kontrollgewebe für TLR3-mRNA eine signifikante 10-fache und für TLR4-mRNA eine signifikante 16-fache Erniedrigung. Im undifferenzierten endometrioiden Karzinom (G3) war die TLR3- und TLR4-mRNA mit einer 34- bzw. 82-fachen Expressionsabnahme im Vergleich zu gesundem postmenopausalem Endometrium weiter herunter reguliert und am Detektionslimit. Die statistische Auswertung zeigte hier eine deutlich signifikante Abnahme der Expression beider Rezeptoren im Vergleich zu gesunden postmenopausalen Kontrollen ($P < 0,01$).

Des Weiteren präsentierte das undifferenzierte G3-Karzinom signifikant erniedrigte TLR3- und TLR4-mRNA-Expressionslevel im Vergleich zur atypischen endometrialen Hyperplasie.

In Bezug auf die Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine ergaben sich höchste Expressionen im luminalen und glandulären Epithel (Abbildung 21). TLR3-Proteine zeigten zum Teil, wie schon in zyklischem Gewebe, eine ungleichmäßige Expression in den endometrialen Drüsen des postmenopausalen Gewebes (siehe z.B. Abbildung 21C). Insgesamt konnte in den verschiedenen Differenzierungsstadien des endometrioiden Endometriumkarzinoms keine Veränderung der Lokalisation von TLR3- und TLR4-Proteinen beobachtet werden. Neben der deutlichen Färbung der TLR3- und TLR4-Proteine im gesunden postmenopausalen Gewebe (Abbildung 21A,F), wurden schwächere Signalintensitäten in der atypischen endometrialen Hyperplasie (Abbildung 21B,G), im gut differenzierten G1-Karzinom (Abbildung 21C,H) und im mäßig differenzierten G2-Karzinom (Abbildung 21D,I) beobachtet. Im undifferenzierten G3-Karzinom konnten weder TLR3- (Abbildung 21E) noch TLR4- (Abbildung 21J) Proteine spezifisch angefärbt werden.

Wie in Abbildung 21F und 21H gezeigt (siehe schwarze Pfeile in den Vergrößerungsausschnitten), konnte TLR4-Protein wiederum in freien Immunzellen nachgewiesen werden. Um diese Zellen zu identifizieren, wurden, wie schon an menstruellem Gewebe, Immunfluoreszenzfärbungen an Kryostatschnitten durchgeführt (Abbildung 22). Abbildung 22A und 22C zeigen gesundes postmenopausales Gewebe, während Abbildung 22B und 22D endometrioides Karzinomgewebe präsentieren. Hierbei konnte eine Expression von TLR4 auf CD14-positiven dendritischen Zellen und Monozyten (Abbildung 22A,B, siehe weiße Pfeile) sowie auf CD163-positiven Makrophagen (Abbildung 22C,D, siehe weiße Pfeile) nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen im menstruellen Gewebe (siehe Abbildung 13).

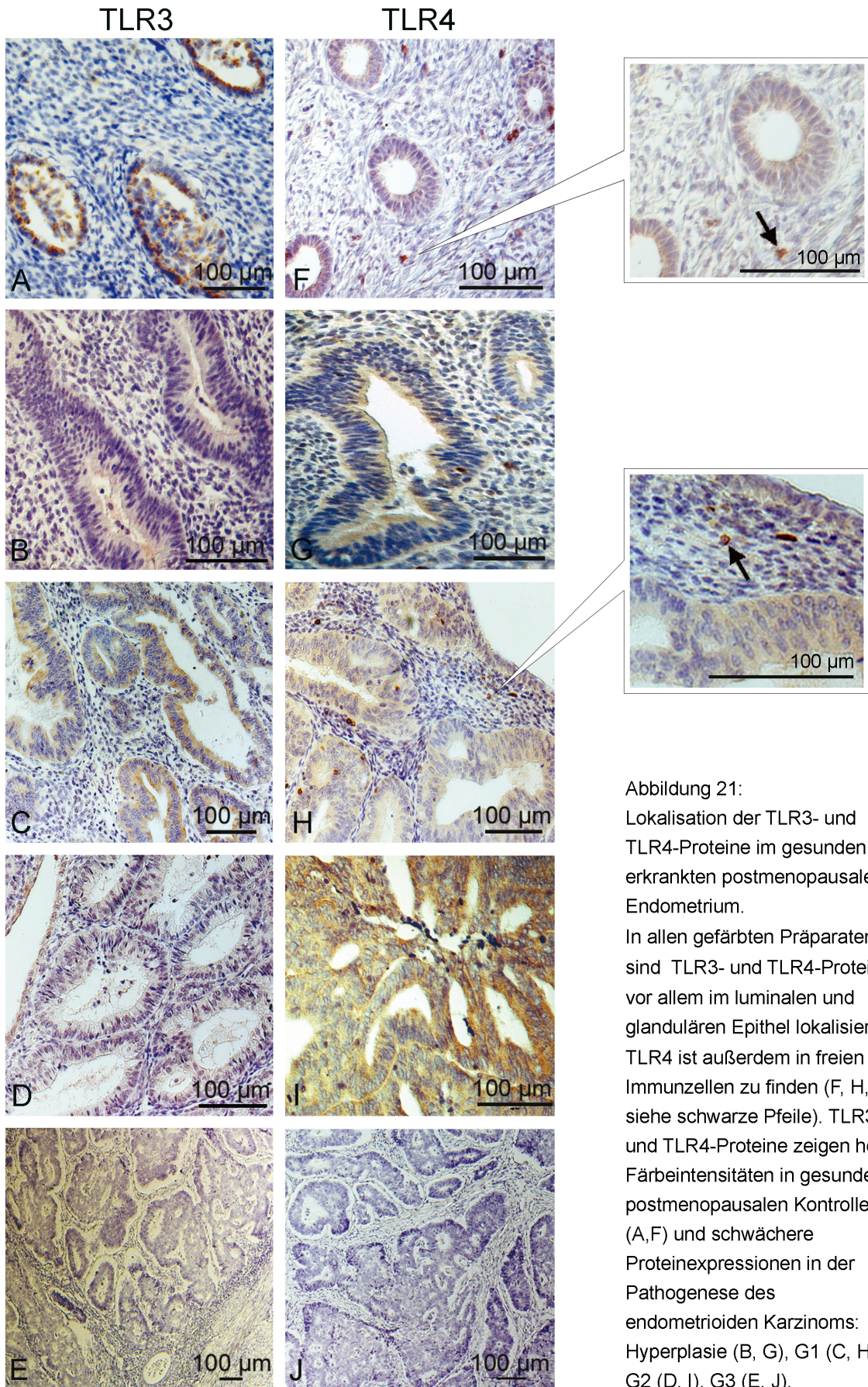


Abbildung 21:
 Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im gesunden und erkrankten postmenopausalen Endometrium.
 In allen gefärbten Präparaten sind TLR3- und TLR4-Proteine vor allem im luminalen und glandulären Epithel lokalisiert. TLR4 ist außerdem in freien Immunzellen zu finden (F, H, siehe schwarze Pfeile). TLR3- und TLR4-Proteine zeigen hohe Färbintensitäten in gesunden postmenopausalen Kontrollen (A,F) und schwächere Proteinexpressionen in der Pathogenese des endometrioiden Karzinoms: Hyperplasie (B, G), G1 (C, H), G2 (D, I), G3 (E, J).

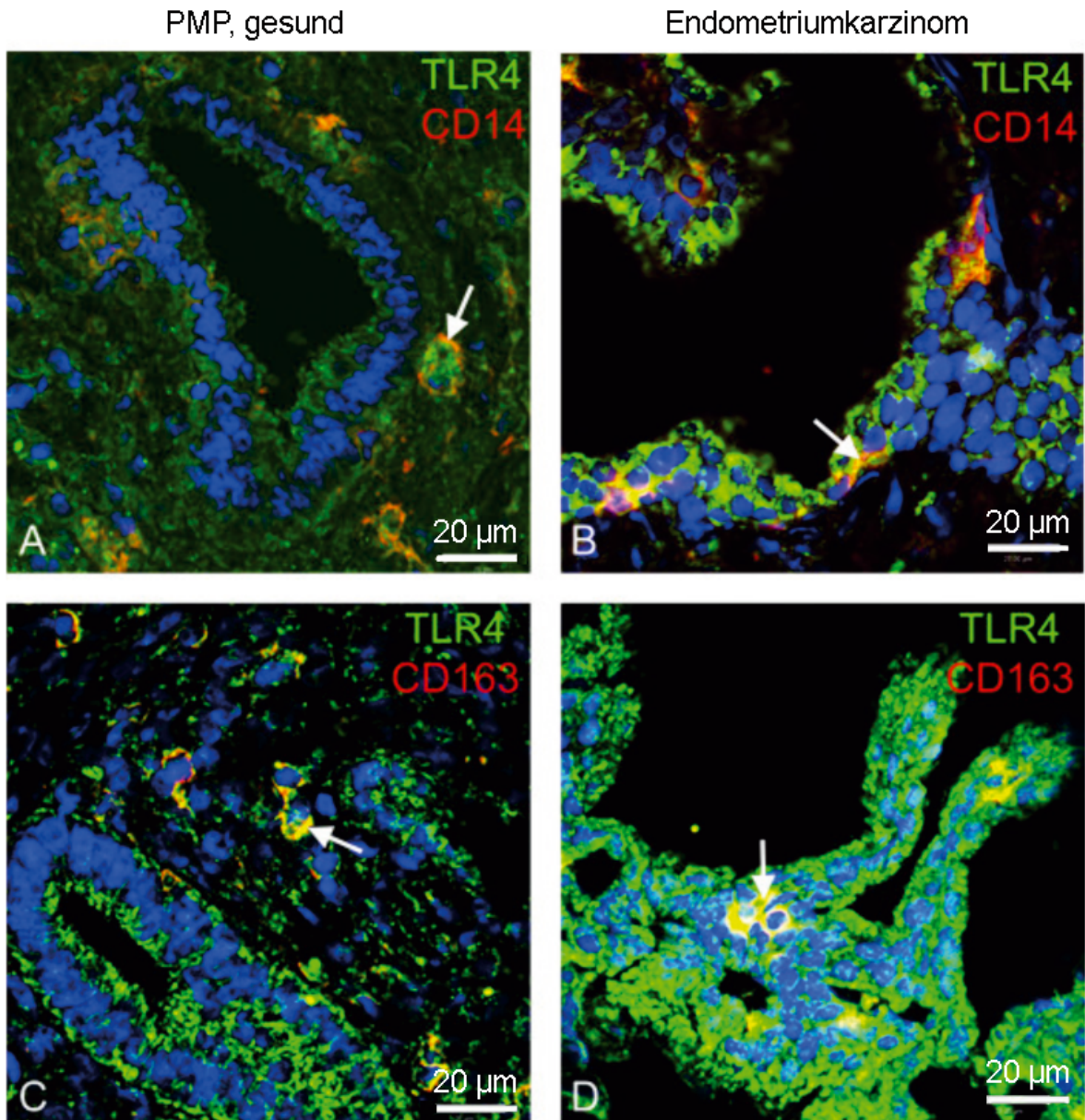


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbungen für TLR4 im gesunden postmenopausalen Endometrium und im endometrioiden Endometriumkarzinom

Immunfluoreszenzfärbungen für TLR4, CD14 und CD163 im gesunden postmenopausalen Gewebe (A,C) und im endometrioiden Adenokarzinom (B,D). Farbmarkierungen: TLR4 = grün, CD14 (A,B)/ CD163 (C,D) = rot, Zellkerne = blau. Die gelbe Färbung zeigt die Kolokalisation von TLR4 mit CD14 (A,B) bzw. CD163 (C,D).

Zur Expressionsbestimmung auf Proteinebene wurden 24 postmenopausale Gewebeschnitte immunhistochemisch für TLR3 und TLR4 gefärbt und mittels des subjektiven IHC-Scores quantitativ bewertet (Abbildung 23). Die Auswertung zeigte 3-fach erniedrigte TLR3-Proteinlevel in endometrialer Hyperplasie sowie im endometrioiden Endometriumkarzinom gegenüber gesundem postmenopausalen Kontrollgewebe. Für TLR4 konnten kaum Veränderungen der Proteinexpression zwischen gesundem postmenopausalen, hyperplastischem und karzinomatösem Gewebe beobachtet werden.

Des Weiteren waren im gesunden postmenopausalen Gewebe TLR3-Proteine stärker exprimiert als TLR4-Proteine. Diese Ergebnisse unterschieden sich somit von den erhobenen Daten der zuvor durchgeführten quantitativen Real-Time PCR.

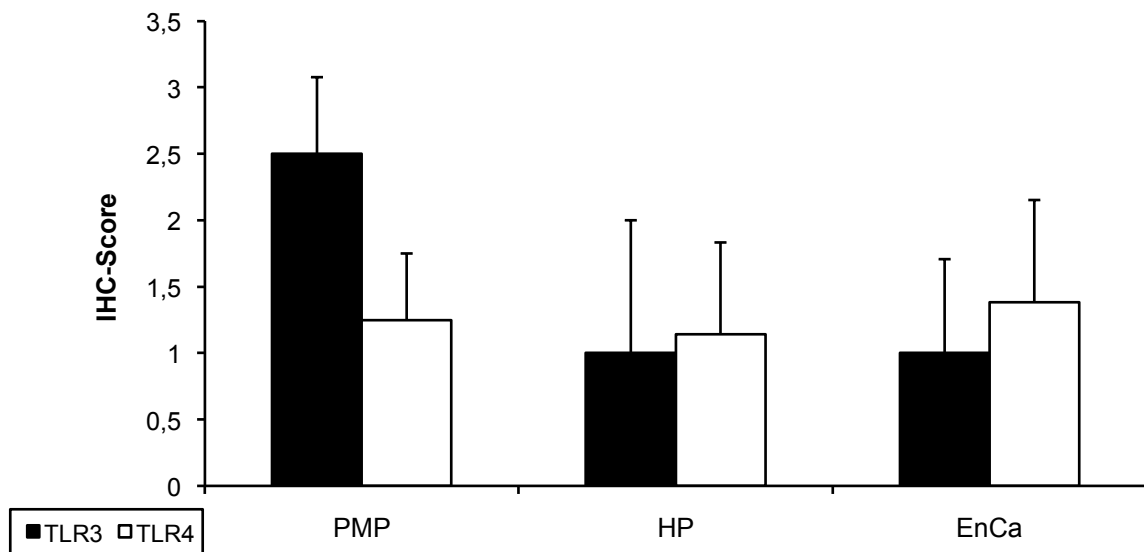


Abbildung 23: TLR3- und TLR4-Proteinexpression im gesunden postmenopausalen Endometrium, in endometrialer Hyperplasie und im endometrioiden Endometriumkarzinom

Zur Expressionsbestimmung der TLR3- und TLR4-Proteine wurden gesunde postmenopausale Gewebe (PMP, n=5), atypische endometriale Hyperplasien (HP, n=6) und endometrioiden Adenokarzinome (EnCa, n=13) immunhistochemisch gefärbt und subjektiv mit dem IHC-Score bewertet. Die Balken repräsentieren die mittleren TLR3- und TLR4-IHC-Scores der Präparate. Die Standardabweichungen zwischen den Patienten werden mit Fehlerindikatoren angezeigt.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde die Expression und Lokalisation der Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 im gesunden und pathologisch veränderten humanen Endometrium untersucht. Hierbei ergaben sich erste Hinweise auf eine Regulation beider Rezeptoren in den erkrankten Geweben der Endometriose und des endometrioiden Endometriumkarzinoms.

4.1 TLR3 und TLR4 im gesunden Endometrium

In der vorliegenden Arbeit wurden TLR3- und TLR4-Transkriptionslevel in endometrialen Geweben mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Da genspezifische cDNA-Standards verwendet wurden, konnte ein direkter Vergleich zwischen der TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in dem beschriebenen Probenpool erfolgen. Die Quantifizierung im zyklischen und postmenopausalen Endometrium in dieser Studie ergab generell höhere TLR4-mRNA- als TLR3-mRNA-Expressionslevel. Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungsergebnissen aus anderen Gewebe wie beispielsweise Darm, Lunge, Ovarien oder Plazenta, in denen höhere TLR3-Transkriptionslevel im Vergleich zu TLR4 beobachtet wurden (Zarembler und Godowski, 2002). Während TLR3 bei der Erkennung doppelsträngiger, viraler RNA eine wichtige Rolle spielt, löst TLR4 eine Immunantwort auf Lipopolysaccharide wie bakterielle Endotoxine aus und wird bei sterilen Entzündungen aktiviert (Takeda und Akira, 2005; Jiang *et al.*, 2006). Die in dieser Studie zu beobachtende TLR4-Dominanz könnte zum einen Ausdruck der sterilen Entzündung während des Menstruationszyklus sein. Zum anderen sind die hohen TLR4-Expressionslevel möglicherweise durch die Expression endogener Liganden im Endometrium wie beispielsweise Heat-shock Proteine, erklärbar. So konnte gezeigt werden, dass HSP60 und HSP70, die als endogene Liganden von TLR4 fungieren können (Takeda und Akira, 2005), in großer Anzahl im humanen zyklischen Endometrium exprimiert werden (Tabibzadeh *et al.*, 1996). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene starke TLR4-mRNA-Expression im menstruellen, abgestoßenen Gewebe könnte jedoch auch durch das erhöhte Risiko aufsteigender bakterieller Infektionen während der Menstruation bedingt (Eschenbach, 1976) und somit Ausdruck einer verstärkten uterinen Immunabwehr sein.

Es ist anzunehmen, dass Toll-like Rezeptoren im zyklischen Endometrium auch im Rahmen von zellulären Reparaturprozessen eine Rolle spielen. So diskutieren jüngste Studien einen Beitrag von Toll-like Rezeptoren an epithelialen Reparaturvorgängen, die bereits in intestinalen (Stenson, 2008) und alveolären Epithelzellen (Noble und Jiang, 2006) nachgewiesen werden konnten. Es wird vermutet, dass durch Nekrosen

entzündliche Prozesse ausgelöst werden, was im Folgenden zur Triggerung von Warnsignalen und zu einer Reparaturantwort durch TLRs führt (Stenson, 2008).

Im Endometrium könnte hierbei das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure von Bedeutung sein. Glykosaminoglykane bestehen aus repetitiven Disaccharid-Einheiten und entsprechen linear aufgebauten, sauren Polysacchariden. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist die Hyaluronsäure (Hyaluronan), die einen entscheidenden Bestandteil der Grundsubstanz der extrazellulären Matrix darstellt. Hyaluronsäure wird vor allem in schnell wachsendem und umgebautem Gewebe exprimiert und steht in Zusammenhang mit biologischen Prozessen wie Angiogenese, Migration und inflammatorischer Genexpression (Pardue *et al.*, 2008). Im Endometrium konnte Hyaluronsäure nachgewiesen sowie eine Regulation während des menstruellen Zyklus beobachtet werden (Salamonsen *et al.*, 2001). Des Weiteren beschreiben neuere Studien die Verknüpfung von Hyaluronsäure mit der Signalkaskade von TLR4, wodurch eine Erkennung von Gewebeschäden erfolgt und der Reparaturprozess initiiert wird (Taylor und Gallo, 2006). So sind beispielsweise Hyaluronsäure-Fragmente mittels TLR4 in der Lage, endotheliale Zellen zur IL-8-Ausschüttung zu stimulieren (Taylor *et al.*, 2004). Nachfolgende Studien könnten Aufschluss darüber bringen, welche Rolle die Hyaluronsäure-TLR4-Signalkaskade im Endometrium und damit im menstruellen Zyklus spielt.

In dieser Studie waren beide untersuchten Toll-like Rezeptoren hauptsächlich in den endometrialen Epithelien lokalisiert, die den Ort der primären Immunantwort im Uterus darstellen. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Untersuchungen, die ebenfalls die stärkste TLR-Expression in Epithelien finden konnten (Fazeli *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2004). Hirata *et al.* (2005) fanden jedoch im zyklischen Endometrium auch hohe TLR4-Expressionen in endometrialen Stromazellen. Mithilfe von in-vitro Untersuchungen konnte die Forschungsgruppe zeigen, dass TLR4-Rezeptoren in endometrialen Epithelzellen nicht zur Erkennung von LPS fähig waren, außer wenn lösliches CD14 als Kofaktor zugefügt wurde (Hirata *et al.*, 2005). Dies wurde durch eine fehlende membranöse CD14-Expression in glandulären und luminalen Epithelzellen des Endometriums erklärt. In der gleichen Studie konnte hingegen eine membranöse CD14-Expression auf endometrialen Stromazellen nachgewiesen werden, die somit in der Lage waren, LPS zu erkennen (Hirata *et al.*, 2005). Es wurde postuliert, dass auf diesem Wege einerseits das Endometrium vor einer schädlichen Hyperreagibilität als Folge einer Immunantwort auf Mikroorganismen geschützt ist, andererseits hingegen Erreger, die bereits die epitheliale Barriere überwunden haben, erkannt werden und so eine adäquate Immunantwort erfolgt.

In der vorliegenden Studie konnte Toll-like Rezeptor 4 neben seiner Lokalisation in den Epithelien mittels Immunfluoreszenzfärbungen auch im endometrialen Stroma auf CD14- und CD163-positiven Immunzellen nachgewiesen werden. Bei dieser in-situ Untersuchung fand sich jedoch nur eine geringe Anzahl von CD14-positiven Zellen im Stroma, die Populationen von Monozyten beschreiben könnten. Untersuchungen an bovinen endometrialen Stroma- und Epithelzellen ergaben bereits eine Kolo-kalisation von TLR4-mRNA mit CD14-mRNA und -Protein (Herath *et al.*, 2006). Während Pioli *et al.* (2004) einige an der TLR4-Signalkaskade beteiligten Moleküle (TLR4, CD14, MD-2, MyD88) bereits im humanen Endometrium nachweisen konnte, konnte in der vorliegenden Untersuchung eine Kolo-kalisation von TLR4- und CD14-Protein im humanen endometrialen Gewebe gezeigt werden.

Die in dieser Studie durchgeführte Quantifizierung der TLR3- und TLR4-Proteinlevel mit Hilfe des subjektiven IHC-Scores spiegelt nicht die erhobenen Daten der TLR3- und TLR4-mRNA-Expression wider. Die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse zwischen der Protein- und mRNA-Ebene könnte zum einen durch eine posttranslationale Modifikation der TLR-Proteine erklärbar sein. So konnten Sun *et al.* (2006) zeigen, dass 35% der humanen extrazellulären TLR3-Domäne einer posttranslationalen Modifikation unterliegt. Zum anderen hängen die Ergebnisse der Immunhistochemie maßgeblich vom Fixierungsprozess ab, der schwer standardisierbar ist. Darüber hinaus lässt die Bewertung der Färbeintensität der Zellen (IHC-Score) lediglich eine subjektive Bewertung und nur eingeschränkt quantitative Aussagen zu. Eine Bestätigung der Proteinregulation mittels Westernblot wäre an dieser Stelle angezeigt gewesen, konnte jedoch aufgrund des unzureichenden Gewebematerials nicht erfolgen.

4.2 Deregulation der TLR3- und TLR4-Expression in Endometriose

Die Entstehung und Persistenz der Endometriose ist mit einer Immunderegulation assoziiert und verursacht eine chronische Entzündung im kleinen Becken und im Uterus, die einer sterilen Entzündung entspricht (Kyama *et al.*, 2003). Die vorliegende Arbeit zeigt erniedrigte TLR3- und TLR4-Expressionen im eutopen Endometrium von Endometriose-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Im Rahmen der Immunderegulation ist Endometriose mit einer veränderten Th1-/Th2-Immunantwort assoziiert (Guo, 2007). Das Th1-/Th2-Konzept basiert auf der Einteilung der CD4-positiven T-Lymphozyten in die Subtypen Th1 (T-Helferzelle Typ 1) und Th2. Diese Th-Subtypen wurden 1986 anhand ihrer unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster im Mausmodell beschrieben (Mosmann *et al.*, 1986). Hierbei bilden Th1-Lymphozyten IL-2, γ -Interferon und TNF α , während Th2-Lymphozyten im Gegensatz dazu IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 induzieren. Beim Menschen wurde dieses Konzept zuerst bei

bestimmten Krankheiten wie viralen Infekten, Infektionen mit Helminthen und Allergien beschrieben (Romagnani, 1994). Später konnte gezeigt werden, dass Autoimmunerkrankungen wie die entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Niessner und Volk, 1995) sowie die Multiple Sklerose (Kidd, 2003) mit einer abnorm starken Th1-Antwort assoziiert sind. Allergische Erkrankungen hingegen gehen eher mit einer erhöhten Th2-Antwort einher (Kidd, 2003). In Bezug auf die Endometriose wird eine verstärkte Th2-Immunität diskutiert (Podgaec *et al.*, 2007).

In intestinalen epithelialen Zellen wurde bereits durch Th2-Zytokine eine Herabregulierung von TLR3 und TLR4 gezeigt (Mueller *et al.*, 2006). Diese Regulationsmechanismen könnten auch im Endometrium Gültigkeit haben und somit zu den erniedrigten TLR-Expressionen führen, die in dieser Studie beobachtet wurden. Ob Th2-Zytokine in gesunden und erkrankten endometrialen Geweben die TLR-Signalkaskade modulieren und so zur Entstehung einer Endometriose beitragen können, muss in zukünftigen Untersuchungen evaluiert werden.

Interessanterweise wurde in dieser Studie eine lokale Erhöhung der TLR3- und TLR4-Expression in ektopen Läsionen im Vergleich zum eutopen endometriotischen Endometrium beobachtet. Dieser direkte Vergleich war durch das Vorhandensein von korrespondierendem, endometriotischem Gewebe möglich und zeigte einen signifikanten Anstieg der TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in ektopen Herden. So präsentierten andere Untersuchungen in Endometrioseherden ebenfalls erhöhte Gen-Expressionen, darunter auch für HSP90 (Matsuzaki *et al.*, 2006), das an der LPS-Erkennung durch TLR4 beteiligt ist (Triantafilou und Triantafilou, 2004). Für das Gen CYR61, dessen Protein die Zellmigration, Migration und Neovaskularisation fördert, konnte ebenfalls eine Deregulation in Endometriose nachgewiesen sowie ein Expressionsanstieg in ektopen Herden beobachtet werden (Absenger *et al.*, 2004). Des Weiteren ergaben jüngst veröffentlichte Studien in ovarialer Endometriose einen lokalen Expressionsanstieg der Oberflächenproteine CD14 und CD163 (Hever *et al.*, 2007), für die in der vorliegenden Arbeit eine Kollokalisierung mit TLR4-Proteinen gezeigt werden konnte.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich nicht herleiten, ob die veränderten Expressionslevel beider Rezeptoren Reaktionen auf das Vorhandensein von Endometrioseherden sind oder ob vielmehr eine Veränderung der Rezeptorexpressionen die Entstehung einer Endometriose bedingt. Solchen Fragestellungen kann in geeigneten Tiermodellen für Endometriose nachgegangen werden. So wurde kürzlich eine veränderte Expression uteriner Gene als Antwort auf eine operative Induktion der Endometriose beobachtet (Hastings *et al.*, 2006). Für das bereits erwähnte Gen CYR61 konnte im Primatenmodell nachgewiesen werden, dass die Induktion von endometriotischen Läsionen zu einer Deregulation der Expression im eutopen Endometrium führte (Gashaw

et al., 2006). Somit wurde zum ersten Mal ein Feedbackmechanismus zwischen Endometrioseherden und dem eutopen Endometrium bewiesen, der somit zu einer beeinträchtigten endometrialen Funktion führen kann. Auch für Toll-like Rezeptoren scheint ein solcher Zusammenhang denkbar, jedoch bleiben entsprechende Untersuchungen abzuwarten.

In endometrialen Herden konnten bereits verhältnismäßig hohe Mengen an NFκB gefunden werden (Gonzalez-Ramos *et al.*, 2007). Dies könnte durch die in dieser Studie zu beobachtenden hohen TLR-Expressionslevel in ektopen Läsionen erklärt werden, die daraufhin zu einer verstärkten Aktivierung der bekannten Signalkaskade und zur Produktion von NFκB führen. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von NFκB im Zusammenhang mit Proliferation und Angiogenese steht und zu einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in ektopen Herden führen kann (Guo, 2007). Somit könnte die TLR-NFκB-Kaskade an der chronischen Persistenz der Endometrioseherde beteiligt sein.

In allen endometriotischen Geweben konnten in der vorliegenden Studie höhere TLR4-mRNA-Expressionen im Vergleich zu TLR3 beobachtet werden. Vermutlich führt die durch Endometriose hervorgerufene sterile Entzündung im kleinen Becken zu einer erhöhten TLR4-mRNA-Expression. Khan *et al.* (2006) konnten ein TLR4-mediertes Wachstum von Endometrioseherden durch eine LPS-Aktivierung beobachten, die durch die Gabe von anti-TLR4-Antikörpern unterdrückt werden konnte. Auch HSP70, Indikator einer Stress-Reaktion, ist als TLR4-Ligand an der Entzündungsreaktion und dem Endometriose-Wachstum beteiligt (Khan *et al.*, 2008). Somit könnte TLR4 in Zukunft möglicherweise ein neues Therapie-Target der Endometriose darstellen, das die Entzündungsreaktion im kleinen Becken reduziert und das Wachstum der Endometrioseherde vermindert.

Auch das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure scheint, neben seiner Regulation im menstruellen Zyklus, in der Entstehung der Endometriose eine Rolle zu spielen. So wurde berichtet, dass Hyaluronsäure die Anlagerung von endometrialen Zellen am Mesothel begünstigt, was im Rahmen einer Endometriose in frühen Stadien beobachtet werden konnte (Dechaud *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde in sterilen Entzündungen, welche die Endometriose darstellt, ein Rezeptorkomplex aus TLR4, CD44 und MD-2 zur Erkennung von Hyaluronsäure nachgewiesen (Taylor *et al.*, 2009). Es bleibt zu prüfen, ob die Hyaluronsäure-TLR4-Signalkaskade in endometriotischem Gewebe reguliert ist und zur Pathogenese der Erkrankung beiträgt.

Eine beeinträchtigte Fertilität ist bei Frauen mit Endometriose ein häufiges Problem. Durch das Vorhandensein von proinflammatorischen Zytokinen wie TNFα oder γ-Interferon werden große Mengen an freien Radikalen freigesetzt, die Lipide, Proteine oder DNA schädigen. Folgen dieser entzündlichen Veränderungen können beeinträchtigte

Rezeptorfunktionen im reproduktiven System mit einer gestörten Implantation sein (Iborra *et al.*, 2005). Toll-like Rezeptoren spielen in diesem Zusammenhang möglicherweise eine wichtige Rolle, da eine enge Wechselwirkung mit den bereits beschriebenen Chaperonen besteht. So wurde eine Apoptose von Trophoblastzellen durch den exogenen TLR4-Liganden CHSP60 nachgewiesen (Equils *et al.*, 2006). Auch der bereits erwähnte TLR4-Ligand HSP70, ist bei infertilen Patientinnen mit Endometriose überexprimiert (Nip *et al.*, 1994). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von TLR3 an der Kontrolle der Plazentafunktion, dem Zusammenspiel zwischen Blastozyste und Endometrium und somit an der Pathophysiologie der Infertilität diskutiert (Komine-Aizawa *et al.*, 2008).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Th1/Th2 Balance, der TLR-Expression und der Pathogenese der Endometriose wurde bereits diskutiert. Im Bezug auf die reduzierte Fertilität von Patientinnen mit Endometriose könnte jedoch die Dysproportion zwischen der Th1- und Th2-Immunantwort zusätzlich von Bedeutung sein. So wird ein abnormer Th-Shift zur Th2-Antwort und eine Herunterregulierung der Th1-Funktion mit einer beeinträchtigten Fertilität in Verbindung gebracht (Yun *et al.*, 2004). Zukünftige Studien könnten evaluieren, ob veränderte TLR-Expressionen mit einer Endometriose-assoziierten Infertilität einhergehen.

Deregulierte TLR-Expressionslevel in endometriotischen Geweben könnten auch Ausdruck genetisch vererbter Mutationen der TLR-Gene sein. Über Polymorphismen als Ursache für die Endometriose gibt es jedoch geteilte Ansichten. Ein aktuelles Review aus dem Jahr 2009 kommt zu dem Schluss, dass bisher nur schwache Beweise an der Beteiligung von Polymorphismen an der Endometriose bestehen (Tempfer *et al.*, 2009). Hiernach haben lediglich die Träger der GSTT1-null-Deletion ein moderat erhöhtes Risiko an einer Endometriose zu erkranken. Im Gegensatz dazu beobachteten Kitawaki *et al.* (2001) ein erhöhtes Endometrioserisiko bei Auftreten des Östrogen-Rezeptor-Polymorphismus PvuII. Eine Verbesserung der Methodik von Assoziationsstudien sowie großangelegte Fall-Kontroll-Studien scheinen somit erforderlich, um die Frage nach der Beteiligung von Polymorphismen an der Endometriose zu klären.

Wie bereits in dieser Arbeit erörtert, ist aus den vorliegenden Daten nicht ersichtlich, ob die veränderte TLR-Expression Ursache oder Folge der endometriotischen Veränderungen ist. Weiterführende Studien sind nötig, um zu evaluieren, welche Rolle die Toll-like Rezeptoren im Krankheitsbild der Endometriose spielen und inwieweit sie an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sind.

4.3 **Deregulation der TLR3- und TLR4-Expression im Endometriumkarzinom**

Diese Studie zeigt deutlich erniedrigte TLR3- und TLR4-Expressionslevel im endometrioiden Endometriumkarzinom und in atypischen hyperplastischen Vorstufen im Vergleich zum gesunden postmenopausalen Gewebe. Dabei konnte mit zunehmender Dedifferenzierung der endometrioiden Adenokarzinome (G1 zu G3) eine abnehmende Expression an TLR3 und TLR4 beobachtet werden, die im undifferenzierten G3-Karzinom kaum noch messbar war. Interessanterweise konnte im gut differenzierten Karzinom (G1) eine tendentielle Zunahme der TLR3- und TLR4-Expression im Vergleich zur hyperplastischen Vorstufe nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen über die Expression von TNF α und NF κ B im Endometriumkarzinom (Vaskivuo *et al.*, 2002). Jene Studie zeigte nach einer Expressionszunahme im G1-Karzinom fallende TNF α - und NF κ B-Transkriptionslevel im G2- und G3-Karzinom, wobei die Expression beider Moleküle im undifferenzierten G3-Karzinom kaum noch nachweisbar war. Obwohl bisher keine Erklärung gefunden werden konnte, scheinen die extrem geringen TNF α -, NF κ B- und TLR-Expressionslevel im undifferenzierten G3-Karzinom eine Entdifferenzierung der epithelialen Zellen widerzuspiegeln. Dies könnte auf eine schlechte Prognose der Erkrankung hindeuten. Bei Patientinnen, die das TLR4-interagierende Molekül HSP90 exprimierten, konnte zwar eine bessere Prognose beobachtet werden (Nanbu *et al.*, 1998), jedoch wurde mit zunehmenden Karzinom-Grading eine signifikant abnehmende Expression des Chaperons nachgewiesen (Bai *et al.*, 2003). Somit könnte in Zukunft möglicherweise durch Bestimmung der TLR4- oder HSP90-Expression die individuelle Prognose des Endometriumkarzinoms besser eingeschätzt werden.

Der Einfluss von TLRs auf die Karzinogenese konnte bereits für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen werden. So wird ein Polymorphismus des TLR4-Gens, der mit einer Beeinträchtigung der TLR-Signalfunktion einhergeht, mit einem signifikant höheren Risiko für Magenkarzinome in Verbindung gebracht (Hold *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist ein Nukleotid-Polymorphismus in der 3'-untranslatierten Region desselben TLR4-Gens mit einem erhöhten Risiko für Prostatakarzinome assoziiert (Zheng *et al.*, 2004). Zukünftige Studien sind nötig, um die Rolle der Polymorphismen innerhalb der TLR-kodierenden Gene auch in der endometrialen Karzinogenese zu untersuchen.

Somit scheinen Toll-like Rezeptoren sowie Moleküle der TLR-Signalkaskade, in der Entwicklung und im Fortbestehen des Endometriumkarzinoms eine Rolle zu spielen. Welche Bedeutung den TLRs an der Pathogenese des Endometriumkarzinoms zukommt, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

Die Endometriose und das endometriale Karzinom sind Östrogen-abhängige Erkrankungen. In beiden Pathologien konnte in dieser Studie eine Regulation der TLR3- und TLR4-Expression gezeigt werden. Es ist bekannt, dass Östrogen die Expression von TLR3 (Lesmeister *et al.*, 2005) und TLR4 (Vegeto *et al.*, 2004; Paimela *et al.*, 2007) nicht beeinflusst. Dies wurde bereits in-vitro in epithelialen Zellen des Endometriums (Lesmeister *et al.*, 2005) bzw. der Retina (Paimela *et al.*, 2007) und in Makrophagen (Vegeto *et al.*, 2004) nachgewiesen. Somit ist das hier zu beobachtende TLR3- und TLR4-Expressionsverhalten nicht auf eine Regulation durch Östrogen zurückzuführen. In zukünftigen Studien sollte evaluiert werden, wodurch die veränderten TLR-Expressionen in der Endometriose und im Endometriumkarzinom bedingt werden und welche Bedeutung dies für das endometriale Gewebe hat. Neue Erkenntnisse in diesem Bereich könnten in Zukunft möglicherweise auch in der Therapie der Endometriose und dem Endometriumkarzinom eine Rolle spielen.

5 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielen eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Neben der Identifizierung von Pathogenen, sind diese auch an der Modulation der nachfolgenden Immunantwort beteiligt. Obwohl TLR3 und TLR4 bereits im humanen Endometrium nachgewiesen werden konnten, sind die Folgen der TLR-induzierten Zytokinproduktion auf das endometriale Gewebe und eine mögliche Einbindung in pathogenetische Prozesse unbekannt. Bisherige Studien zeigten, dass sowohl in der Entstehung der Endometriose als auch des endometrioiden Endometriumkarzinoms inflammatorische Zytokine wie Interleukine, Tumornekrosefaktor α oder der Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa B eine wichtige Rolle spielen. Da TLR3 und TLR4 in der Lage sind, diese Moleküle zu aktivieren, ist ein Beitrag an der Pathogenese beider endometrialer Erkrankungen anzunehmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die TLR3- und TLR4-mRNA- (messenger Ribonukleinsäure) und Protein-Expression im gesunden Endometrium während des menstruellen Zyklus und im postmenopausalen Gewebe untersucht. Generell wurden hierbei höhere TLR4-mRNA-Expressionen im Vergleich zu TLR3 beobachtet. TLR3- und TLR4-mRNA-Level zeigten im menstruellen Zyklus keine signifikanten Expressionsunterschiede. Im Bezug auf die Proteinlokalisierung waren TLR3- und TLR4-Proteine hauptsächlich im glandulären und luminalen Epithel zu finden. Des Weiteren konnte TLR4 auf CD14- (cluster of differentiation) und CD163-positiven Immunzellen nachgewiesen werden.

Die Untersuchungsergebnisse aus gesundem Gewebe wurden daraufhin mit der TLR3- bzw. TLR4-Expression in peritonealer Endometriose, atypischer endometrialer Hyperplasie und endometrioiden Endometriumkarzinom verglichen. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen im proliferativen eutopen Gewebe von Endometriose-Patientinnen eine signifikant erniedrigte TLR3- und TLR4-mRNA-Expression. Interessanterweise konnte im Vergleich hierzu in korrespondierenden ektopen Läsionen ein signifikanter TLR-Expressionsanstieg beobachtet werden. In endometrialer Hyperplasie und im Endometriumkarzinom wurden im Vergleich zu gesunden postmenopausalen Kontrollen erniedrigte TLR3- und TLR4-Expressionen gefunden. Niedrigste TLR-Transkriptionslevel konnten im undifferenzierten Endometriumkarzinom nachgewiesen werden.

Zusammenfassend deuten die veränderten TLR-Expressionen auf eine Beteiligung von TLR3 und TLR4 an den endometrialen Erkrankungen Endometriose und Endometriumkarzinom hin. Zukünftige Studien sind nötig, um zu untersuchen, welche Rolle beide TLRs in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. Absenger Y., Hess-Stumpp H., Kreft B., Kratzschmar J., Haendler B., Schutze N., Regidor P.A., Winterhager E. (2004):
Cyr61, a deregulated gene in endometriosis.
Mol. Hum. Reprod. 10, 399-407.
2. Akashi S., Shimazu R., Ogata H., Nagai Y., Takeda K., Kimoto M., Miyake K. (2000):
Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages.
J. Immunol. 164, 3471-3475.
3. Akira S., Takeda K. (2004):
Toll like receptor signalling.
Nat. Rev. Immunol. 4, 499-511.
4. Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. (2001):
Recognition of double-stranded RNA and activation of NFκB by toll-like receptor 3.
Nature 431, 732-738.
5. Amant F., Moerman P., Newven P., Timmerman D., Van Limbergen E., Vergote I. (2005):
Endometrial cancer.
Lancet 366, 491-505.
6. Arici A. (2002):
Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis.
Ann. NY Acad. Sci. 955, 101-109.
7. Ashkar A.A., Yao X.D., Gill N., Sajic D., Patrick A.J., Rosenthal K.L. (2004):
Toll-like receptor (TLR)-3, but not TLR4, agonist protects against genital herpes infection in the absence of inflammation seen with CpG DNA.
J. Infect. Dis. 190, 1841-1849.

8. Bai X.X., Chen Y.Q., Xin X.Y., Wang W.D. (2003):
Expression and significance of heat shock protein 70, 90 in endometrial carcinomas.
Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 19, 38-40.
9. Bilak H., Tauszig-Delamasure S., Imler J.L. (2003):
Toll and toll-like receptors in drosophila.
Biochem. Soc. Trans. 31, 648–651.
10. Bokham J.V. (1983):
Two pathogenic types of endometrial carcinoma.
Gynecol. Oncol. 15, 10-17.
11. Brosens I.A., Brosens J.J. (2000):
Endometriosis.
Europ. J. Obstr. Gynecol. Reprod. Bio. 90, 159-164.
12. Cario E., Podolsky D.K. (2000):
Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease.
Infect. Immun. 68, 7010-7017.
13. Coussens L.M., Werb Z. (2002):
Inflammation and cancer.
Nature 429, 860-867.
14. Dechaud H., Witz C.A., Montoya-Rodriguez I.A., Degraffenreid L.A., Schenken R.S. (2001):
Mesothelial cell-associated hyaluronic acid promotes adhesion of endometrial cells to mesothelium.
Fertil. Steril. 76, 1012-1018.
15. Equils O., Lu D., Gatter M., Witkin S.S., Bertolotto C., Arditi M., McGregor J.A., Simmons C.F., Hobel C.J. (2006):
Chlamydia heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4.
J. Immunol. 177, 1257-1263.

16. Eriksson M., Meadows S.K., Basu S., Mselle T.F., Wira C.R., Sentman C.L. (2006):
TLRs mediate IFN γ production by human uterine NK cells in endometrium.
J. Immunol. 176, 6219-6224.
17. Eschenbach D.A. (1976):
Acute pelvic inflammatory disease: etiology, risk factors and pathogenesis.
Clin. Obstet. Gynecol. 19, 147-169.
18. Fabriek B.O., Dijkstra C.D., van den Berg T.K. (2005):
The macrophage scavenger receptor CD163.
Immunobiology 210, 153-160.
19. Fazeli A., Bruce C., Anumba D.O. (2005):
Characterization of toll-like receptors in the female reproductive tract in humans.
Hum. Reprod. 20, 1372-1378.
20. Fearon D.T., Locksley R.M. (1996):
The instructive role of innate immunity in the acquired immune response.
Science 272, 50-53.
21. Fichorova R.N., Ingalls R.R. (2002):
Response to neisseria gonorrhoeae by cervicovaginal epithelial cells occurs in the
absence of toll-like receptor 4-mediated signaling.
J. Immunol. 168, 2424-2432.
22. FIGO Committee on Gynecologic Oncology (Benedet J.L., Bender H., Gori J., Jones
H., Ngan H.Y.S., Pecorelli S.) (2000):
FIGO staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecological
cancers.
Int. J. Gynecol. Obstetr. 70, 207-312.
23. Gashaw I., Hastings J.M., Jackson K., Winterhager E., Fazleabas A.T. (2006):
Induced endometriosis in the baboon (*Papio anubis*) increases the expression of the
proangiogenic factor CYR61 (CCN1) in eutopic and ectopic endometria.
Biol. Reprod. 74, 1060-1066.

24. Giudice L.C., Kao L.C. (2004):
Endometriosis.
Lancet 364, 1789-1799.
25. Gonzalez-Ramos R., Donnez J., Defrère S., Leclercq I., Squifflet J., Lousse J.C.,
Van Langendonck A. (2007):
Nuclear factor κ B is constitutively activated in peritoneal endometriosis.
Mol. Hum. Reprod. 13, 503-509.
26. Grady D., Gebretsadik T., Kerlikowske K., Ernster V., Petitti D. (1995):
Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis.
Obstet. Gynecol. 85, 304-313.
27. Guo S.W. (2007):
Nuclear Factor- κ B (NF- κ B): An unsuspected major culprit in the pathogenesis of
endometriosis that is still at large?
Gynecol. Obstet. Invest. 63, 71-97.
28. 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.
29. Hastings J.M., Jackson K.S., Mavrogianis P.A., Fazleabas A.T. (2006):
The estrogen early response gene FOS is altered in a baboon model of
endometriosis.
Biol. Reprod. 75, 176-182.
30. Henderson B., Pockley A.G. (2005):
Molecular chaperones and cell signalling.
Cambridge: Cambridge University Press.
31. Herath S., Fischer D.P., Werling D., Williams E.J., Lilly S.T., Dobson H., Bryant
C.E., Sheldon I.M. (2006):
Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus.
Endocrinology 147, 562-570.

32. Hever A., Roth R.B., Hevezi P., Marin M.E., Acosta J.A., Acosta H., Rojas J., Herrera R., Grigoriadis D., White E., Conlon P.J., Maki R.A., Zlotnik A. (2007): Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator.
Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 12451-12456.
33. Hirata T., Osuga Y., Hirota Y., Koga K., Yoshino O., Harada M., Morimoto C., Yano T., Nishii O., Tsutsumi O., Taketani Y. (2005): Evidence for the presence of toll-like receptor 4 system in the human endometrium.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 548-556.
34. Hold G.L., Rabkin C.S., Chow W.H., Smith M.G., Gammon M.D., Risch H.A., Vaughan T.L., McColl K.E., Lissowska J., Zatonski W., Schoenberg J.B., Blot W.J., Mowat N.A., Fraumeni J.F. Jr., El-Omar E.M. (2007): A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors.
Gastroenterology 132, 905-912.
35. Hopkins P.A., Sriskandan S. (2005): Mammalian toll-like receptors: to immunity and beyond.
Clin. Exp. Immunol. 140, 395-407.
36. Iborra A., Palacio J.R., Martinez P. (2005): Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman.
Chem. Immunol. Allergy 88, 150-162.
37. Iwabe T., Harada T., Terakawa N. (2002): Role of cytokines in endometriosis-associated infertility.
Gynecol. Obstet. Invest. 53, 19-25.
38. Jiang Q., Akashi S., Miyake K., Petty H.R. (2000): Cutting edge: lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear transcription of NFκB.
J. Immunol. 165, 3541-3544.

39. Jiang D., Liang J., Li Y., Noble P.W. (2006):
The role of toll-like receptors in noninfectious lung injury.
Cell Res. 16, 693-701.
40. Jorgenson R.L., Young S.L., Lesmeister M.J., Lyddon T.D., Misfeldt M.L. (2005):
Human endometrial epithelial cells cyclically express toll-like receptor 3 (TLR3) and exhibit TLR3-dependent responses to dsRNA.
Human Immunol. 66, 469-482.
41. Kawai T., Akira S. (2006):
TLR signalling.
Cell Death Diff. 13, 816–825.
42. Kettel W.C., Stein R.J. (1951):
The viability of the cast-off menstrual endometrium.
Am. J. Obstet. Gynecol. 61, 440-442.
43. Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K., Fujishita A., Ishimaru T., Masuzaki H. (2006):
Escherichia coli in menstrual blood: An association with bacterial endotoxin and toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated growth of endometriosis.
J. Reprod. Immunol. 71, 152-153.
44. Khan K.N., Kitajima M., Imamura T., Hiraki K., Fujishita A., Sekine I., Ishimaru T., Masuzaki H. (2008):
Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated growth of endometriosis by human heat shock protein 70 (Hsp70).
Hum. Reprod. 23, 2210-2219.
45. Kidd P. (2003):
Review: Th1/Th2 Balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease.
Altern. Med. Rev. 8, 223-246.

46. Kitawaki J., Obayashi H., Ishihara H., Koshihara 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.
47. Komine-Aizawa S., Majima H., Yoshida-Noro C., Hayakawa S. (2008):
Stimuli through toll-like receptor (TLR) 3 and 9 affect human chorionic gonadotropin (hCG) production in a choriocarcinoma cell line.
J. Obstet. Gynaecol. Res. 34, 144-151.
48. Koski G.K., Lyakh L.A., Cohen P.A., Rice N.R. (2001):
CD14+ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappaB/RelB.
Crit. Rev. Immunol. 21, 179-189.
49. Kyama C.M., Debrock S., Mwenda J.M., D'Hooghe T.M. (2003):
Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis.
Reprod. Biol. Endocrinol. 1, 123.
50. Lesmeister M.J., Jorgenson R.L., Young S.L., Misfeldt M.L. (2005):
17 β -estradiol suppresses TLR3-induced cytokine and chemokine production in endometrial epithelial cells.
Reprod. Biol. Endocrinol. 3, 74.
51. Matsumoto M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K., Seya T. (2002):
Establishment of a monoclonal antibody against human toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 1364-1369.
52. Matsuzaki S., Canis M., Pouly J.L., Botchorishvili R., Déchelotte P.J., Mage G. (2006):
Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis.
Fertil. Steril. 86, 548-553.

53. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986):
Two types of murine helper T cell clone: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
J. Immunol. 136, 2348-2357.
54. Mueller T., Terada T., Rosenberg I.M., Shibolet O., Podolsky D.K. (2006):
Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells.
J. Immunol. 176, 5805-5814.
55. Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Manchinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., Mantovani A. (2000):
Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.
J. Immunol. 164, 5998-6004.
56. Nanbu K., Konishi I., Mandai M., Kuroda H., Hamid A.A., Komatsu T., Mori T. (1998):
Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas.
Cancer Detect. Prev. 22, 549-555.
57. Niessner M., Volk B.A. (1995):
Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR).
Clin. Exp. Immunol. 101, 428-435.
58. Nip M.M.C., Miller D., Taylor P.V., Gannon M.J., Hancock K.W. (1994):
Infertility: expression of heat shock protein 70 kDa in human endometrium of normal and infertile women.
Hum. Reprod. 9, 1253-1256.
59. Nisolle M., Donnez J. (1997):
Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities.
Fertil. Steril. 68, 585-596.

60. Noble P.W., Jiang D. (2006):
Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: the role of innate immunity.
Proc. Am. Thorac. Soc. 3, 401-404.
61. Noyes R.W., Hertig A.T., Rock J. (1950):
Dating the endometrial biopsy.
Fertil. Steril. 1, 3-25.
62. Paimela T., Ryhanen T., Mannermaa E., Ojala J., Kalesnykas G., Salminen A.,
Kaarniranta K. (2007):
The effect of 17 β -estradiol on IL-6 secretion and NF-kappaB DNA-binding activity in
human retinal pigment epithelial cells.
Immunol. Lett. 110, 139-144.
63. Pardue E.L., Ibrahim S., Ramamurthi A. (2008):
Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering.
Organogenesis 4, 203-214.
64. Pioli P.A., Amiel E., Schaefer T.M., Connolly J.E., Wira C.R., Guyre P.M. (2004):
Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female
reproductive tract.
Infect. Immun. 72, 5799-5806.
65. Podgaec S., Abrao M.S., Dias J.A. Jr., Rizzo L.V., de Oliveira R.M., Baracat E.C.
(2007):
Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component.
Hum. Reprod. 22, 1373-1379.
66. Ridley J.H. (1968):
The histogenesis of endometriosis: a review of facts and fancies.
Obstet. Gynecol. Surv. 23, 1-35.
67. Ridley J.H., Edwards I.K. (1958):
Experimental endometriosis in the human.
Am. J. Obstet. Gynecol. 76, 783-790.

68. Rier S.E., Yeaman G.R. (1997):
Immune aspects of endometriosis: relevance of the uterine mucosal immune system.
Semin. Reprod. Endocrinol. 15, 209-220.
69. Romagnani S. (1994):
Lymphokine production by human T cells in disease states.
Annu. Rev. Immunol. 12, 227-257.
70. Salamonsen L.A., Shuster S., Stern R. (2001):
Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle: implications for implantation and menstruation.
Cell Tissue Res. 306, 335-340.
71. Sampson J. (1927):
Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity.
Am. J. Obstet. Gynaecol. 14, 422-469.
72. Sanfilippo J.S., Wakim N.G., Schikler K.N., Yussman M.A. (1986):
Endometriosis in association with uterine anomaly.
Am. J. Obstet. Gynecol. 54, 39-43.
73. Schaefer T.M., Desouza K., Fahey J.V., Beagley K.W., Wira C.R. (2004):
Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells.
Immunology 112, 428-436.
74. Schindler A.E., Schweppe K.W (1989):
Endometriose - neue Therapiemöglichkeiten durch Buserelin.
Berlin: De Gruyter Verlag; S. 3-22.
75. Schrodt G.R., Alcorn M.O., Ibanez J. (1980):
Endometriosis of the male urinary system: a case report.
J. Urol. 124, 722-723.

76. Schromm A.B., Lien E., Henneke J.C., Chow A., Yoshimura A., Heine H., Latz E., Monks B.G., Schwartz D.A., Miyake K., Golenbock D.T. (2001):
Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin induced signalling.
J. Exp. Med. 194, 79-88.
77. Sha Q., Truong-Tran A.Q., Plitt J.R., Beck L.A., Schleimer R.P. (2004):
Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists.
Am. F. Respir. Cell Mol. Biol. 31, 358-364.
78. Shimazu R., Akashi S., Ogata Y., Nagai K., Fukudome M., Miyake K., Kimoto M. (1999):
MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4.
J. Exp. Med. 189, 1777-1782.
79. Singh M.N., Stringfellow H.F., Paraskevaidis E., Martin-Hirsch P.L., Martin F.L. (2007):
Tamoxifen: important considerations of a multi-functional compound with organ-specific properties.
Cancer Treat. Rev. 33, 91-100.
80. Stauber M., Weyerstrahl T. (2001):
Gynäkologie und Geburtshilfe.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag; S. 251-272.
81. Stenson W.F. (2008):
Toll-like receptors and intestinal epithelial repair.
Curr. Opin. Gastroenterol. 24, 103-107.
82. Steven G., Silverberg M.D. (2000):
Problems in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma.
Mod. Pathol. 13, 309-327.

83. Sun J., Duffy K.E., Ranjith-Kumar C.T., Xiong J., Lamb R.J., Santos J., Masarapu H., Cunningham M., Holzenburg A., Sarisky R.T., Mbow M.L., Kao C. (2006): Structural and functional analyses of the human Toll-like Receptor 3: Role of glycosylation.
J. Biol. Chem. 281,11144-11151.
84. Tabibzadeh S., Kong Q.F., Satyaswaroop P.G., Babaknia A. (1996): Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle.
Hum. Reprod. 11, 633-640.
85. Takeda K., Akira S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity.
Int. Immunol. 17, 1-14.
86. Takeda K., Kaisho T., Akira S. (2003): Toll-like receptors.
Annu. Rev. Immunol. 21, 335-376.
87. Taylor K.R., Trowbridge J.M., Rudisill J.A., Termeer C.C., Simon J.C., Gallo R.L. (2004): Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4.
J. Biol. Chem. 279, 17079-17084.
88. Taylor K.R., Gallo R.L. (2006): Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation.
Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 20, 9-22.
89. Taylor K.R., Yamasaki K., Radek K.A., Di Nardo A., Goodarzi H., Golenbock D., Beutler B., Gallo R.L. (2009): Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on toll-like receptor 4, CD44, and MD-2.
Reprod. Sci. 16, 140-146.

90. Tempfer C.B., Simoni M., Destenaves B., Fauser B.C. (2009):
Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II -
endometriosis.
Hum. Reprod. Update 15, 97-118.
91. Triantafilou M., Triantafilou K. (2004):
Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with toll-like receptor 4
in response to bacterial lipopolysaccharide.
Biochem. Soc. Trans. 32, 636-639.
92. Vaskivuo T.E., Stenbäck F., Tapanainen J.S. (2002):
Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and
NFκB in human endometrial hyperplasia and carcinoma.
Am. Cancer Soc. 95, 1463-1471.
93. Vegeto E., Ghisletti S., Meda C., Etti S., Belcredito S., Maggi A. (2004):
Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17β-estradiol in
macrophage cells.
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 91, 59-66.
94. von Rokitansky K. (1860):
Über Uterusdrüsen-Neubildungen in Uterus und Ovarialsarkome.
Z. Ges. Ärzte Wien 37, 577-593.
95. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O.,
Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S. (2003):
Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.
Science 301, 640-643.
96. Young S.L., Lyddon T.D., Jorgenson R.L., Misfeldt M.L. (2004):
Expression of toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines.
Am. J. Reprod. Immunol. 52, 67-73.
97. Yun A.J., Bazar K.A., Lee P.Y. (2004):
Autonomic dysfunction may be an under-recognized cause of female fertility
disorders.
Med. Hypotheses 63, 172-177.

98. Zarembek K.A., Godowski P.J. (2002):
Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines.
J. Immunol. 168, 554-561.
99. Zeleniuch-Jacquotte A., Akhmedkhanov A., Kato I., Koenig K.L., Shore R.E., Kim M.Y., Levitz M., Mittal K.R., Raju U., Banerjee S., Toniolo P. (2001):
Postmenopausal endogenous oestrogens and risk of endometrial cancer: results of a prospective study.
Br. J. Cancer. 84, 975-981.
100. Zheng S.L., Augustsson-Balter K., Chang B., Hedelin M., Li L., Adami H.O., Bensen J., Li G., Johnsson J.E., Turner A.R., Adams T.S., Meyers D.A., Isaacs W.B., Xu J., Grönberg H. (2004):
Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the cancer prostate in sweden study.
Cancer Res. 64, 2918-2922.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Aktin
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CHSP	Chlamydia heat shock protein
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRP	C-reaktives Protein
CT-Wert	cycle threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EnCa	Endometriumkarzinom
f	Femto
F	forward
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
g	Gramm
G	Grading
HP	endometriale Hyperplasie
HPLC	high performance liquid chromatography
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
l	Liter
Lig.	Ligamentum
LPS	Lipopolysaccharide
M	Menstruationsphase
μ	Micro
m	Milli
mM	Milli-Mol

M-MLV	moloney-murine leukemia virus
MD-2	myeloid differentiation protein 2
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
n	Anzahl
NFκB	Nuclear factor kappa B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Pico
P	Proliferationsphase
PAMP	pathogen associated molecular pattern (krankheitsassoziiertes Molekül)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMP	postmenopausal
Poly(I:C)	Polyinosinsäure: Polycytidylsäure
PRR	pattern recognition receptor (mustererkennender Rezeptor)
qPCR	quantitative Real-Time PCR
R	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	respiratorisches Synzytialvirus
RT	reverse Transkription
S	Sekretionsphase
SD	Standardabweichung
ssRNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
Th	T-Helferzelle
TIR	Toll/ IL1-Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.....	6
Abbildung 2: TLR-Signalkaskaden	8
Abbildung 3: TLR4-Signalkaskade	10
Abbildung 4: Verteilungshäufigkeit von Endometrioseherden im Bauchraum.....	11
Abbildung 5: Implantationstheorie der Endometriose.....	13
Abbildung 6: Atypische endometriale Hyperplasie	15
Abbildung 7: Gut differenziertes endometrioides Adenokarzinom.....	15
Abbildung 8: qPCR-Amplifikation für den ACTB-Standard.....	24
Abbildung 9: qPCR-Schmelzkurvenanalyse der Proben im TLR3-Lauf	26
Abbildung 10: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im gesamten menstruellen Zyklus....	30
Abbildung 11: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in den einzelnen Zyklusphasen.....	31
Abbildung 12: Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im gesunden zyklischen Endometrium	32
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen für TLR4 im menstruellen Gewebe	33
Abbildung 14: TLR3- und TLR4-Proteinexpression im zyklischen Gewebe	34
Abbildung 15: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in Endometriose	35
Abbildung 16: Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im eutopen endometriotischen Endometrium.....	36
Abbildung 17: Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im eutopen und korrespondierenden ektopen endometriotischen Endometrium.....	37
Abbildung 18: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im zyklischen proliferativen und im postmenopausalen Endometrium gesunder Frauen.....	38
Abbildung 19: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression im gesunden postmenopausalen Endometrium, in endometrialer Hyperplasie und im endometrioiden Endometriumkarzinom.....	39
Abbildung 20: TLR3- und TLR4-mRNA-Expression in den verschiedenen Differenzierungsstadien des endometrioiden Endometriumkarzinoms	40
Abbildung 21: Lokalisation der TLR3- und TLR4-Proteine im gesunden und erkrankten postmenopausalen Endometrium.....	42
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbungen für TLR4 im gesunden postmenopausalen Endometrium und im endometrioiden Endometriumkarzinom.....	43
Abbildung 23: TLR3- und TLR4-Proteinexpression im gesunden postmenopausalen Endometrium, in endometrialer Hyperplasie und im endometrioiden Endometriumkarzinom.....	44

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit der verschiedenen histologischen Formen des Endometriumkarzinoms	14
Tabelle 2: Grading des endometrioiden Endometriumkarzinoms nach FIGO	16
Tabelle 3: Charakterisierung der Patientengruppen	19
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Moscona-Lösung	20
Tabelle 5: Zusammensetzung des RT-Mastermixes	22
Tabelle 6: Verwendete Primer (TLR3, TLR4, ACTB).....	22
Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes.....	23
Tabelle 8: Zusammensetzung des DNA-Probenpuffers und TBE-Puffers.....	23
Tabelle 9: SYBR Green Master Mix für die quantitative Real-Time PCR	25
Tabelle 10: qPCR-Reaktionsansatz.....	25

8 Danksagung

Zuvorderst gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Elke Winterhager für die Ermöglichung der Durchführung dieser Promotion am Institut für Anatomie, für ihre gute Betreuung und Unterstützung sowie für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Winterhager für das tolle Arbeitsklima und die vielen Hilfestellungen. Hierbei sind vor allem Betina van Fürden, Verena Mönckedieck, Tina Graevendiek und Nadine Wolf zu erwähnen, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei Georgia Rauter, Eva Kusch und Ulrike Tlotka bedanke ich mich für die Hilfe und Unterstützung im Labor.

Der Abteilung für Gynäkologie des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kimmig und dem Institut für Pathologie (Hr. Prof. Schmid) danke ich für die zur Verfügung gestellten Gewebeproben sowie Andrea Koch für die Bereitstellung der von ihr isolierten Gesamt-RNA des postmenopausalen Gewebes.

Mein besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Dr. Isabella Gashaw, die mich zu jeder Zeit unterstützt hat, immer für mich ansprechbar war und mich mit ihren vielen Ideen und Anregungen sowie ihrer Herzlichkeit und Hilfsbereitschaft begeistert hat. Isabella, ich danke dir für alles, ohne dich wäre diese Disseration nicht möglich gewesen!

Des Weiteren geht ein herzlicher Dank an Elisa Böll, die mir bei der Bildbearbeitung und dem Layout eine große Hilfe war, an alle Korrektoren für Ihre Anregungen und konstruktive Kritik sowie an Leif Sehlbach, der während der ganzen Zeit immer für mich da war.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir dies alles erst ermöglicht haben, mich stets über alle Maße unterstützen und mir soviel geben! Ich danke euch von Herzen!!

9 Lebenslauf

Svenja Allhorn

geboren 24.05.1983 in Düren
Nationalität Deutsch
Familienstand Ledig

Schulbildung

Aug. 1989 - Sep. 1993 Ludgerus Grundschule Essen-Werden
Sep. 1993 - Jun. 2002 Gymnasium Essen-Werden, Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

Okt. 2002 - Mai 2009 Medizinstudium an der Universität Duisburg-Essen
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Okt. 2004
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Mai 2009
Jun. 2005 - Dez. 2005 Auslandssemester an der University of Queensland, Brisbane, Australien

Praktische Erfahrungen

Jun. 2004 - Feb. 2008 Studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen

Doktorarbeit

Jan. 2006 - Nov. 2009 Doktorarbeit am Institut für Anatomie an der Universität Duisburg-Essen in der Arbeitsgruppe Winterhager

Veröffentlichung

Sep. 2008 TLR3 and TLR4 expression in healthy and diseased human endometrium.
Allhorn S., Böing C., Koch A. A., Kimmig R., Gashaw I. (2008) Reproductive Biology and Endocrinology 6:40.