

Aus dem Institut für Biologie  
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Enno Hartmann

# **Expressions- und Funktionsanalyse des BMP-Signaling in Endometrium und endometrialen Läsionen**

**Inauguraldissertation**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der Universität zu Lübeck**

**aus der Sektion Naturwissenschaften**

vorgelegt von

Stephanie Rohn

aus Düsseldorf

Lübeck, 2011

Meinen Eltern

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Enno Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ursula-Friederike Habenicht

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.02.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII</b>
<b>Summary.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau des Endometriums .....	1
1.1.1 Menstruationszyklus .....	2
1.1.2 Dezidualisierung .....	3
1.2 Endometriose .....	9
1.2.1 Definition und Ätiologie .....	9
1.2.2 Veränderungen des eutopen Endometriums bei Endometriose ...	12
1.2.2.1 Adhäsion und Invasion .....	12
1.2.2.2 Gestörte Dezidualisierung bei Endometriose.....	13
1.2.3 Therapien .....	14
1.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) .....	14
1.3.1 Epithelial-mesenchymale Transition und Endometriose .....	16
1.4 <i>Bone morphogenetic proteins</i> (BMPs) .....	17
1.4.1 BMP-Rezeptoren .....	18
1.4.2 BMP Signaltransduktion .....	20
1.4.3 BMPs im Endometrium.....	22
1.4.4 BMPs bei der epithelial-mesenchymalen Transition .....	23
1.5 Zielsetzung .....	26
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.1 Patientenkollektiv und Probengewinnung .....	27
2.2 Zellkultur .....	28
2.2.1 Isolierung von endometrialen Stroma- und Epithelzellen.....	28
2.2.2 Kultivierung von primären endometrialen Zellen und Zelllinien ...	30
2.2.3 Subkultivierung von primären Zellen und Zelllinien .....	31

---

2.2.4 Zellzahlbestimmung.....	31
2.2.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	32
2.2.6 Endometriales dreidimensionales Zellkulturmodell.....	32
2.3 Dezidualisierungsassay .....	34
2.3.1 Dezidualisierungsassay mit Zugabe von BMPs.....	35
2.4 Assay für EMT .....	35
2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	36
2.5.1 Quantifizierung der RNA.....	37
2.6 cDNA-Synthese .....	37
2.7 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) .....	37
2.8 PCR Array für EMT.....	40
2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen.....	42
2.10 Statistik.....	44
2.10.1 Statistische Analyse der Expressionsdaten.....	44
2.10.2 Statistische Analyse der Dezidualisierungsassays .....	44
2.10.3 Statistische Analyse der Daten aus den Assays für EMT.....	45
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1 Expressionsanalyse.....	46
3.1.1 Expression der Komponenten der BMP-Signalkaskade im humanen Endometrium und in endometrialen Läsionen .....	46
3.1.2 Nachweis eines funktionalen BMP-Signalings auf Proteinebene .	50
3.1.3 Nachweis der zyklusabhängigen Expression von BMP7 auf Proteinebene .....	51
3.2 Dezidualisierung .....	53
3.2.1 Etablierung des <i>in vitro</i> Dezidualisierungsassays.....	53
3.2.2 Effekt der Dezidualisierung auf die Expression der BMP-Signaling Komponenten .....	57
3.2.3 Beeinflussung der Dezidualisierungsmarker-Expression durch die Zugabe von BMPs während der Dezidualisierung.....	59
3.2.4 Beeinflussung der BMP-Signaling Komponenten durch die Zugabe von BMPs während der Dezidualisierung.....	61
3.3 Epithelial-mesenchymale Transition .....	65
3.3.1 PCR Array für epithelial-mesenchymale Transition .....	65

---

3.3.2 Assay für EMT .....	67
3.4 Dreidimensionales Zellkulturmodell .....	76
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>81</b>
4.1 Verminderte IGFBP1-Expression durch BMP2 und BMP7 während der Dezidualisierung .....	81
4.1.1 Mögliche Signalwege zur Regulation der Expression von PRL und IGFBP1 .....	86
4.2 Dezidualisierungskapazität von endometrialen Läsionen .....	90
4.3 Ausblick Dezidualisierung .....	91
4.4 Humane endometriale Epithelzellen können einen EMT-ähnlichen Phänotypen ausbilden .....	92
4.4.1 KRT18-Expression während der EMT in Hec1B und EEC Zellen.	95
4.5 EMT bei der Entstehung und Persistenz der Endometriose .....	95
4.6 EMT in endometrialen Adenokarzinomen .....	96
4.7 Ausblick EMT .....	97
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>6 Anhang .....</b>	<b>110</b>
6.1 Publikationsliste .....	110
6.2 Danksagung .....	112

## Zusammenfassung

Endometriose ist die zweithäufigste gutartige gynäkologische Erkrankung bei der Frau. Sie tritt bei mindestens 10 % der Frauen im reproduktionsfähigen Alter auf. Charakteristisch für Endometriose ist das Vorhandensein von endometrialem Gewebe außerhalb des Uterus, den sogenannten endometrialen Läsionen. Symptome der Erkrankung sind das Auftreten von chronischen sowie zyklischen Unterbauchschmerzen und Subfertilität. Die favorisierte Theorie zur Entstehung der Endometriose ist die der retrograden Menstruation von endometrialen Zellverbänden. Veränderungen des eutopen Endometriums können dabei die Entstehung und Persistenz von Endometriose begünstigen. Eine verminderte Dezidualisierungsfähigkeit des eutopen und ektopen Endometriums sowie eine mögliche Zellplastizität der endometrialen Zellen außerhalb des Uterus können entscheidende Faktoren sein, die die Persistenz, Schwere und Lokalisation der Läsionen beeinflussen.

In Lymphknoten konnten typische endometriale Läsionen gefunden werden. Daher kann vermutet werden, dass endometriale Zellen ähnliche Mechanismen durchlaufen, wie Tumorzellen bei der Tumorprogression. Insbesondere die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ein Prozess bei dem sich Zellen aus dem Zellverband lösen, könnte das Auftreten von endometrialen Läsionen außerhalb des Bauchraumes erklären.

Es ist bekannt, dass bei der Dezidualisierung sowie bei der EMT das *bone morphogenetic protein* (BMP)-Signaling eine Rolle spielt. Mittels einer Expressionsanalyse konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass alle wichtigen Komponenten der BMP-Signalkaskade im humanen Endometrium und in endometrialen Läsionen exprimiert sind. Ein funktionales BMP-Signaling im Endometrium ist möglich.

Um zu überprüfen, ob BMPs die Dezidualisierung vermindern wurden humane endometriale Stromazellen *in vitro* unter Zugabe der BMPs dezidualisiert. Eine verminderte Dezidualisierungsfähigkeit unter BMP-Behandlung konnte morphologisch nicht festgestellt werden. Allerdings konnte erstmalig gezeigt werden, dass BMP2 und BMP7 die Expression etablierter Dezidualisierungsmarker gegensätzlich regulieren: die Expression von IGFBP1 wird vermindert, die von PRL und FOXO1 erhöht. Die verminderte Expression von IGFBP1, ein entscheidender Faktor bei der Einnistung der Eizelle in das dezidualisierte Endometrium, zeigt somit den Einfluss von BMP2 und BMP7 auf die Rezeptivität des Endometriums.

Weiterhin wurde untersucht, ob humane endometriale Epithelzellen eine EMT durchlaufen können. Dazu wurde die Expressionsveränderung von verschiedenen Markergenen für die EMT, die vorher mithilfe eines PCR Arrays identifiziert wurden, in TGF $\beta$  behandelten Epithelzellen bestimmt. TGF $\beta$  ist ein bekannter Stimulus für eine EMT. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die endometrialen Epithelzellen einen EMT-ähnlichen Phänotyp entwickeln. Eine Reversibilität dieses EMT-ähnlichen Phänotyps durch BMP7, wie es für Brust- und Nierenkrebszellen beschrieben ist, konnte nicht gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass endometriale Epithelzellen einen EMT-ähnlichen Phänotyp annehmen können, sodass Endometriose prinzipiell unabhängig von vorhandenen Zellverbänden aus veränderten Einzelzellen entstehen kann. Ferner konnte gezeigt werden, dass BMP2 und BMP7 durch Verminderung der IGFBP1-Expression einen möglichen Einfluss auf die Rezeptivität des Endometriums haben.

## Summary

Endometriosis is the second most common benign gynecological disease, affecting at least 10 % of women of reproductive age. It is characterised by the presence of endometrial tissue fragments outside the uterine cavity, known as endometrial lesions. The major symptoms of endometriosis are severe chronic and cyclic pelvic pain as well as subfertility. The generally accepted theory of endometriosis development is that of retrograde menstruation of endometrial tissue fragments. Alterations of the eutopic endometrium promote the development and persistence of endometriosis. The reduced decidualization capacity of the eutopic and ectopic endometrium, as well as a possible cell plasticity of endometrial cells outside uterine cavity, can be key factors that influence the persistence, severity and location of lesions.

Typical endometrial lesions were found in lymph nodes. It can therefore be assumed that endometrial cells run through similar mechanisms as tumor cells in tumor progression. An important mechanism in tumor progression is the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process in which cells maintain the ability to separate from the surrounding tissue. This process could explain the existence of endometrial lesions outside the abdomen.

It is known that bone morphogenetic protein (BMP)-signaling is involved not only in decidualization but also in EMT. By gene expression analysis, it could be shown for the first time that all components of the BMP-Signaling cascade are expressed in human endometrium and endometrial lesions. A functional BMP-Signaling in the human endometrium is possible.

To analyse if BMPs reduce decidualization, human endometrial stroma cells were decidualized *in vitro* with addition of BMPs. Morphologically, a reduced decidualization capacity could not be observed under BMP treatment. However, it could be shown that BMP2 and BMP7 regulate expression of decidualization markers differently: expression of IGFBP1 is reduced; expression of PRL and FOXO1 is increased. The reduced expression of IGFBP1 shows the influence of BMP2 and BMP7 on the receptivity of the endometrium, because IGFBP1 is an important factor during the implantation of a fertilized egg in the decidualized endometrium.

Additionally it was examined whether human endometrial epithelial cells can undergo EMT. EMT marker genes were analysed by a PCR array and changes in marker gene expression were analysed in TGF $\beta$  treated epithelial cells. TGF $\beta$  is a well-known stimulus for EMT. For the first time it could be shown that endometrial epithelial cells can achieve an EMT-like phenotype. Reversibility of this phenotype by BMP7, as described for breast and kidney cancer cells, could not be detected.

The results of this work show that endometrial epithelial cells can achieve an EMT-like phenotype. Thus, endometriosis can develop from altered single cells independent of existing endometrial tissue. Furthermore, it could be shown that BMP2 and BMP7 influence receptivity of the endometrium by reduction of IGFBP1 expression.

## Abkürzungsverzeichnis

BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CRE	<i>cyclic AMP responsive element</i>
CREB	<i>cyclic AMP responsive element-binding protein</i>
C <sub>t</sub>	<i>cycle threshold</i> ; Zyklusschwellenwert
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub>	Östradiol
ECM	<i>extracellular matrix</i> ; Extrazellulärmatrix
EEC	<i>endometrial epithelial cells</i> ; endometriale Epithelzellen
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	<i>estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
ESC	<i>endometrial stromal cells</i> ; endometriale Stromazellen
FCS	<i>fetal calve serum</i> , fötales Kälberserum
FGF2	<i>heparin-binding growth factor 2</i>
FOXO1	<i>forkhead box O1A</i> Protein
GDF	<i>growth differentiation factor</i>
h	<i>hour</i> , Stunde
HBSS	<i>hank's buffered salt solution</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOXA10	<i>homeobox protein Hox-A10</i>
IGF	<i>insuline like growth factor</i>
IGFBP1	<i>insuline like growth factor binding protein-1</i>
IL	Interleukin
MELF	<i>microcystic, elongated and fragmented glands</i>
min	Minute
MMP	Matrix Metalloproteinasen

---

MUC-1	Mucin-1
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PKA	Proteinkinase A
PR	Progesteronrezeptor
PRL	Prolaktin
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SPP1	<i>secreted phosphoprotein 1</i> (auch Osteopontin)
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	TBS-Tween
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
USAG1	<i>uterine sensitization-associated gene 1</i> (auch <i>sclerostin domain containing 1</i> , SOSTDC1)
β-ME	β-Mercapthoethanol

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau des Endometriums

Der Uterus des Säugers und damit auch der Frau ist aus drei Schichten aufgebaut. Außen liegt das Perimetrium. Daran schließt sich eine Schicht glatter Muskelzellen, das Myometrium, an. Ausgekleidet wird die Gebärmutterhöhle mit einer Schleimhaut, dem Endometrium.

Die Zellen im menschlichen Endometrium unterliegen starkem Wachstum und Differenzierung, bevor sie während der Menstruation abgestoßen werden oder sich durch eine Schwangerschaft weiter entwickeln. Auch Primaten haben eine Menstruation. Bei anderen Säugern kehrt das Endometrium ohne eine Abstoßung in den ursprünglichen Zustand zurück. Daher ist es schwierig, Vorgänge im Endometrium in Tierversuchen mit Nagern zu untersuchen.

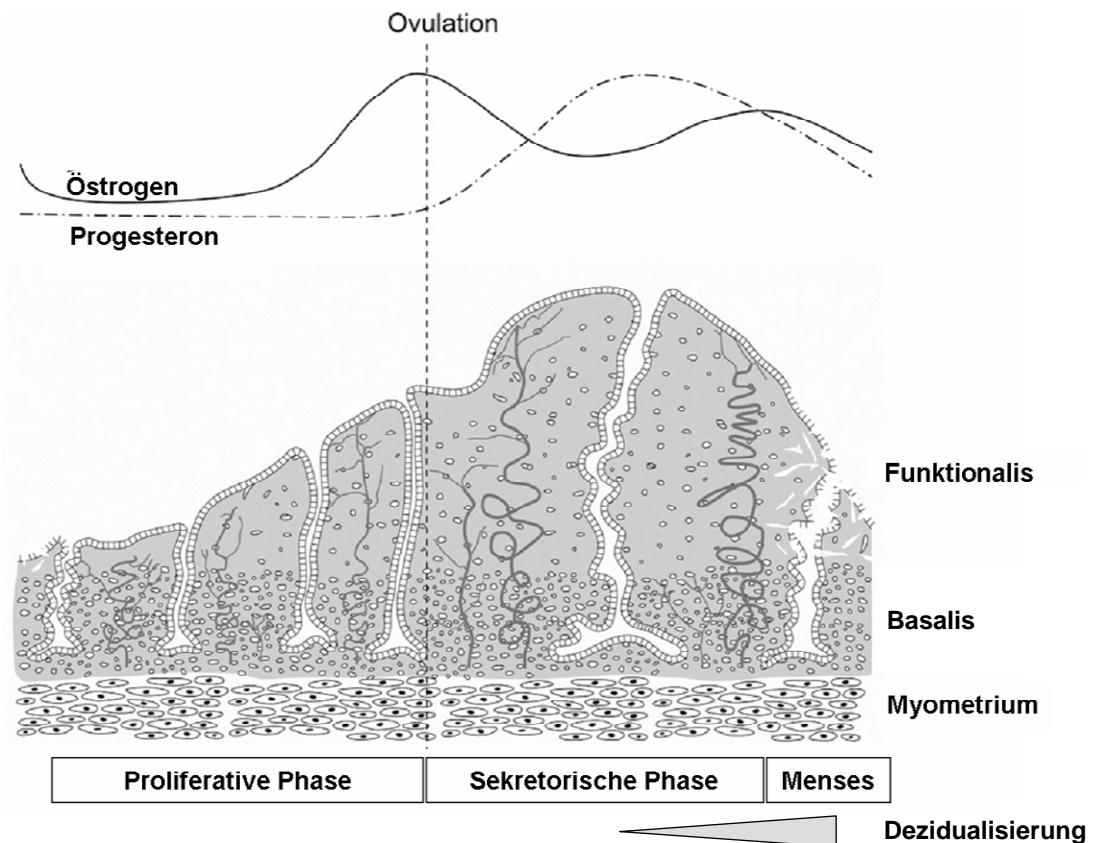
Beim humanen Endometrium handelt es sich um ein sehr komplexes Gewebe, das aus einschichtigem hochprismatischem Deckepithel, tubulösen Drüsen (*Glandulae uterinae*) und dem Stroma (*Stroma uteri*) besteht. Das Stroma ist ein zellreiches, faserarmes Bindegewebe.

Funktional wird das humane Endometrium in zwei Bereiche unterteilt, dem *Stratum functionale* (kurz: Funktionalis) und dem *Stratum basale* (kurz: Basalis).

Die Funktionalis unterliegt den zyklischen Veränderungen, die durch Östrogen und Progesteron reguliert werden. Sie wird während der Menstruation abgestoßen. Die Gefäße in der Funktionalis sind stark verwunden, daher werden sie Spiralarterien genannt. Die daruntergelegene schmale Basalis bleibt während des hormonellen Zyklus unverändert und wird während der Menstruation nicht abgestoßen. Sie enthält die Basalarterien und die Endabschnitte der glandulären Drüsen.

### 1.1.1 Menstruationszyklus

Der Menstruationszyklus und die damit einhergehenden Veränderungen des Endometriums werden durch zyklisch wechselnde Spiegel der Steroidhormone Östrogen und Progesteron gesteuert. Der Menstruationszyklus einer Frau dauert durchschnittlich 28 Tage, physiologisch normal sind aber auch Zyklen von 23-35 Tagen (Münster *et al.*, 1992). Der erste Tag der Menstruation ist auch der 1. Tag des Zyklus. Die Menstruationsphase dauert mehrere Tage. In dieser Phase wird die Funktionalis abgestoßen und es kommt zur Blutung aus den rupturierten Gefäßen des Endometriums. Darauf folgt die Proliferations- oder auch Follikelphase. In dieser Phase reifen im Ovar mehrere Follikel heran. Durch sezerniertes Östrogen aus den größer werdenden Follikeln kommt es zum Aufbau der Funktionalis aus der Basalis. Durch die Ovulation, die am 12.-14. Tag des Zyklus stattfindet, kommt es zu einem hormonellen Umschwung und die Sekretionsphase oder auch Lutealphase beginnt. Der rupturierte Follikel wird zum Corpus luteum und sezerniert Progesteron. Die Kombination von Progesteron und Östrogen führt zur Ausbildung eines rezeptiven Endometriums. Zwischen Tag 23 und 28 wandeln sich die Stromazellen zu sogenannten Dezidualzellen, dieser Prozess wird Dezidualisierung genannt (s. 1.1.2). Die Funktionalis wird daher in dieser Zeit auch als Dezidua bezeichnet. Ungefähr ab Tag 24 beginnt eine lymphozytäre Infiltration. Das Endometrium ist nun optimal auf die Einnistung einer befruchteten Eizelle vorbereitet. Kommt es zur Einnistung einer befruchteten Eizelle, entwickelt sich die Dezidua zu einem Teil der Eihöhle, die den Embryo umgibt. Findet keine Befruchtung statt, geht das Corpus luteum nach 14 Tagen zu Grunde. Dadurch sinkt der Progesteronspiegel und die Menstruationsphase beginnt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen Menstruationszyklus.** Der Menstruationszyklus wird in drei Phasen unterteilt: Menstruation (auch Menses), proliferative Phase und sekretorische Phase. Gezeigt werden Wachstum, Differenzierung und Abstoßung der Funktionalis im humanen Endometrium reguliert durch zirkulierende Steroidhormon-Level. Die Dezidualisierung beginnt in der mittleren sekretorischen Phase. Die Basalis verändert sich während des Zyklus kaum (nach Gargett *et al.*, 2008).

### 1.1.2 Dezidualisierung

Die Dezidualisierung ist essentiell für eine erfolgreiche Implantation der Eizelle und eine anschließende Schwangerschaft. Bei den meisten Säugern findet die Dezidualisierung nur nach der Implantation einer befruchteten Eizelle statt, z.B. bei Mäusen und Ratten. Daher ist es schwierig, *in vivo* Dezidualisierungsversuche bei Nagern durchzuführen. Beim Menschen hingegen findet die Dezidualisierung unabhängig von einer Befruchtung immer in der mittleren sekretorischen Phase des Zyklus (~23. Tag) statt (Gellersen *et al.*, 2007).

Die postovulatorisch steigenden Progesteron-Level initiieren eine Kaskade von zellulären und molekularen Veränderungen im Endometrium. Progesteron inhibiert die proliferative Aktivität des „östrogen-geprimten“ Endometriums und induziert die sekretorische Aktivität im glandulären Kompartiment. Dies fördert die Einwanderung uteriner Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen). Bei einer erfolgten Befruchtung kommt es anschließend zur Adhäsion des Embryos an das endometriale Oberflächenepithel und zur Invasion der Trophoblasten.

Die größte Veränderung findet in den endometrialen Stromazellen (engl. *endometrial stromal cells*, ESC) statt. Während der Dezidualisierung kommt es zur Transformation der ESC in epitheloide Dezidualzellen. Der Prozess beginnt im gefäßumgebenden Stroma und breitet sich später über das gesamte Stroma aus. Morphologisch nehmen die elongierten, Fibroblasten-ähnlichen Stromazellen eine vergrößerte und abgerundete Form an. Biochemisch ist die Differenzierung gekennzeichnet durch spezifische Sekretionsprodukte. Die bekanntesten sind endometriales Prolaktin (PRL) und *insulin like growth factor binding protein 1* (IGFBP1). Sie werden auch als Marker der Dezidualisierung bezeichnet (Tang *et al.*, 1994; Gellersen und Brosens, 2003). Weitere Proteine, die als Dezidualisierungsmarker verwendet werden, sind das *forkhead box O1A* Protein (FOXO1) und *secreted phosphoprotein 1* (SPP1, auch Osteopontin genannt).

PRL ist zum einen ein zirkulierendes Hormon, das in der Hypophyse produziert wird. Eine der wichtigsten Funktionen von hypophysärem PRL ist die Stimulation der Brustdrüse zur Milchproduktion (Laktation) (Ben-Jonathan *et al.*, 2008). Zum anderen wird PRL auch in der Dezidua und im Lympho-hämatopoetischen System produziert und agiert dort wie ein Zytokin (Gellersen *et al.*, 1994; Gerlo *et al.*, 2005). Dieses extra-hypophysäre PRL wird durch einen alternativen Promotor reguliert, der ca. 5,8 kb vor dem hypophysären Promotor liegt (Gellersen *et al.*, 1989; Telgmann und Gellersen, 1998). Je nach Promotor sind die PRL-Transkripte unterschiedlich lang und werden durch verschiedene Signalwege reguliert, codieren aber für dasselbe reife Protein. Im Rahmen dieser Arbeit ist immer das extra-hypophysäre PRL aus der Dezidua gemeint. Die PRL-Synthese in den ESC beginnt in der späten

Lutealphase und bleibt im Falle der Einnistung einer befruchteten Eizelle auch während der gesamten Schwangerschaft gesteigert. Dieses führt letztendlich zu einer verstärkten Sekretion von PRL in den Uterus und somit zu hohen PRL-Konzentrationen im Fruchtwasser.

Die Funktion von PRL im menschlichen Reproduktionstrakt ist nicht endgültig geklärt. Es hat anti-apoptotische Effekte auf die Dezidua und ist möglicherweise an osmoregulatorischen und immunmodulatorischen Prozessen in der frühen Schwangerschaft beteiligt (Jabbour und Critchley, 2001; Ben-Jonathan *et al.*, 2008).

IGFBP1 ist das Hauptprotein der IGFBP-Familie im humanen Endometrium. Die mRNA von IGFBP1 wird in der sekretorischen Phase des Endometriums und während einer Schwangerschaft von den dezidualisierten ESC exprimiert, nicht aber von ESC im proliferativen Endometrium (Seppälä *et al.*, 1994). IGFBP1 bindet *insulin like growth factor* (IGF) I und II und kann so deren Funktionen modulieren. Zum einen sind IGFBP1 und IGFI an der Regulation der endometrialen Physiologie beteiligt (Seppälä *et al.*, 1994). Die Östrogen-stimulierte Produktion von IGFI in der proliferativen Phase des Zyklus lässt vermuten, dass IGFI ein Regulator der Östrogen-induzierten Proliferation der endometrialen Zellen ist. IGFBP1 bindet IGFI in der sekretorischen Phase des Zyklus und trägt so dazu bei, dass die durch IGFI regulierte Proliferation vermindert wird (Seppälä *et al.*, 1994). Zum anderen spielt IGFBP1 eine Rolle bei der Inhibierung der Trophoblasteninvasion. Vom Trophoblasten produziertes IGFI kann durch IGFBP1 gebunden werden, wodurch die Invasion des Trophoblasten kontrolliert werden kann (Rutanen *et al.*, 1988; Fowler *et al.*, 2000).

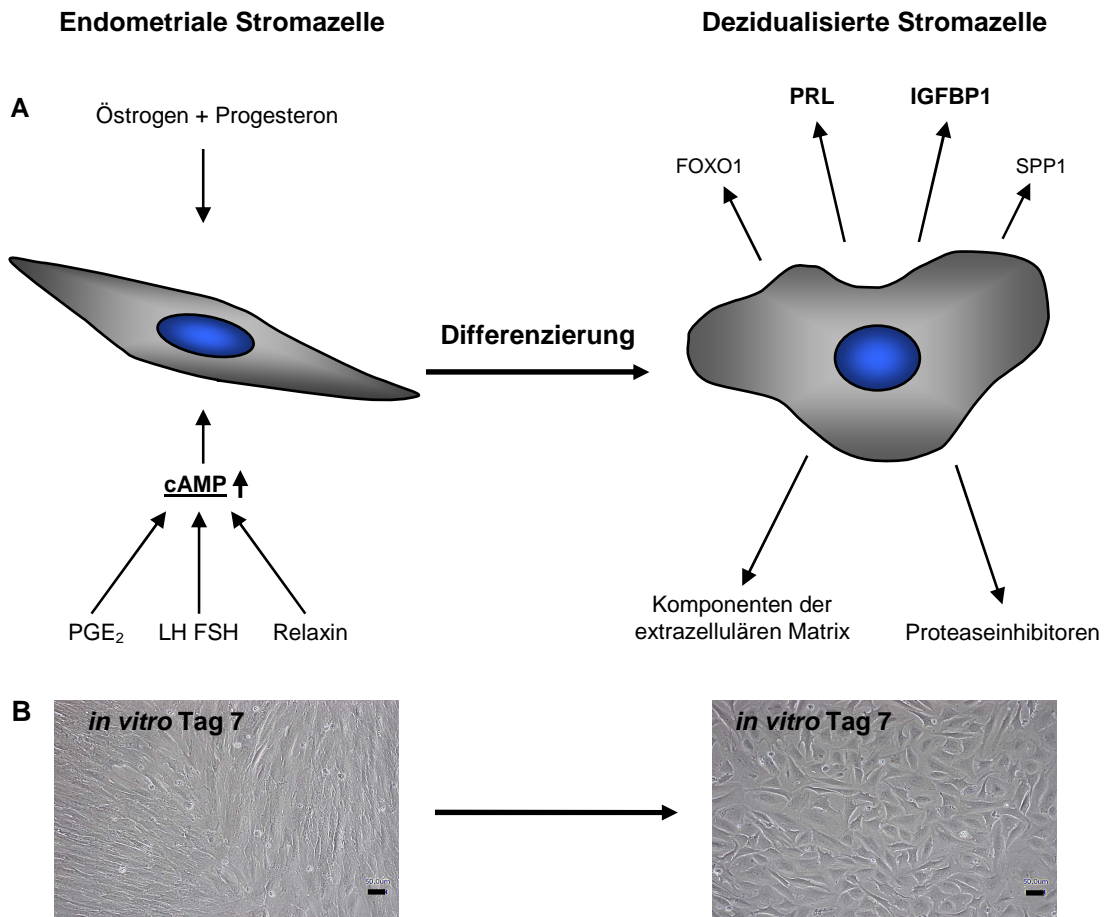
FOXO1 ist eines der ersten und stärksten induzierten Gene während der Dezidualisierung (Brar *et al.*, 2001). Es gehört zur Familie der *forkhead/winged helix* Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Mitglieder unter anderem bei Apoptose, Zellzyklusregulation und Differenzierung eine Rolle spielen. Als Transkriptionsfaktor reguliert FOXO1 den initialen Verlauf der Dezidualisierung (Grinius *et al.*, 2006), unter anderem durch die transkriptionelle Regulation von

---

PRL und IGFBP1 und weiterer Gene, die an der Dezidualisierung beteiligt sind (Johnson *et al.*, 2003; von Wolff *et al.*, 2004; Buzzio *et al.*, 2006).

SPP1 ist ein sekretiertes glykosyliertes Phosphoprotein, das zur Familie der extrazellulären Matrix Proteine/Zytokine gehört. Im Endometrium ist es in der proliferativen Phase nur schwach exprimiert. Die Expression steigt jedoch in der sekretorischen Phase an (von Wolff *et al.*, 2001). Dieser Expressionsanstieg findet hauptsächlich in den endometrialen epithelialen Drüsenzellen (engl. *endometrial epithelial cells*, EEC) statt (von Wolff *et al.*, 2001). Aber auch ESC beginnen während der Dezidualisierung SPP1 zu exprimieren (Johnson *et al.*, 2003; von Wolff *et al.*, 2004), daher kann SPP1 auch als Dezidualisierungsmarker verwendet werden (Johnson *et al.*, 2003). SPP1 ist wahrscheinlich bei der Adhäsion der befruchteten Eizelle an das Endometrium beteiligt (von Wolff *et al.*, 2001).

Außerdem zählen zu den Sekretionsprodukten der Dezidualisierung Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin und Fibronectin sowie Proteaseinhibitoren (Tang *et al.*, 1994; Telgmann und Gellersen, 1998).



**Abbildung 2: In vitro Dezidualisierung von Stromazellen (ESC).** (A) Die Behandlung der ESC mit cAMP oder mit Östrogen und Progesteron führt zur Differenzierung der Zellen. Dezidualisierte ESC sezernieren u.a. die Dezidualisierungsmarker PRL, IGFBP1, FOXO1 und SPP1 sowie Komponenten der extrazellulären Matrix und Proteaseinhibitoren (nach Telgmann und Gellersen, 1998). (B) Unbehandelte oder mit cAMP behandelte dezidualisierte ESC nach 7 Tagen in Kultur. Maßstabsbalken = 50 µm.

Das gegenwärtige Modell für die *in vivo* Dezidualisierung beim Menschen sieht wie folgt aus: Nach der Ovulation ist das Endometrium neben Progesteron vielen lokalen und endokrinen Faktoren (Prostaglandin E<sub>2</sub>, Relaxin, Corticotropin-Releasing-Hormon) ausgesetzt. Diese binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl. *G-protein coupled receptors*, GPCRs). Durch die Bindung wird die Adenylatcyclase aktiviert. Deren Aktivierung führt zur Formation des sekundären Botenstoffes cAMP. In Endometrium-Biopsien von Patientinnen in der sekretorischen Phase wurde mehr cAMP gefunden als in Biopsien aus der proliferativen Phase (Tanaka *et al.*, 1993). Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Signals hat eine anhaltende Aktivierung der

Proteinkinase A (PKA) zur Folge. Es wird vermutet, dass die Aktivierung der PKA durch cAMP die ESC für Progesteron sensitiviert (Gellersen und Brosens, 2003). Der Mechanismus ist nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich ist es, dass cAMP über die PKA die Expression verschiedener Coaktivatoren und -repressoren des Progesteronrezeptors (PR) induziert (Gellersen und Brosens, 2003; Gellersen *et al.*, 2007). Ca. 10 Tage nach der Ovulation und dem damit einhergehenden Anstieg des Progesterons ist die Dezidualisierung *in vivo* morphologisch erkennbar (de Ziegler *et al.*, 1998) und mittels Dezidualisierungsmarkern nachweisbar.

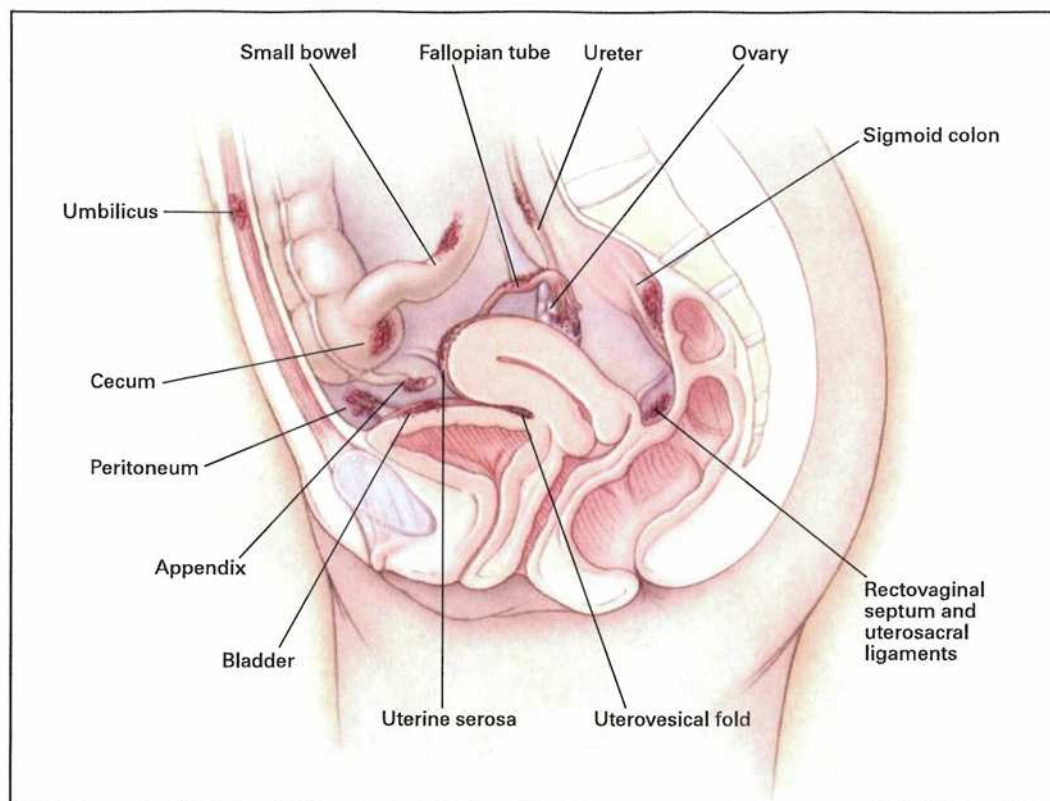
Das Modell für die Dezidualisierung wird durch *in vitro* Daten bestätigt. In den letzten 25 Jahren hat man herausgefunden, dass eine Behandlung kultivierter ESC mit Progesteron erst nach ca. 8-14 Tagen zur Expression von dezidualen Markern wie PRL und IGFBP1 führt (Bell *et al.*, 1991; Brosens *et al.*, 1999). Die Behandlung primärer ESC mit *cycline adenosine monophosphat* (cAMP) hingegen führt bereits innerhalb von 24-48 h zu einer Expression der Markergene. Die Expressionslevel nehmen allerdings nach ca. 6-8 Tagen wieder ab (Brosens *et al.*, 1999).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es wichtig ist Dezidualisierungsversuche mit humanem Material durchzuführen, da die Dezidualisierung bei den meisten Tieren (abgesehen von Primaten) nur initiiert wird, wenn eine Befruchtung stattgefunden hat. Die Dezidualisierung kann mit einem geeigneten Stimulus, z.B. cAMP, an humanen ESC auch *in vitro* durchgeführt werden. Nachgewiesen werden dezidualisierte ESC anhand ihrer Morphologie und der Expression der Dezidualisierungsmarker PRL, IGFBP1, FOXO1 und SPP1.

## 1.2 Endometriose

### 1.2.1 Definition und Ätiologie

Endometriose ist eine gutartige gynäkologische Erkrankung von der mindestens 10 % der Frauen im reproduktionsfähigen Alter betroffen sind. Charakteristisch für diese Erkrankung ist das Auftreten endometrialen Gewebes außerhalb des Uterus, das ähnliche zyklische Veränderungen durchläuft, wie das Endometrium. Man findet dieses ektopische endometriale Gewebe meist im Unterbauch der betroffenen Frauen. Besonders an den Eierstöcken und Ovarien, am Bauchfell und auf dem Darm oder der Blase (Garai *et al.*, 2006).



**Abbildung 3: Häufige Lokalisation endometrialer Läsionen** (dargestellt als dunkelrote Herde) im Bauchraum, z.B. auf dem Uterus, den Eileitern, der Blase, dem Rektum und dem Ovar (Olive und Pritts, 2001).

Klinisch werden drei Formen des ektopen endometrialen Gewebes unterschieden: (1) Peritoneale Läsionen kommen auf der Oberfläche des Peritoneums vor. Es gibt rote Läsionen, die stark vaskularisiert sind. Bei diesen Läsionen gibt es Hinweise, dass Blutungen, ähnlich wie bei der Menstruation,

auftreten können (Burney und Lathi, 2009). Weiterhin gibt es schwarze und weiße Läsionen. Die schwarzen Läsionen enthalten oft geronnenes Blut; die weißen Läsionen sind vernarbt und enthalten fibrotisches Material. (2) Es können auch ovarielle Zysten auftreten, die von endometrialem Gewebe umgeben sind. Sie werden auch als Endometriomas bezeichnet. (3) Die dritte Form ist die rektovaginale Endometriose, die zwischen Rektum und Vagina auftritt. Diese Form enthält viel fibrotisches Gewebe und Fett (Brosens, 2004; Garry, 2004). Diese klinischen Formen der Endometriose können alle drei zusammen oder auch einzeln auftreten. Das charakteristische Merkmal aller Läsionen ist das histologische Vorkommen von ESC und EEC. Ein weiteres klinisches Problem, das bei Endometriose auftritt, sind Adhäsionen zwischen den Organen im Unterbauch, die bei den Patientinnen zu Schmerzen führen können.

Ein häufiges Symptom bei Endometriose sind zyklische oder nicht-zyklische Unterbauchschmerzen in unterschiedlicher Ausprägung, die auch chronisch sein können (Sinaii *et al.*, 2008). Weitere Symptome sind unregelmäßige Blutungen (Dysmenorrhö), Dyspareunie, Dysurie und Defäkationsbeschwerden (Stratton und Berkley, 2011). Viele Frauen mit Endometriose leiden nicht nur unter Schmerzen, sondern auch unter Sub- oder Infertilität (Mahutte und Arici, 2002; Holoch und Lessey, 2010). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass 21 von 100 Endometriose-Patientinnen infertil sind (Strathy *et al.*, 1982).

Sicher diagnostiziert werden kann eine Endometriose nur durch eine Laparoskopie mit einer Probeexzision und deren histologischer Aufarbeitung. Aufgrund der unspezifischen Symptome und der mangelnden Möglichkeit zur nicht-invasiven Diagnose vergehen bis zur Diagnose oft 6-8 Jahre. Dadurch ist die Krankheit stark unterdiagnostiziert.

Die Ätiologie der Endometriose ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es existieren mehrere Theorien zur Entstehung der Endometriose. Die favorisierte Theorie ist die Implantationstheorie von Sampson (Sampson, 1927a). Durch retrograde Menstruation über die Eierstöcke gelangt Menstruationsblut und -gewebe in den Bauchraum. Das endometriale Gewebe kann dort ans Peritoneum adhären und invasieren. Es kommt zu einer Vaskularisierung des

Gewebes, wodurch die Läsionen überleben und weiter wachsen können (Sampson, 1927a).

Für die Implantationstheorie spricht, dass die Verteilung der Läsionen im Bauchraum den Stellen entspricht, die auch von endometrialem Gewebe, das durch retrograde Menstruation in den Bauchraum gelangt, erreicht werden können (Jenkins *et al.*, 1986). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass abgestoßenes menstruales Endometrium in Gewebekulturen überlebensfähig ist (Halme *et al.*, 1984; Koks *et al.*, 1997). Frauen mit Endometriose haben darüber hinaus ein größeres Volumen von retrograd-menstruiertem Blut und Gewebe im Bauchraum (Halme *et al.*, 1984) und haben eine längere und stärkere Menstruation (Darrow *et al.*, 1993). Allerdings kommt die retrograde Menstruation etwa bei 90 % aller Frauen vor, aber nur 10 % der Frauen entwickeln eine Endometriose (Halme *et al.*, 1984). Daher wird vermutet, dass bei der Entstehung einer Endometriose Veränderungen des Immunsystems und des eutopen Endometriums (s. 1.2.2) mit von Bedeutung sind.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass menstruales Gewebe oder endometriale Zellen über das Blut oder die Lymphe zu anderen Organen gelangen können (Sampson, 1927b). In einer aktuellen Studie wurden Lymphknoten von Patientinnen mit tief infiltrierender rektovaginaler Endometriose untersucht (Mechsner *et al.*, 2010). Bei 33,3 % der Frauen wurden typische endometriale Läsionen, bei 70,8 % der Frauen Östrogenrezeptor (ER)-PR-positive Einzelzellen in Lymphknoten gefunden. Somit können Zellen aus dem Endometrium oder aus endometrialen Läsionen offenbar ähnliche Mechanismen durchlaufen wie Tumorzellen bei der Tumorprogression. Die Zellen gehen z.B. eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ein, um sich aus dem Zellverband lösen zu können, wandern in andere Organe ein und bilden dort die für die Endometriose typischen Läsionen.

Auf weitere Theorien, wie z.B. die Metaplasie-Theorie (Suginami, 1991; Matsuura *et al.*, 1999), wird hier nicht eingegangen.

## 1.2.2 Veränderungen des eutopen Endometriums bei Endometriose

Das eutope Endometrium von Frauen mit Endometriose ist verändert. Diese Veränderungen tragen zum Überleben des Gewebes im Bauchraum bei. Dadurch lässt sich zum einen erklären, warum mindestens 10 % aller Frauen eine Endometriose entwickeln, obwohl die retrograde Menstruation bei ca. 90 % aller Frauen stattfindet. Zum anderen ist dadurch auch die hohe Rezidivrate nach einem operativen Entfernen der endometrialen Läsionen erklärbar.

### 1.2.2.1 Adhäsion und Invasion

Im Endometrium und im menstrualen Gewebe sind verschiedene Integrine und E-Cadherin exprimiert (van der Linden *et al.*, 1994). In ESC von Frauen mit Endometriose konnte ein verändertes Integrin-Expressionsprofil und eine verstärkte Adhäsion an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (Klemmt *et al.*, 2007). E-Cadherin ist im Endometrium von Endometriose-Patientinnen weniger stark exprimiert als im Endometrium von Gesunden. In den endometrialen Läsionen ist E-Cadherin noch schwächer exprimiert (Gaetje *et al.*, 1997; Scotti *et al.*, 2000). Weiterhin wurde eine erhöhte CD44-Expression im eutopen Endometrium von Endometriose-Patientinnen detektiert (Griffith *et al.*, 2010). CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure. Diese ist eine der Hauptkomponenten der Extrazellulärmatrix (engl. *extracellular matrix*, ECM). Eine Vorbehandlung endometrialer Fragmente mit Hyaluronsäure führt im Mausmodell dazu, dass sich keine Läsionen bilden (Hasegawa *et al.*, 2010). Aufgrund der beschriebenen Veränderungen im eutopen Endometrium wird vermutet, dass die Adhäsion der Zellen im Bauchraum erleichtert ist.

Auch zur Invasion der Gewebefragmente können Veränderungen im eutopen Endometrium beitragen. In eutopem Endometrium von Frauen mit Endometriose und auch in den Läsionen ist die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) erhöht und die Expression von *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) erniedrigt (Osteen *et al.*, 2003; Zhou und Nothnick, 2005; Di Carlo *et al.*, 2009). Die erhöhte Expression von MMPs kann

zu einem invasiven Phänotyp der endometrialen Zellen beitragen, wodurch die Etablierung von Läsionen im Peritoneum vereinfacht wäre.

#### **1.2.2.2 Gestörte Dezidualisierung bei Endometriose**

Genexpressionsprofile von Frauen mit und ohne Endometriose haben gezeigt, dass viele Progesteron-regulierte Gene während des Implantations-Fensters, in dem das Endometrium den höchsten Progesteron-Leveln ausgesetzt ist, dysreguliert sind. Im sekretorischen Endometrium von Frauen mit Endometriose sind z.B. Mucin-1 (MUC-1) und SPP1, die beide wichtig sind für die Anlagerung der befruchteten Eizelle, herunterreguliert. Daher wird vermutet, dass eutopisches Endometrium von Frauen mit Endometriose eine Progesteronresistenz aufweist (Burney *et al.*, 2007). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Stromazellen aus dem Endometrium von Frauen mit Endometriose weniger PRL und IGFBP1 während der Dezidualisierung sekretieren als Zellen von gesunden Frauen. ESC aus Läsionen sekretieren im Vergleich noch weniger PRL und IGFBP1. Morphologische Veränderungen sind aber bei allen drei Gruppen zu erkennen (Klemmt *et al.*, 2006). Endometrium von Frauen mit Endometriose zeigt zwar die typischen morphologischen Veränderungen während der Dezidualisierung, aber die biochemischen und molekularen Vorgänge scheinen unvollständig abzulaufen oder sind gestört (Bulun *et al.*, 2006; Klemmt *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass dadurch die biochemische Mikroumgebung für die Implantation einer Eizelle im Endometrium von Frauen mit Endometriose nicht richtig ausgebildet ist (Klemmt *et al.*, 2006). Dies wäre mit eine Erklärung für die hohe Infertilität von Frauen mit Endometriose. Die verminderte Differenzierungskapazität der endometrialen ESC könnte mit dem Überleben und der Proliferation in ektopischer Umgebung zusammenhängen.

### 1.2.3 Therapien

Die Endometriose ist eine primär östrogen-abhängige Krankheit mit Schmerzen als Hauptsymptom. Die Behandlungsoptionen bei Endometriose sind entweder chirurgische Verfahren oder eine medikamentöse Therapie.

Ziel der operativen Verfahren ist die komplette Entfernung aller sichtbaren Endometrioseherde, meist mittels Laparoskopie oder Laparotomie. Da es sich um Operationen unter Vollnarkose handelt, bestehen allgemeine Operationsrisiken. In ca. 20 % der Fälle kommt es zu keiner Linderung der Schmerzen (Abbott *et al.*, 2004; Stratton und Berkley, 2011).

Bei einer medikamentösen Therapie ist ein Ziel, Schmerzen mittels Schmerzmitteln zu vermindern. Ein weiteres Ziel ist eine endogene Hormonsenkung, um den Umbau des Endometriums während des Zyklus zu verhindern und eine Atrophie der Läsionen herbeizuführen. Dazu werden Hormone eingesetzt. Zugelassene Medikamente sind z.B. Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten (GnRH-Agonisten) und Visanne<sup>®</sup>. Weiterhin werden oft orale Kontrazeptiva in zulassungüberschreitender Anwendung (*Off-Label-Use*) eingesetzt. Allerdings sind auch diese Behandlungsoptionen mit Nebenwirkungen verbunden. Vor allem bei GnRH-Agonisten kann es zu typischen Wechseljahrsbeschwerden, wie z.B. Hitzewallungen, Stimmungsschwankungen, Gewichtszunahme oder Osteoporose führen. Daher können GnRH-Agonisten nur über einen begrenzten Zeitraum eingesetzt werden. Nach dem Absetzen der Medikamente tritt die Endometriose oft wieder auf.

### 1.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt eine Reihe von inter- und intrazellulären Prozessen. Während dieser Transition verlieren Epithelzellen ihre epithelialen Charakteristika und nehmen mesenchymale Eigenschaften an.

Epithelzellen bewegen sich normalerweise nur innerhalb der Zellschicht, ohne dabei die Zell-Zell-Kontakte zu den Nachbarzellen zu verlieren. Somit verlassen sie den epithelialen Zellverbund nicht. Bei der EMT wird die Polarisierung der Zelle aufgehoben und die Zelle wird umstrukturiert. Adhäsionsmoleküle, die für die Zell-Zell-Kontakte verantwortlich sind, wie z.B. E-Cadherin und Zytokeratine werden herunterreguliert. Die Expression mesenchymaler Moleküle, wie z.B. Vimentin und N-Cadherin, steigt an. Dadurch verändert sich der Phänotyp der Zelle. Sie wird migratorisch und invasiv. Mesenchymale Zellen bilden keine geordneten Zellverbände und sind nicht polarisiert. *In vitro* haben sie eine spindelförmige, Fibroblasten-artige Form. Neben Vimentin und N-Cadherin exprimieren Zellen während der EMT auch ECM-abbauende Enzyme z.B. MMPs. Mittels dieser Enzyme können die Zellen die Basalmembran überwinden, um in Blut- oder Lymphgefäße einzuwandern, wo sie passiv in entfernte Gewebe gelangen. Dort können aus den Zellen Metastasen entstehen. Es ist bekannt, dass 90 % aller Krebsarten aus epithelialen Strukturen entstehen. Die EMT spielt somit eine maßgebliche Rolle bei der Tumorprogression (als Review s. Thiery, 2002; Christofori, 2006).

Bei der Embryogenese ist die EMT ein kritischer Faktor, denn ohne EMT würden sich mehrzellige Organismen nicht über das Blastula-Stadium hinaus entwickeln können. Bei der Gastrulation durchläuft die Blastula eine große Umorganisation, um die drei Keimblätter zu bilden. Dabei wandeln sich die Epithelzellen durch EMT reversibel oder irreversibel in mesenchymale Zellen um (Thiery und Sleeman, 2006; Ohta *et al.*, 2010). Die EMT ist auch an der Ausbildung von vielen Organen beteiligt, wie z.B. bei der Myogenese, der Herzklappenformation oder der Ausbildung des Gaumens (Thiery, 2002; Micalizzi und Ford, 2009).

Die EMT spielt auch eine Rolle bei der Entstehung von Organfibrosen durch Gewebeverletzungen. Bei progressiven Nierenerkrankungen z.B. kommt es zu einer Ansammlung von Proteinen der ECM, die von fibroblastoiden Zellen gebildet werden. Mehr als ein Drittel dieser Fibroblasten entstehen mittels EMT aus den tubulären Epithelzellen der Niere (Kalluri und Neilson, 2003).

Die EMT kann durch viele extrazelluläre Faktoren über verschiedene Signalwege ausgelöst werden. Die Signalwege haben mehrere gemeinsame Endpunkte, um die Expression von EMT-assoziierten Genen zu induzieren (Thiery und Sleeman, 2006). Die EMT muss nicht immer vollständig ablaufen. Es können auch EMT-ähnliche Phänotypen auftreten. Wahrscheinlich ist die Umwandlung der Zellen stark vom zellulären Kontext und vom Zusammenspiel der extrazellulären Signale abhängig. Zu den löslichen Wachstumsfaktoren, die EMT auslösen können, gehören u.a. Proteine der *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ )-, IGF- und *fibroblast growth factor* (FGF)-Familien. TGF $\beta$ 1 und 3 z.B. können *in vivo* und *in vitro* eine EMT induzieren (Zeisberg *et al.*, 2003; Nogai *et al.*, 2008).

### 1.3.1 Epithelial-mesenchymale Transition und Endometriose

Erste Hinweise darauf, dass eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) auch bei Endometriose stattfindet, sind die Veränderungen im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose, die die Adhäsion und Invasion der Zellen im Bauchraum fördern (s. 1.2.2.1). Die verringerte E-Cadherin Expression und die erhöhte Expression von MMPs deuten auf einen EMT-ähnlichen Phänotyp der Zellen hin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass endometriale Gewebestücke von gesunden Frauen innerhalb von einer Stunde an peritoneales Mesothel adhären (Witz *et al.*, 2001). Bei einem Vergleich zwischen endometrialen Zellen von gesunden und kranken Frauen stellt sich heraus, dass sowohl EEC als auch ESC von Frauen mit Endometriose besser an peritoneale Mesothelzellen adhären, als Zellen von gesunden Frauen (Griffith *et al.*, 2010).

In endometrialen Primärzellkulturen aus Endometrium und Läsionen konnten zwei verschiedene Zellpopulationen detektiert werden. Die einen waren E-Cadherin-positiv und die anderen E-Cadherin-negativ. Beide Zelltypen waren positiv für Zytokeratin, was dafür spricht, dass es sich um EEC handelt. Aber nur die E-Cadherin-negativen Zellen waren invasiv (Gaetje *et al.*, 1997; Zeitvogel *et al.*, 2001). Die verminderte E-Cadherin-Expression und die erhöhte

Invasivität weisen darauf hin, dass ein Teil der Zellen einen EMT-ähnlichen Phänotypen angenommen hat.

Ein weiterer Hinweis auf EMT bei Endometriose ist die erhöhte Konzentration an TGF $\beta$  in der Peritonealflüssigkeit (Küpker *et al.*, 1998; Pizzo *et al.*, 2002). Wie unter 1.3 beschrieben können TGF $\beta$ s die EMT induzieren. In neuesten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$ 1 die Invasion von EEC von Frauen mit Endometriose verstärkt. Die Proliferation und die Adhärenz der EEC ändert sich durch die Behandlung mit TGF $\beta$ 1 nicht (Liu *et al.*, 2009).

#### **1.4 Bone morphogenetic proteins (BMPs)**

*Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) sind multifunktionale Wachstumsfaktoren, die zur TGF $\beta$ -Superfamilie gehören. Die Aktivität der BMPs wurde 1965 von Urist entdeckt. Urist konnte die Induktion von ektopem Knochengewebe durch die intramuskuläre Implantation von demineralisierter Knochenmatrix in Ratten, Mäusen und Kaninchen zeigen (Urist, 1965). Diese Fähigkeit war auch namensgebend für die BMPs. Inzwischen ist bekannt, dass sie auch an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind sowie an Chemotaxis und Apoptose. Sie spielen eine fundamentale Rolle bei entwicklungsbiologischen Prozessen, wie z.B. die Ausbildung der Links-Rechts Asymmetrie, der Neurogenese, der Musterbildung und bei der Entwicklung von Nieren, Darm, Lunge, Zähnen, Gliedmaßen, Amnion und Geschlechtsorganen (Hogan, 1996; Balemans und Van Hul, 2002).

Die erste Isolation von BMPs und die Aufklärung ihrer Gensequenz gelang Wozney 1988 (Wozney *et al.*, 1988).

Die TGF $\beta$ -Superfamilie ist in mehrere Unterfamilien unterteilt. Die größte Unterfamilie ist die BMP-Familie. Mehr als 30 Mitglieder wurden bisher beschrieben (Balemans und Van Hul, 2002). Dazu wird auch die strukturell ähnliche Subgruppe der *growth differentiation factors* (GDFs) gezählt. Weitere Unterfamilien sind z.B. Aktivine und Inhibine.

Ein charakteristisches Merkmal der BMP-Familie ist ein Cystinknoten-Motiv aus sechs von sieben konservierten Cysteinen (Scheufler *et al.*, 1999; Avsian-Kretchmer und Hsueh, 2004). Über zwei Disulfidbrücken wird ein acht Aminosäurereste umfassender Ring gebildet. Eine dritte konservierte Disulfidbrücke ist durch diesen Ring gefädelt und bildet den Knoten.

BMPs und alle anderen Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie werden als Vorläuferproteine translatiert. Diese setzen sich zusammen aus einem N-terminalen Signalpeptid für die Sekretion, einer Prodomäne für die Faltung und einer C-terminalen reifen Domäne.

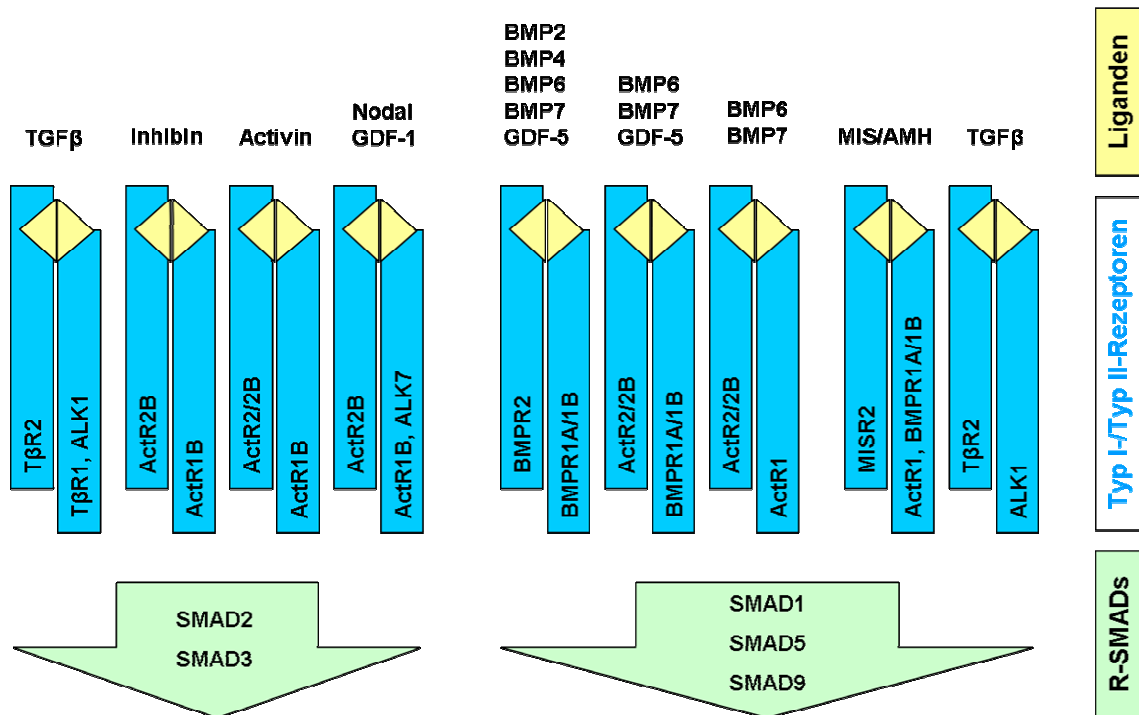
Nach der Abspaltung des Signalpeptids erfolgt die Dimerisierung der Präproteine über das siebte konservierte Cystein. Durch eine endoproteolytische Spaltung an einem Arg-X-X-Arg Motiv entsteht das reife Protein (Constam und Robertson, 1999). Auch die Bildung von Heterodimeren aus zwei verschiedenen BMPs ist möglich.

#### **1.4.1 BMP-Rezeptoren**

Die Liganden binden an eine Familie von Transmembran Serin/Threonin Rezeptorkinasen, die über SMAD-Proteine diverse zelluläre Funktionen regulieren. Im menschlichen Genom konnten 12 TGF $\beta$ -Rezeptoren nachgewiesen werden. Aufgrund von Sequenzhomologien und funktioneller Eigenschaften werden sie in zwei Unterfamilien eingeteilt: Typ I- und Typ II-Rezeptoren.

Alle Rezeptoren haben eine Liganden-bindende extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit Kinasefunktion. Die Typ I-Rezeptoren haben unmittelbar vor der Kinasedomäne eine hochkonservierte Region aus 30 Aminosäuren. Aufgrund der Aminosäure-Abfolge SGSGSG wird diese Region auch GS-Box genannt. Die Phosphorylierung dieser Region aktiviert die Kinase zur Signalübertragung. Die Kinasen der Typ II-Rezeptoren sind konstitutiv aktiv (Wrana *et al.*, 1994).

Die Liganden-Rezeptor-Verbindungen zwischen verschiedenen BMPs und ihren verwandten Rezeptoren sind nicht exklusiv (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Liganden der TGFβ-Superfamilie mit Typ I- und Typ II-Rezeptoren und die Signalspezifität der R-SMADs** (nach Shi und Massagué, 2003; mit Daten aus Shimasaki *et al.*, 2004). Zu den Typ I-Rezeptoren gehören *Activin-Like-Kinase 1* (ALK1), *Activin Rezeptor Typ I* (ActRI, alias: ALK2), ActR1B (alias: ALK4), *BMP Rezeptor Typ IA* (BMPR1A, alias: ALK3), BMPR1B (alias: ALK6), *TGFβ Rezeptor Typ I* (TβR1, alias: ALK5) und ALK7. Zu den Typ II-Rezeptoren gehören TβR2, BMPR2, ActR2, ActR2B und *Müllerian inhibiting substance receptor* (MISR2).

ActR2 und ActR2B wurden zunächst als *Activin-Rezeptoren* identifiziert, aber sie können auch *Rezeptoren für BMP6, BMP7 und GDF5* sein. BMPR2 dagegen bindet ausschließlich die BMPs BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP15, GDF5 und GDF9 (Shimasaki *et al.*, 2004).

Die Komplexität der Liganden-Rezeptor-Interaktion wird dadurch erhöht, dass einige BMPs verschiedene Typ I-Rezeptoren binden. BMP6 z.B. bindet in C2C12 Zellen und MC3T3-E1 Zellen mit hoher Affinität an ActR1 und mit geringer Affinität an BMPR1A. In ROB-C26 Zellen hingegen bindet BMP6 mit hoher Affinität an BMPR1B (Ebisawa *et al.*, 1999).

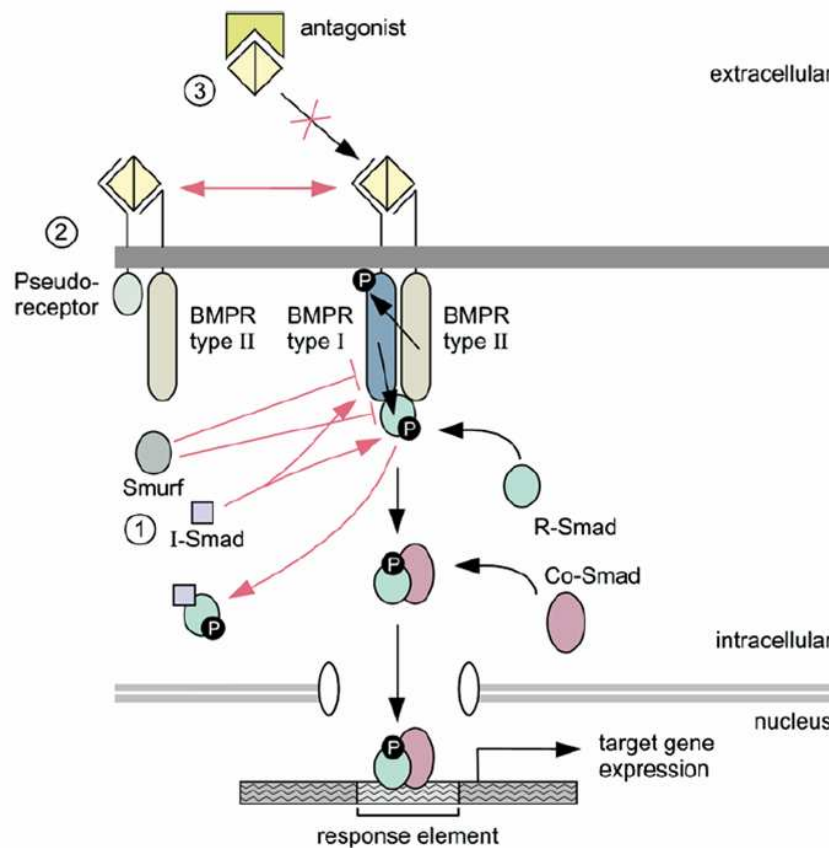
Auf Grundlage von Quervernetzungsexperimenten wurden die Liganden-Rezeptor-Interaktionen innerhalb der TGF $\beta$ -Familie in zwei Gruppen unterteilt (Shi und Massagué, 2003). Zur ersten Gruppe gehören Activine und TGFs. Sie binden hochaffin an ihre konstitutiv-aktiven Typ II-Rezeptoren (Ventura *et al.*, 1994). Die Bindung ermöglicht die Rekrutierung von Typ I-Rezeptoren. Zur zweiten Gruppe gehören z.B. die BMPs. BMP2 bindet mit hoher Affinität an einen seiner Typ I-Rezeptoren BMPR1A oder BMPR1B. Die Affinität von BMP2 zu BMPR2 ist um ein 50-100faches niedriger (Kirsch *et al.*, 2000).

#### 1.4.2 BMP Signaltransduktion

Sekretierte BMPs initiieren ein Signal durch die kooperative Bindung von einem Typ I-Rezeptordimer und einem BMPR2 Rezeptordimer. Die konstitutiv aktiven Typ II-Rezeptoren transphosphorylieren die Typ I-Rezeptoren an der GS-Domäne. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung in der GS-Box. Der aktivierte Typ I-Rezeptor gibt das Signal über die SMAD-Familie intrazellulärer Mediatoren weiter. SMADs können in 3 Klassen eingeteilt werden. (1) Die Rezeptor-regulierten SMADs (R-SMADs), (2) das *common-mediator* SMAD 4 (Co-SMAD) und die (3) inhibitorischen SMADs (I-SMADs). Die R-SMADs (SMAD1, 2, 3, 5, 9) werden direkt von der Typ I-Rezeptor-Kinase phosphoryliert und aktiviert. Die R-SMADs 2 und 3 werden als Activin- und TGF $\beta$ -aktivierte SMADs bezeichnet und die R-SMADs 1, 5 und 9 als BMP-aktivierte SMADs (Abbildung 4) (von Bubnoff und Cho, 2001). Die Phosphorylierung der R-SMADs führt zur Dissoziation vom Rezeptorkomplex und zur Bildung eines heteromeren Komplexes mit SMAD4. Anschließend kommt es zur Translokation des Komplexes in den Zellkern. Dort interagiert der Komplex mit spezifischen Transkriptionsfaktoren, um die Genexpression verschiedener Zielgene zu regulieren (von Bubnoff und Cho, 2001; Balemans und Van Hul, 2002; Chen *et al.*, 2004).

Die BMP Signaltransduktion kann an drei Punkten moduliert werden. (1) Inhibitorische SMADS (I-SMADs) und SMURFs konkurrieren um die Interaktion

mit den Rezeptoren oder mit den Co-SMADs zur Bildung des R-SMAD/Co-SMAD-Komplexes. (2) Der Pseudorezeptor BAMBI moduliert das BMP-Signaling an der Membran durch die Bindung des BMPR2. (3) Extrazelluläre BMP-Antagonisten modulieren die Bindung der BMP-Dimere an die Rezeptoren (z.B. Noggin und USAG1) (Balemans und Van Hul, 2002).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des BMP Signaltransduktion.** BMP-Dimere binden an Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren vom Typ I und Typ II. Nach der Ligandenbindung transphosphoryliert der Typ II-Rezeptor den Typ I-Rezeptor, wodurch dieser aktiviert wird und die R-SMADs phosphorylieren kann. Die phosphorylierten R-SMADs bilden einen heteromeren Komplex mit dem Co-SMAD 4. Anschließend kommt es zur Translokation des Komplexes in den Zellkern, wo die Transkription der Zielgene aktiviert wird. An drei Stellen wird der Signalweg moduliert: (1) I-SMADs und Smurfs inhibieren die SMADs. (2) Pseudorezeptoren modulieren den Signalweg indem sie Typ II-Rezeptoren binden. (3) BMP-Antagonisten binden BMP-Dimere. (nach Balemans und Van Hul, 2002)

### 1.4.3 BMPs im Endometrium

Die Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie werden im Endometrium dynamisch exprimiert. Durch ihre bekannten Funktionen bei Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Gewebeumbau wird vermutet, dass sie auch bei der Modulation zellulärer Prozesse während des Zyklus und bei der Etablierung einer Schwangerschaft wichtig sind (Jones *et al.*, 2006).

Die mRNA von mehreren BMP-Familienmitgliedern ist im Uterus von Nagern und Menschen exprimiert. Bei Mäusen sind im Uterus BMP6 (Lyons *et al.*, 1989), BMP7 (Ozkaynak *et al.*, 1997) und BMPR1B (Yi *et al.*, 2001) exprimiert. Hinweise dafür, dass das BMP-System eine funktionale Rolle im Uterus spielt, fand man über BMPR1B-defiziente Mäuse. Diese Mäuse sind infertil, haben Unregelmäßigkeiten im Zyklus und Defekte bei der Entwicklung endometrialer Drüsen (Yi *et al.*, 2001). *In situ* Hybridisierungen zeigen, dass BMP6 und BMP7 im endometrialen Epithel und in daran angrenzenden Stromazellen koexprimiert sind (Ozkaynak *et al.*, 1997). BMPR1B dagegen wird nur in Epithelzellen exprimiert (Yi *et al.*, 2001).

Erickson *et al.* untersuchte mittels *in situ* Hybridisierung, die Expression der BMP-Rezeptoren und –Liganden in Uteri von Ratten (Erickson *et al.*, 2004). Er fand heraus, dass alle drei BMP-Rezeptoren im endometrialen Epithel exprimiert sind; BMPR1A und BMPR2 zusätzlich auch im Stroma und in den Glattmuskelzellen. Alle drei Rezeptoren zeigen zyklische Variationen in ihrer Expression. BMP2 und 7 sind sehr stark im Stroma exprimiert. BMP7 ist auch im glandulären Epithel des Rattenendometriums exprimiert. Die Expression von BMP2 aber nicht die von BMP7 ist zyklisch. Noggin ist im Stroma exprimiert. BMP4 und BMP6 werden in Endothelzellen von Gefäßen exprimiert.

*In situ* Hybridisierungsstudien in Mäusen zeigen, dass BMP-Mitglieder auch während der Dezidualisierung exprimiert sind. Die BMP7 mRNA wird nach der Implantation exklusiv in dezidualisierten Stromazellen nahe dem Epithel exprimiert (Ying und Zhao, 2000). Wenn ein Embryo an das Epithel adhärert, exprimieren die anliegenden Stromazellen BMP2 (Paria *et al.*, 2001). Nach der Implantation wird BMP2 in Dezidualzellen exprimiert, die am weitesten vom

Embryo entfernt sind. Dass BMP2 bei der Dezidualisierung eine zentrale Rolle spielt, konnte mittels eines konditionalen BMP2-Knockouts in Mäusen gezeigt werden. Die BMP2-Defizienz verursachte in den Mäusen eine Infertilität, die auf das Ausbleiben einer Dezidualisierung der uterinen Stromazellen zurückgeführt werden konnte (Lee *et al.*, 2007). Weiterhin werden in der Dezidua der Maus BMP4 und SMAD1 in vaskulären Endothelzellen exprimiert (Ying und Zhao, 2000). Eine schwache BMP5 mRNA Expression konnte im Stroma nahe des Myometriums nachgewiesen werden (Paria *et al.*, 2001). Außerdem gibt es einige Hinweise, dass BMP Antagonisten mit BMPs kolokalisiert sind, z.B. Noggin (Paria *et al.*, 2001) und DAN/Dante (Paria *et al.*, 2001). Die mRNA des BMP-Antagonisten USAG1 wird nur im maximal sensitisierten Rattenendometrium exprimiert und könnte sich somit als Marker für die Rezeptivität eignen (Simmons und Kennedy, 2002).

Auch im Menschen gibt es einige Hinweise darauf, dass die BMP-Mitglieder eine Rolle bei der Dezidualisierung spielen. Die Expression von BMP2 steigt durch die Dezidualisierung *in vitro* an und die Zugabe von BMP2 während der Dezidualisierung *in vitro* steigert die Expression des Dezidualisierungsmarkers PRL (Li *et al.*, 2007; Stoikos *et al.*, 2008). Die mRNA von BMP7 konnte im humanen Endometrium nachgewiesen werden, wobei die stärkste Expression während der mittleren proliferativen Phase detektiert werden konnte. Während der späten sekretorischen Phase und der Dezidualisierung nimmt die Expression von BMP7 ab (Kodama *et al.*, 2010). In kultivierten humanen ESC konnte gezeigt werden, dass Progesteron die BMP7-Expression vermindert (Kodama *et al.*, 2010). Die Zugabe von BMP7 während der Dezidualisierung *in vitro* führte zu einer Verminderung der Expression von IGFBP1.

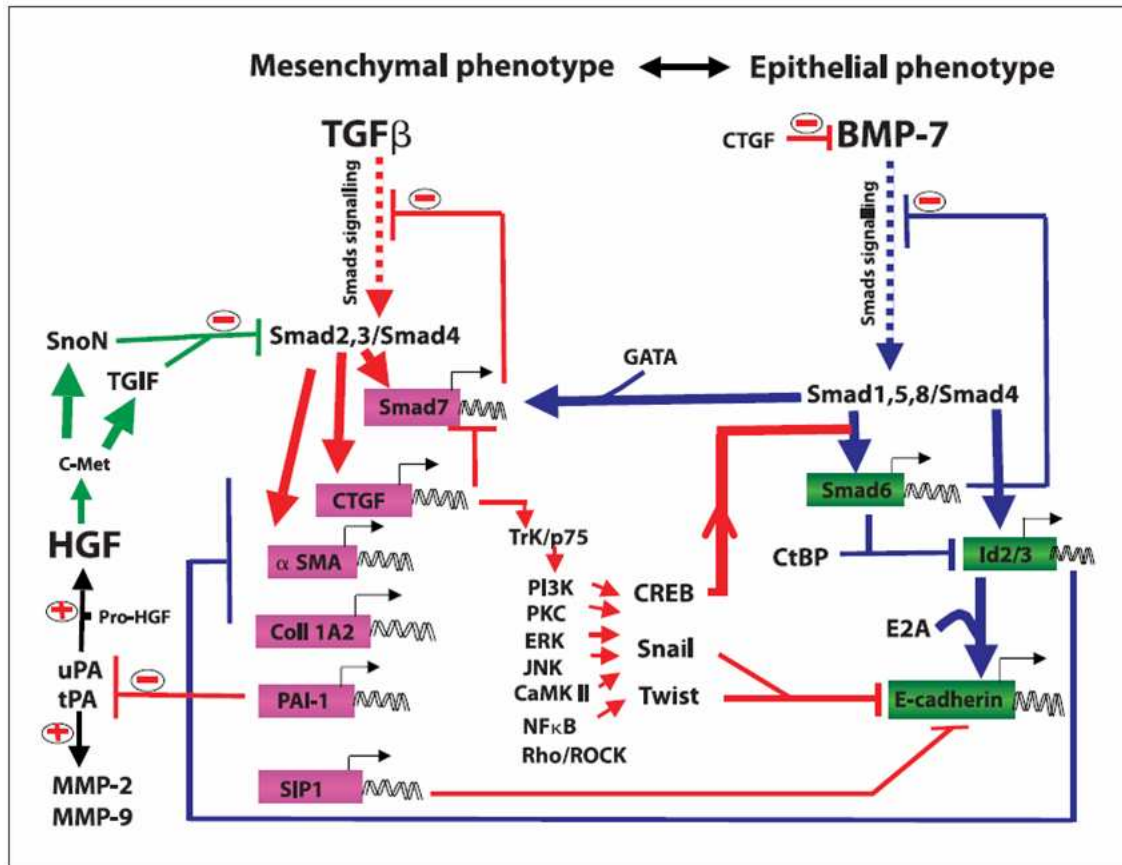
#### **1.4.4 BMPs bei der epithelial-mesenchymalen Transition**

Die BMPs können eine EMT unterschiedlich regulieren. Während der Gastrulation und der Organentwicklung können BMPs eine EMT induzieren, die dann durch BMP-Antagonisten (wie z.B. Noggin) unterbrochen oder gestoppt wird (Romano und Runyan, 2000; Ohta *et al.*, 2010). Außerdem induziert BMP4

die EMT in humanen Ovarkarzinomzellen *in vitro*. Auf Zellen aus dem Oberflächenepithel des Ovars hat BMP4 dagegen keinen Einfluss (Thériault *et al.*, 2007).

In epithelialen Brustkrebszellen konnte eine EMT durch BMP7 nicht induziert werden (Piek *et al.*, 1999), jedoch kann BMP7 die von TGF $\beta$ 1 induzierte EMT in diesen Zellen rückgängig machen (Zeisberg *et al.*, 2003). In Brustkrebszellen steigert BMP7 die Zytokeratin-Expression und vermindert die Vimentin-Expression, sodass die Zellen einen epithelialen Zelltyp haben (Buijs *et al.*, 2007b). Des Weiteren ist bekannt, dass BMP7 die EMT von Mesothelzellen stoppen kann (Loureiro *et al.*, 2010) und vor chronischer Nierenfibrose schützt (Zeisberg *et al.*, 2003; Zeisberg *et al.*, 2005). Außerdem inhibiert BMP7 die Bildung von Knochenmetastasen durch humane Brustkrebs- oder Prostatakrebszellen *in vivo* (Buijs *et al.*, 2007a; Buijs *et al.*, 2007b). Die Daten lassen vermuten, dass eine Balance zwischen dem TGF $\beta$ -Signalweg und dem BMP-Signalweg in Bezug auf die EMT besteht. Je nachdem, zu welcher Seite diese Balance durch äußere Einflüsse verschoben wird, findet eine EMT statt oder nicht (Abbildung 6).

Auch andere BMPs können einer EMT entgegenwirken. BMP6 fördert die E-Cadherin-Expression und sorgt so dafür, dass Zell-Zell-Kontakte erhalten bleiben. Eine Hauptrolle spielt dabei der Transkriptionsfaktor  $\delta$ EFI. Hohe  $\delta$ EFI-Level sind mit einem invasiven Phänotyp von Brustkrebszellen assoziiert. Durch BMP6 wird  $\delta$ EFI herunterreguliert (Yang *et al.*, 2007).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Balance zwischen TGFβ-Signalweg und BMP7-Signalweg in der Niere.** BMP7 fördert den epithelialen Phänotyp durch die Induktion der SMAD7 und der *inhibitors of differentiation* (Id2/3)-Expression. SMAD7 inhibiert das TGFβ-Signaling und Id2/3 inaktiviert den E-Cadherin Repressor E2A. Ids inhibieren weiterhin einige TGFβ-responsive Gene, z.B. den *connective tissue growth factor* (CTGF). Durch die Induktion von SnoN und TGIF fördert auch der *hepatocyte growth factor* (HGF) den epithelialen Phänotyp. SnoN und TGIF inaktivieren den SMAD2/3/4 Komplex und reprimieren die Transkription einiger TGFβ-responsiver Gene, z.B. CTGF und *α-smooth muscle actin* (α-SMA). TGFβ dagegen fördert den mesenchymalen Phänotyp durch die schnelle Induktion von CTGF. CTGF inhibiert die BMPs extrazellulär, aktiviert Rezeptor-Systeme wie Trk/p75 und induziert die Expression von E-Cadherin Repressoren. Weiterhin inhibiert CTGF die Expression von SMAD7, wodurch die Transkription von α-SMA und *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) erhöht wird. Außerdem assoziiert durch CTGF aktiviertes CREB mit dem BMP/SMAD-Komplex um die Expression von SMAD6 zu induzieren. SMAD6 inhibiert das BMP7-Signaling und die Aktivität von Id2/3. Dies führt zu einer verminderten E-Cadherin Aktivität. TGFβ-induziertes PAI-1 wiederum inhibiert die Aktivität vom *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) und vom *tissue-type plasminogen activator* (tPA), die HGF und MMPs aktivieren können (Wahab und Mason, 2006).

## 1.5 Zielsetzung

Ausgehend von der Hypothese dass das BMP-Signaling bei der Entstehung und Persistenz der Endometriose eine Rolle spielt, war es das Ziel dieser Arbeit die Aufgaben und Mechanismen des BMP-Signaling im Endometrium und bei Endometriose zu untersuchen.

Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Welche Auswirkungen haben die BMPs auf die Dezidualisierung, also die Vorbereitung der Stromazellen des Endometriums auf die Einnistung einer Eizelle? Eine verminderte Dezidualisierung in Läsionen könnte die Persistenz dieser erhöhen und eine verminderte Dezidualisierung im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose könnte die hohe Infertilität in dieser Gruppe erklären.
- Können Läsionen aus vereinzelt endometrialen Epithelzellen mittels epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) entstehen? Und ist dieser Prozess durch die Zugabe von BMP7 reversibel, wie es für Brustkrebszellen beschrieben ist?

Zum erstmaligen Nachweis aller Komponenten der BMP-Signalkaskade im Endometrium und in endometrialen Läsionen, wurde im ersten Schritt die Expression dieser Komponenten mittels quantitativer PCR bestimmt. Anschließend wurde der Einfluss der BMPs auf die Dezidualisierung untersucht. Des Weiteren wurde versucht mittels TGF $\beta$ 1 oder TGF $\beta$ 3 Zugabe eine EMT der endometrialen Epithelzellen zu induzieren. Es wurde auch getestet ob die durch TGF $\beta$ 1 oder TGF $\beta$ 3 induzierten Veränderungen in der Genexpression durch die Behandlung mit BMP7 reversibel sind.

Parallel zu den oben beschriebenen Versuchen sollte für weitere Untersuchungen ein dreidimensionales Zellkulturmodell für das Endometrium etabliert und optimiert werden. Dieses Modell sollte durch die Verwendung intakter epithelialer Drüsen und einer extrazellulären Matrix näher an der *in vivo* Situation sein, sodass z.B. die Zellen ihre Hormonrezeptoren auch über eine längere Kulturdauer behalten. Weiterhin sollte es auch möglich sein, parakrine Wechselwirkungen zwischen endometrialen Epithel- und Stromazellen zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv und Probengewinnung

Im Rahmen einer akademischen Kooperation der Bayer Pharma AG wurden Endometrium, ovarielle Endometriose-Zysten und peritoneale Läsionen für die Genexpressionsanalyse von Patientinnen im Alter von 20-53 Jahren gewonnen. Die Entnahme erfolgte im Rahmen der regulären operativen Behandlung der Patientinnen auf Grund der Diagnose Endometriose am behandelnden Klinikum. Als Ausschlusskriterien für die Probennutzung galten hormonelle Behandlungen in den letzten drei Monaten vor der Operation, Anzeichen für die Menopause, infektiöse Erkrankungen (z.B. Hepatitis C oder HIV) und Malignität. Das behandelnde Klinikum war dabei zur Information der Patientinnen nebst Einholung einer entsprechenden Einwilligungserklärung sowie zur Beteiligung der zuständigen Ethikkommission im rechtlich gebotenen Umfang verpflichtet. Während der Operation entnommene Gewebe wurden direkt in RNA $\text{later}$  (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, DE) überführt. Die RNA Extraktion und die Qualitätskontrolle erfolgten am behandelnden Klinikum. Die Proben wurden anschließend an die Bayer Pharma AG übergeben.

Die Endometrium-Proben für die primäre Zellkultur und das dreidimensionale Zellkulturmodell stammen aus einer weiteren akademischen Kooperation. Es wurden Strickküretten und Abradate von Patientinnen verwendet, die auf Grund einer diagnostizierten Endometriose, Uterus myomatosus, Adenomyose oder mit dem Verdacht auf eine dieser Erkrankungen operiert wurden. Die Patientinnen waren zwischen 27-48 Jahren alt. Es galten dieselben Ausschlusskriterien wie oben genannt. Auch hier hat das behandelnde Klinikum die Verpflichtung zur Information der Patientinnen nebst Einholung einer entsprechenden Einwilligungserklärung sowie zur Beteiligung der zuständigen Ethikkommission im rechtlich gebotenen Umfang übernommen. Die Strickküretten und Abradate wurden direkt nach der Entnahme in ca. 4 °C kalte *Hank's buffered salt solution* (HBSS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) überführt und in Bio-Bottles (Bio-Bottle; Auckland, Neuseeland) mit Kühlpads aus dem Kühlschrank (~4 °C) zur Bayer Pharma AG transportiert. Bei

der Bayer Pharma AG wurde das Gewebe bei 4 °C gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte innerhalb von 24 h nach der Operation.

Die Einteilung der Gewebeproben erfolgte mittels des vom jeweiligen Kooperationspartner angegebenen Zyklustages. Proben aus der proliferativen Phase stammen aus Zyklustag 1-14 und Proben aus der sekretorischen Phase aus Zyklustag 15-28.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Isolierung von endometrialen Stroma- und Epithelzellen

Das Endometrium wurde nach der Entnahme durch den Operateur in sterile gekühlte 50 ml Falcons (Corning, New York City, USA) mit HBSS (PAA Laboratories GmbH) überführt, zur Bayer Pharma AG transportiert und dort innerhalb von 24 h aufgearbeitet.

Vor der Zellisolierung wurden sehr blutige Gewebe durch Schwenken der Probe in ca. 20 ml HBSS gespült. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis das HBSS klar blieb. Optional wurde ein kleines Stück des Gewebes in 3,7 % Formaldehydlösung (37 % Formaldehydlösung; Merck, Darmstadt, DE) verdünnt mit *phosphate buffered saline* (PBS; Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, DE) fixiert, um es später mittels Histologie und Immunhistochemie charakterisieren zu können.

Für die Zellisolation wurde das Gewebe in einer Petrischale (Ø 6 cm; Corning) mit einem Skalpell (Paragon, Sheffield, UK) und einer Pinzette in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gewebe nicht austrocknet. Bei sehr großen Stücken wurden einige Tropfen Wachstumsmedium (s. 2.2.2, Tabelle 1) zugegeben, um ein Austrocknen zu vermeiden. Anschließend wurden die Gewebestücke mit 2 ml Medium in eine neue Petrischale überführt. Für den Verdau wurden 2 ml Collagenase Typ I (600 Units/ml; Worthington, New Jersey, USA; gelöst in PBS mit Calcium und Magnesium) zugegeben. Des Weiteren wurden 25 µl DNase I (ca. 50000 Units/ml; Roche Diagnostics, Mannheim, DE; gelöst in H<sub>2</sub>O) zugegeben.

Dieser Ansatz wurde für ca. 1 h auf einem Wippschüttler (Grant-bio, Shepreth, UK) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Bei diesem Verdau bleiben die epithelialen Drüsen erhalten und die endometrialen Stromazellen (engl. *endometrial stromal cells*, ESC) werden zu Einzelzellen verdaut. Nach der Inkubation erfolgte die Trennung der epithelialen Drüsen von den ESC über zwei Filtrationsschritte. Die durch den Verdau entstandene Lösung wurde über einen 100 µm Filter (BD Biosciences, New Jersey, USA) in ein 50 ml Falcon filtriert. Die Petrischale wurde mit 6 ml Wachstumsmedium gespült und auch diese 6 ml wurden filtriert. Der Durchfluss wurde anschließend über einen 40 µm Filter (BD Biosciences) filtriert, wobei das erste Falcon mit 10 ml Wachstumsmedium nachgespült wurde. Im Durchfluss befanden sich nun die vereinzelt ESC und Erythrozyten. Die beiden Siebe, in denen sich die Drüsenstücke befanden, wurden umgedreht um die Drüsen mit je 10 ml Wachstumsmedium pro Sieb auszuspülen und in einer Petrischale aufzufangen. Anschließend wurde die Lösung in ein 50 ml Falcon überführt. Die beiden Falcons mit den vereinzelt ESC und den epithelialen Drüsen wurden für 2 min bei 450 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Beide Pellets wurden in je 6 ml Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, Corning) ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C gelagert. Bei sehr wenig Gewebe und dementsprechend kleinen Pellets nach der Zentrifugation wurden die Zellen auf 6-Well-Platten (Corning) ausgesät. Um Verunreinigungen durch Epithelzellen, Leukozyten und Erythrozyten zu reduzieren wurde der erste Mediumwechsel, mit vorherigem Spülen mit PBS, bei der Stromazellkultur nach ca. 30 min durchgeführt. Nach dieser Zeitspanne waren die ESC bereits adhärenz zur Oberfläche, die Epithelzellen jedoch zusammen mit den restlichen Zellen noch in Lösung. Danach wurden die ESC für ca. 3-5 Tage ohne Mediumwechsel unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert bis diese konfluent waren. Sie wurden dann 1:2 bis 1:3 passagiert (s. 2.2.3).

Die epithelialen Drüsen wurden entweder direkt für das dreidimensionale Zellkulturmodell eingesetzt (s. 2.2.6) oder ausgesät und wie die ESC unter Standardbedingungen kultiviert. Allerdings dauerte es länger, bis die Epithelzellen (engl. *endometrial epithelial cells*, EEC) sich aus dem

Drüsenverband lösten und auswachsen. Die EEC wurden bei Erreichen der Konfluenz 1:2 passagiert.

### 2.2.2 Kultivierung von primären endometrialen Zellen und Zelllinien

Neben den frisch isolierten endometrialen Zellen wurden für diese Arbeit auch Hec1B Zellen (ATCC-Nummer: HTB-113) verwendet. Bei dieser adhärennten Zelllinie handelt es sich um eine Subzelllinie der Hec1A Zellen aus einem humanen Adenokarzinom des Endometriums.

Die Hec1B Zellen und die primären endometrialen Zellen (ESC und EEC, s. 2.2.1) wurden in Wachstumsmedium unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Medien für die Zellkultur**

Medium	Humane endometriale Primärzellen (ESC und EEC)	Hec1B Zellen
Wachstumsmedium	D-MEM/F-12 + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep	
Testmedium	D-MEM/F-12 + 5 % FCS + 1 % Pen/Strep	D-MEM/F-12 + 3 % FCS + 1 % Pen/Strep
Steroidhormonfreies Testmedium (dreidimensionales Zellkulturmodell)	D-MEM/F-12 + 10 % oder 5 % steroidhormonfreies FCS + 1 % Pen/Strep	
Einfriermedium	D-MEM/F-12 + 20 % FCS + 1 % Pen/Strep + 10 % DMSO	

D-MEM/F-12 mit L-Glutamin und ohne Phenolrot (Bestell-Nr. 21041), sowie Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und fötales Kälberserum (engl. *fetal calve serum*, FCS) wurden von Gibco-Invitrogen bezogen. Das steroidhormonfreie FCS wurde von der Firma ccpro (Oberdorla, DE) bezogen. Dimethylsulfoxid (DMSO) stammt von der Sigma-Aldrich GmbH.

### 2.2.3 Subkultivierung von primären Zellen und Zelllinien

Zweimal wöchentlich, wenn die Hec1B Zellen eine Konfluenz von ca. 80-90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Die primären Zellen von verschiedenen Patienten wuchsen unterschiedlich schnell. Daher wurden diese Zellen nach unterschiedlicher Kulturdauer, bei einer Konfluenz von ca. 80-90 %, passagiert.

Dazu wurden zunächst alle Medien und benötigten Lösungen im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Als erstes wurde dann das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurden 1,5 ml TrypLE Express (Gibco-Invitrogen) zugegeben und die Zellen für 3-5 min im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vollständig von der Flaschenoberfläche abgelöst hatten. Nach Zugabe von Wachstumsmedium wurden die Zellen durch Suspendieren vereinzelt und durch Zentrifugation bei 450 g für 2 min bei Raumtemperatur pelletiert. Der Medienüberstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert. Je nach geplanter Kulturdauer wurden die Hec1B Zellen in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:6 passagiert, die ESC in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 und die EEC immer in einem Verhältnis von 1:2. Die Hec1B Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>, Corning) mit 12 ml Wachstumsmedium unter Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. Die ESC und EEC je nach dem Teilungsverhältnis in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 6 bzw. 12 ml Wachstumsmedium.

### 2.2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Standardisierung und Vergleichbarkeit von *in vitro* Experimenten wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Kammer mit

Ethanol gereinigt und zusammengesetzt. In den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer wurden 10 µl Zellsuspension gegeben. Lichtmikroskopisch wurden die Zellen in den 4 Großquadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Da alle Teilfelder des Gesamtzählfeldes die gleiche Größe haben, entsteht ein genau definierter Raum aus 0,1 mm Tiefe, 0,1 µl Volumen und 1 mm<sup>2</sup> Fläche. Daraus wurde die Zellzahl/ml wie folgt berechnet:

$$\text{Mittelwert} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension} = \text{Zellzahl/ml}$$

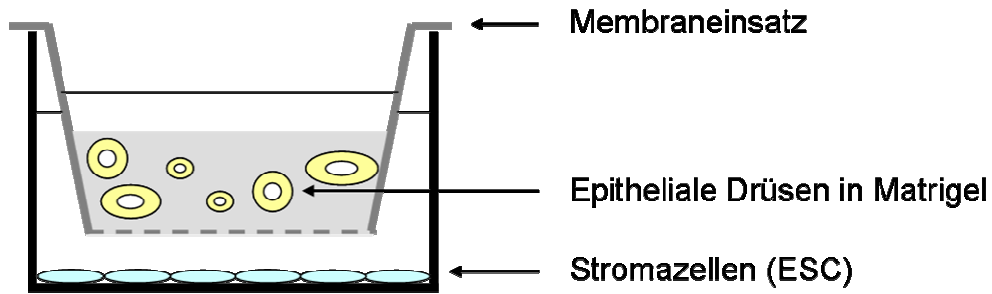
### 2.2.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Kryo-Kulturen herzustellen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80 % wie bei der Subkultivierung geerntet (s. 2.2.3). Die Zellsuspension wurde bei 450 g für 2 min bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und in 1,2 ml Kryogefäße (Corning) pipettiert. Die Kryogefäße wurden zunächst in einem Gefrierbehälter (Nalgene/Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) über Nacht auf -80 °C gekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die gefrorenen Zellen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort in vorgewärmtes Wachstumsmedium überführt. Die Zellsuspension wurde bei 450 g für 2 min zentrifugiert, um den DMSO-Gehalt zu reduzieren. Das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert, in eine Zellkultur-Flasche transferiert und unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert bis die Zellen subkultiviert werden konnten.

### 2.2.6 Endometriales dreidimensionales Zellkulturmodell

Das dreidimensionale Zellkulturmodell wurde nach dem Vorbild von Bläuer *et al.* erstellt und weiter optimiert um ein Modell für das eutopische Endometrium zu haben, das der *in vivo* Situation entspricht (Bläuer *et al.*, 2005). Ein Schema für das Modell ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Schema des endometrialen dreidimensionalen Zellkulturmodells.** Nach der Isolation der epithelialen Drüsen und der ESC aus humanem Endometrium wurden die epithelialen Drüsen in Matrigel resuspendiert und in einen Membraneinsatz ausgesät. Die ESC wurden auf eine 24-Well Platte ausgesät. Nach 30 min wurde bei den ESC ein Mediumwechsel durchgeführt und der Membraneinsatz mit dem inzwischen gelierten Matrigel auf die ESC gesetzt. Auch auf das Matrigel wurde Medium gegeben.

Nach der Isolation der vereinzelt ESC und der epithelialen Drüsen, wurden die Drüsen in phenolrot-freiem Matrigel (BD Biosciences) resuspendiert. Matrigel ist eine lösliche Basalmembran, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Tumor extrahiert wird. Es besteht hauptsächlich aus Laminin und Kollagen IV. Je 200 µl der Suspension wurden in einen Membraneinsatz (3 µm Porengröße, BD Biosciences) gegeben. Matrigel ist nur bei 4 °C flüssig, daher wurden alle benötigten Materialien bei 4 °C gelagert. Das Matrigel wurde in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert und 24 h vor der Verwendung auf 4 °C gestellt. Die Verarbeitung erfolgte auf Eis. Damit das Matrigel nach der Aussaat gelieren konnte wurden die Ansätze für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die ESC wurden in Wachstumsmedium aufgenommen und auf eine 24-Well Platte (BD Biosciences) ausgesät. Nach 30 min wurden die Zellen mit PBS (Gibco-Invitrogen) gespült und frisches Wachstumsmedium wurde zugegeben. Die Membraneinsätze wurden auf die Wells, an deren Boden die ESC wuchsen, überführt und auch auf das Matrigel wurden 200 µl Wachstumsmedium gegeben. Das Modell wurde unter Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert.

24 h vor einer Hormonbehandlung wurden die Zellen und die Inlays mit PBS gespült und es wurde steroidhormonfreies Testmedium (10 % FCS) zugegeben. Nach 24 h wurde mit der Hormonbehandlung in Testmedium mit 5 % steroidhormonfreiem FCS gestartet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und

1 ml frisches Testmedium mit 10 nmol/l 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich GmbH) oder als Lösungsmittel-Kontrolle DMSO für 24 oder 48 h zugegeben.

Um die Auswirkungen einer unterschiedlichen Kulturdauer oder der Behandlung auf die Drüsen im Matrigel zu beobachten wurden die Membraneinsätze fixiert oder das Matrigel mit den Drüsen wurde für die RNA-Isolation in RLT-Puffer aufgenommen (s. 2.5). Für die Fixierung wurden die Membraneinsätze über Nacht in 3,7 % Formaldehydlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einer Injektions-Kanüle ( $\varnothing$  0,45 mm; B.Braun, Melsungen, DE) aus dem Einsatz gelöst. Das fixierte Matrigel wurde vorsichtig in ein Einbettförmchen überführt und, wie unter 2.9 beschrieben, weiter verarbeitet. Die ESC wurden immer in RLT-Puffer aufgenommen. Aufgrund der Verwendung von Matrigel wurden die Drüsen wie auch die ESC vor der RNA-Isolation für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge über eine QIAshredder Säule (Qiagen) homogenisiert.

### 2.3 Dezidualisierungsassay

Um eine Dezidualisierung der humanen ESC *in vitro* durchzuführen wurden zunächst 50.000 Zellen pro *Well* in je 1 ml Wachstumsmedium auf 12-*Well* Platten (Corning) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und Testmedium für ESC zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde mit der Behandlung der Zellen begonnen. Der erste Tag der Behandlung wurde als Tag 0 festgelegt. Die Dezidualisierung wurde durch 0,5 mM 8-Br-cAMP (cAMP; Sigma-Aldrich GmbH; gelöst in PBS) im Testmedium induziert. Es wurden je zwei *Wells* pro Abnahmetag unter Dezidualisierung und je zwei *Wells* als Kontrolle ohne cAMP angelegt. Zu den Kontrollen wurde zusätzlich eine entsprechende Menge PBS gegeben, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch PBS auszuschließen.

Zur Etablierung des Dezidualisierungsassays erfolgte jeweils an den Tagen 3, 5, 7 und 14 die Gewinnung der RNA (s. 2.5). Bei den verbliebenen *Wells* wurde ein Mediumwechsel mit frischem Behandlungs- und Kontrollmedium durchgeführt. Zwischen Tag 7 und Tag 14 wurde zusätzlich alle 2-3 Tage ein

Wechsel des entsprechenden Mediums durchgeführt. Von den Zellen wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht um morphologische Veränderungen zu dokumentieren.

### 2.3.1 Dezidualisierungsassay mit Zugabe von BMPs

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die BMPs auf die Dezidualisierung haben, wurden humane ESC während der Dezidualisierung durch cAMP zusätzlich mit 50 ng/ml rekombinatem humanem BMP2 (R&D Systems, Minneapolis, USA), 50 ng/ml rekombinatem humanem BMP4 (R&D Systems), 200 ng/ml rekombinatem humanem BMP6 (Peprotech, Hamburg, DE) oder 100 ng/ml rekombinatem humanem BMP7 (R&D Systems) behandelt. Wie unter 2.3 beschrieben wurden ESC in Wachstumsmedium ausgesät, 24 h in Testmedium kultiviert und anschließend behandelt. Zusätzlich zur Behandlung mit cAMP und der entsprechenden Kontrolle wurden Behandlungsgruppen mit 0,5 mM cAMP + BMP2, 4, 6 oder 7 mitgeführt. Die Behandlung erfolgte über 5 Tage. Nach 2 oder 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Behandlungsmedium. An Tag 5 wurden die Zellen für die RNA-Isolation (s. 2.5) in RLT-Puffer aufgenommen.

### 2.4 Assay für EMT

Um zu untersuchen, ob die Hec1B Zellen und die primären EEC unter geeigneten Bedingungen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchführen, wurden die Zellen zunächst in ihrem entsprechenden Testmedium auf 12-Well Platten ausgesät. Dazu wurden die Hec1B mit 250.000 Zellen pro Well eingesetzt und die primären EEC mit 50.000 Zellen pro Well.

Nach ca. 8 h wurden die Zellen mit PBS gespült und die Behandlung wurde mit frischem Medium gestartet. Um eine EMT zu induzieren, wurden die Zellen für 48 und 96 h mit 10 ng/ml rekombinatem humanem TGF $\beta$ 1 oder TGF $\beta$ 3 (beide von Peprotech) behandelt. Nach 48 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Eine Lösungsmittel-Kontrolle für die TGFs wurde mitgeführt.

Um eine mögliche Reversibilität der EMT durch BMP7 zu untersuchen, wurde die EMT zunächst für 48 h wie oben beschrieben induziert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 100 ng/ml BMP7 für weitere 48 h behandelt. Auch für BMP7 wurde eine Lösungsmittel-Kontrolle mitgeführt. Weiterhin wurde untersucht, ob die alleinige Behandlung mit BMP7 oder mit der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle einen Effekt auf die Zellen hat. Alle Behandlungen wurden in Doppelwerten durchgeführt.

Nach der Behandlung wurden die Zellen für die RNA-Isolation in RLT-Puffer aufgenommen (s. 2.5) und anschließend wurde eine qPCR durchgeführt. In der qPCR wurde die Expressionsänderung von FN1, ITGAV, ITGB1, KRT18, KRT7, MMP2, PLEK2, SERPINE1, TMEM132A, VIM gemessen (s. 2.7).

## 2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Die Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem *RNeasy Mini* oder dem *RNeasy Micro Kit* im QiaCube (Qiagen, Hilden, DE) durchgeführt.

Die Homogenisierung der Zellen erfolgte nach dem Spülen mit PBS durch auf- und abpipettieren von 350 µl RLT-Puffer versetzt mit 1 % β-Mercaptoethanol (β-ME; Sigma-Aldrich GmbH) pro *Well*. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Eppi (Eppendorf AG, Hamburg, DE) überführt und bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Die RNA-Isolation wurde im QiaCube nach dem Protokoll „*Animal tissues and cells with DNase digest (Version 2)*“ für das *RNeasy Mini* oder *Micro Kit* durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet einen DNase-Verdau. Das Elutionsvolumen wurde bei Verwendung des *RNeasy Mini* Kits für Hec1B Zellen auf 40 µl H<sub>2</sub>O eingestellt. Bei der Verwendung des *RNeasy Micro* Kits wurde das Elutionsvolumen für primäre Zellen auf 15 µl H<sub>2</sub>O und für Hec1B Zellen auf 30 µl eingestellt.

Für die Durchführung wurden die eingefrorenen Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Der QiaCube wurde anschließend nach Herstellerangaben mit allen

nötigen Puffern und Verbrauchsmaterialien bestückt und die RNA-Isolation durchgeführt.

### 2.5.1 Quantifizierung der RNA

Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) photometrisch bestimmt. Das Verhältnis der optischen Dichte von 260 nm (RNA) zu 280 nm (Protein) sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

### 2.6 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde der *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* von Invitrogen verwendet. Es wurden je 500 ng RNA eingesetzt. Die RNA-Ausbeute aus dem dreidimensionalen Zellkulturmodell lag oft unter 500 ng. Hier wurden die maximalen 8 µl eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden, wie vom Hersteller im Protokoll beschrieben, durchgeführt.

### 2.7 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Die Expressionslevel ausgewählter Gene wurden mit TaqMan®-Sonden von Applied Biosystems (Californien, USA) analysiert. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung aller in dieser Arbeit verwendeten TaqMan®-Sonden.

**Tabelle 2. Verwendete TaqMan®-Sonden.** (Sequenzen nicht öffentlich)

Gen	Gen Symbol	Assay ID	Referenz-Sequenz
Bone morphogenetic protein 6	BMP6	Hs01099594_m1	NM_001718.4
Bone morphogenetic protein 2	BMP2	Hs00154192_m1	NM_001200.2
Bone morphogenetic protein 4	BMP4	Hs00370078_m1	NM_130850.2 NM_130851.2 NM_001202.3

<b>Gen</b>	<b>Gen Symbol</b>	<b>Assay ID</b>	<b>Referenz-Sequenz</b>
Bone morphogenetic protein 7	BMP7	Hs00233476_m1	NM_001719.2
Bone morphogenetic protein receptor 2	BMPR2	Hs00176148_m1	NM_001204.6
Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	BMPR1A	Hs01034909_g1	NM_004329.2
Bone morphogenetic protein receptor, type 1B	BMPR1B	Hs00176144_m1	NM_001203.2
Cathepsin D	CTSD	Hs00157201_m1	NM_001909.3
Cyclophilin A	PPIA	Hs99999904_m1	NM_021130.3
Fibronectin 1	FN1	Hs01549976_m1	NM_212474.1 NM_212476.1 NM_212478.1 NM_212482.1 NM_002026.2 NM_054034.2
Forkhead box O1	FOXO1	Hs01054576_m1	NM_002015.3
Growth regulation by estrogen in breast cancer 1	GREB1	Hs00536409_m1	NM_033090.2 NM_148903.2 NM_014668.3
Insulin-like growth factor protein 1	IGFBP1	Hs00236877_m1	NM_000596.2
Integrin, alpha V	ITGAV	Hs00233808_m1	NM_001144999.1 NM_001145000.1 NM_002210.3
Integrin, beta 1	ITGB1	Hs00559595_m1	NM_033668.2 NM_133376.2 NM_002211.3
Keratin 18	KRT18	Hs01920599_gH	NM_199187.1 NM_000224.2
Keratin 7	KRT7	Hs00559840_m1	NM_005556.3
Matrix metalloproteinase 2	MMP2	Hs00234422_m1	NM_001127891.1 NM_004530.4
Matrix metalloproteinase 9	MMP9	Hs00234579_m1	NM_004994.2
Noggin	NOG	Hs00271352_s1	NM_005450.4
Pleckstrin 2	PLEK2	Hs01026902_m1	NM_016445.1
Progesterone receptor	PGR	Hs00172183_m1	NM_000926.4
Prolactin	PRL	Hs00168730_m1	NM_001163558.1 NM_000948.4
Sclerostin domain containing 1 (auch uterine sensitization-associated gene 1)	SOSTDC1 (auch USAG1)	Hs00383602_m1	NM_015464.2

Gen	Gen Symbol	Assay ID	Referenz-Sequenz
Secreted phosphoprotein 1 (auch Osteopontin)	SPP1 (auch OPN)	Hs00959010_m1	NM_001040058.1 NM_001040060.1 NM_000582.2
serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1 (auch PAI1)	Hs01126604_m1	NM_001165413.1 NM_000602.3
SMAD family member 4	SMAD4	Hs00929647_m1	NM_005359.5
SMAD family member 1	SMAD1	Hs00195432_m1	NM_001003688.1 NM_005900.2
SMAD family member 5	SMAD5	Hs00195437_m1	NM_001001419.1 NM_001001420.1 NM_005903.5
SMAD family member 9	SMAD9	Hs00195441_m1	NM_001127217.2 NM_005905.5
Transmembrane protein 132A	TMEM132A	Hs00250439_m1	NM_017870.3 NM_178031.2
Vimentin	VIM	Hs00185584_m1	NM_003380.3

Die Lösungen für die PCR wurden unter Verwendung des *Platinum qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Karlsruhe, DE) angesetzt. In Tabelle 3 ist das Standardprotokoll einer solchen PCR zusammengefasst. Dazu wurden zunächst der SuperMix mit den TaqMan-Sonden versetzt und auf V-förmige 96-Well Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen, DE) pipettiert (pro Spalte eine TaqMan-Sonde) und die cDNA versetzt mit Wasser auf eine weitere 96-Well Platte pipettiert (pro Well eine cDNA). Mithilfe des Biomek3000 Pipettierroboters von Beckman Coulter (Californien, USA) wurden cDNA und Mastermix auf einer 384-Well Platte von Applied Biosystems vereinigt. Alle PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten angesetzt. Bei jedem Versuch wurde eine NTC (*non-template control*) mit einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O anstatt cDNA mitgeführt.

**Tabelle 3: Standard Pipettierprotokoll für eine qPCR Reaktion in einem 384er Well**

Menge	Reagenz	
0,5 µl	TaqMan-Sonde (20x)	} 96-Well Platte mit TaqMan-Sonden
5 µl	MasterMix (2x)	
0,25 µl	cDNA	} 96-Well Platte mit cDNA
4,25 µl	H <sub>2</sub> O	
<b>Summe:</b>	<b>10 µl</b>	

Die qPCR wurde anschließend mit dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) nach dem in Tabelle 4 gezeigten Schema durchgeführt.

**Tabelle 4: Standardprotokoll für einen qPCR-Lauf**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
<i>Carry-over-Verdau</i>	50 °C	2 min	1x
Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	10 min	1x
Denaturierung der cDNA	95 °C	15 s	} 40x
Annealing und Elongation	60 °C	1 min	

Die Expressionsdaten wurden mittels der *Sequence Detector Version 2.4 Software* (Applied Biosystems) analysiert. Anschließend wurden die Zyklusschwellenwerte (*cycle threshold*, C<sub>t</sub>-Werte) der Gene zum *Housekeeping-Gen* Cyclophilin A normalisiert und potenziert.

## 2.8 PCR Array für EMT

Für den PCR Array wurden an zwei verschiedenen Tagen Hec1B Zellen in Testmedium auf 6-Well Platten ausgesät (625.000 Zellen pro Well).

Nach je ca. 8 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gespült und das Behandlungsmedium mit 10 ng/ml TGFβ3 oder die Lösungsmittel-Kontrolle wurden zugegeben. Nach je 48 h Behandlung wurden

die Zellen, wie unter 2.5 beschrieben, mit PBS gespült, in RLT-Puffer aufgenommen und eingefroren.

Die RNA-Isolation wurde, wie unter 2.5 beschrieben, mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration am NanoDrop bestimmt (s. 2.5.1). Die RNA-Konzentration wurde mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf 250-350 µg/ml eingestellt.

Am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen, DE) wurde auf RNA Nano Chips (Agilent Technologies) die RNA-Qualität, anhand von Elektropherogrammen und Gel-ähnlichen Bildern, bestimmt. Die RNA war fast vollständig intakt.

Bei der cDNA-Synthese wurden 500 ng RNA eingesetzt. Die cDNA wurde mit dem *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* von SABiosciences (Hilden, DE) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde Nuklease-freies nicht DEPC-behandeltes Wasser (Ambion, Austin, USA) verwendet.

Für die PCR wurden die Platten „*RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)*“ (SABiosciences) verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurde die cDNA der Proben zum *RT<sup>2</sup> SYBR Green/ROX PCR Master mix* (SABiosciences) gegeben. Diese Proben-Lösungen wurden mittels mitgelieferter Schablonen auf die 384er PCR Platten pipettiert (10 µl pro *Well*). Anschließend wurden die Platten für 1 min bei 1000 g zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Die PCR wurde nach dem in Tabelle 5 dargestellten Schema durchgeführt. Nach der PCR wurde eine Dissoziationskurven-Analyse durchgeführt.

**Tabelle 5: Protokoll für den PCR Array für EMT**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Aktivierung der HotStart DNA Polymerase	95 °C	10 min	1x
Denaturierung der cDNA	95 °C	15 s	} 40x
Detektion und Aufnahme der SYBR Green Fluoreszenz während des Annealings	60 °C	1 min	

Zur Berechnung des Faktors der Genexpressionsänderungen wurden die Mittelwerte der Behandlungsgruppen aus den zwei unabhängigen Versuchen berechnet und die Expressionsniveaus im Bezug auf die Lösungsmittel-Kontrolle normiert.

## 2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Formaldehyd fixierte Gewebe wurden in Paraffin (Merck) eingebettet. An einem Rotationsmikrotom (Leica GmbH, Wetzlar, DE) wurden 3-5 µm dicke Schnitte aus den Geweben angefertigt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Ultra Plus Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, DE) aufgezogen. Für eine Gesamtbetrachtung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dafür wurden die Schnitte auf den Objektträgern 2x 10 min in Xylol (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>, Merck) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für je 2 min in 100 %, 96 %, 80 %, 70 % und 60 % Ethanol (Merck; verdünnt in destilliertem H<sub>2</sub>O) hydriert. Danach wurden die Schnitte in destilliertem H<sub>2</sub>O gespült und für 30 s in Hämatoxylin (DAKO) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min mit Leitungswasser gebläut und für 2 min mit Eosin-Lösung (Chroma, Münster, DE) gefärbt. Die Schnitte wurden dann wieder dehydriert, indem sie für je 15 s in einer aufsteigende Alkoholreihe getaucht wurden (60 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %) gefolgt von 2x 10 min Inkubation in Xylol. Am Ende wurden die Schnitte mit Eindeckmittel (*Shandon Xylene Substitute Mountant*, Thermo Scientific) und Deckgläschen eingedeckt.

Immunhistochemische Untersuchungen wurden mit dem DAKO EnVision Protokoll für *rabbit* oder für *mouse* Antikörper (DAKO, Carpinteria, USA) durchgeführt. Als erstes wurden die Schnitte wie oben beschrieben hydriert und 5 min in PBS gespült. Anschließend wurde eine hitzeinduzierte Epitop Demaskierung in der Mikrowelle durchgeführt. Dies erfolgte in Target Retrieval Lösung (pH 6, DAKO) für ca. 2 min bei 850 W, bis die Lösung zu kochen anfangt und anschließend 2x 7 min bei 90 W. Zum Abkühlen wurden die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur in der Target Retrieval Lösung stehen gelassen. Die Schnitte wurden mit dem DAKO-Pen umrandet und 5 min in PBS gespült.

Dann wurden die Schnitte für 5 min in TBS gespült. Dafür wurde ein Päckchen TBS (DAKO) in 1 L VE-Wasser gelöst (Konzentration: 0,05 mol/l Tris-HCL). Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in einer Peroxidase-Lösung (0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DAKO) und zum Spülen für 5 min in TBS inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit Protein Block (serum-frei, DAKO) für 30 min. Die Bindung des ersten Antikörpers erfolgte nach Abklopfen des Proteinblocks für 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Folgende Antikörper wurden verwendet: Polyklonaler *rabbit* anti-human BMP7 Antikörper (eingesetzte Endkonzentration 10 µg/ml; Abcam, Cambridge, UK), polyklonaler *rabbit* anti-human Phospho-Smad1 (Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465)/Smad8 (Ser426/428) Antikörper (pSMAD-1/5/8, eingesetzte Endkonzentration 0,5 µg/ml; Cell Signaling, Massachusetts, USA), monoklonaler *mouse* anti-human Progesteronrezeptor Antikörper (eingesetzte Endkonzentration 5 µg/ml; Immunotech, Marseille, F), monoklonaler *mouse* anti-human Östrogenrezeptor Antikörper (eingesetzte Endkonzentration 15 µg/ml; Immunotech). Die Antikörper wurden auf die angegebene Endkonzentration mit Antikörper-Diluent (DAKO) verdünnt. Negative Kontrollen wurden nur mit Antikörper-Diluent inkubiert. Als IgG-Kontrolle wurde bei dem pSMAD-1/5/8 Antikörper normales *rabbit* IgG (Cell Signaling) in der entsprechenden Konzentration mitgeführt. Nach der Primärantikörper-Inkubation wurden die Schnitte 3x 2 min mit TBS versetzt mit 0,05 % Tween (TBST; Tween von DAKO) gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper, aus dem entsprechenden EnVision Kit, inkubiert. Es folgte erneutes Spülen in TBST (3x 2 min). Die Visualisierung der Antikörper erfolgte mit zwei verschiedenen Peroxidase-Substraten: DAB (braun; DAKO) und NovaRed (rot; Vector, Peterborough, UK). Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Die Ergebnisse wurden am Keyence-Mikroskop (BZ-8000K, Keyence, Neu-Isenburg, DE) mit der Software BZ-Image Viewer & Analyzer (Version 2.50) analysiert und dokumentiert.

## 2.10 Statistik

Generell wurden die gewonnenen Daten zunächst mithilfe von Lage- und Streuungsmaßen dargestellt, sowie durch Grafiken präsentiert. Im Anschluss daran wurden statistische Hypothesentests und Konfidenzintervalle berechnet, wobei p-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant angenommen wurden. Dies erfolgte bei der Analyse der Expressionsdaten und der EMT-Assays mit der Unterstützung der Abteilung „Global Drug Discovery Statistics“ der Bayer Pharma AG unter Verwendung des Statistik-Programm-Paketes SAS<sup>®</sup>, Version 9.2 (Heidelberg, Deutschland).

### 2.10.1 Statistische Analyse der Expressionsdaten

Bei den mittels qPCR bestimmten Genexpressionsdaten wurden die zum *Housekeeping*-Gen normalisierten und potenzierten Daten für den Vergleich zwischen den drei untersuchten Gewebetypen pro Zyklusphase (proliferativ und sekretorisch) verwendet.

Für jede Zyklusphase wurden die Expressionsdaten pro Gen zwischen den drei Gewebetypen mithilfe eines gemischten linearen Modells verglichen. Dabei wurde die Genexpression als abhängige Variable modelliert, das Gewebe stellte einen festen und die Patientin einen zufälligen Faktor dar.

Für den Vergleich der Expressionsdaten eines Gens innerhalb eines Gewebes zwischen den Proben aus der proliferativen und aus der sekretorischen Zyklusphase wurde ein nach *Satterthwaite* modifizierter t-Test für heteroskedastische Stichproben durchgeführt.

### 2.10.2 Statistische Analyse der Dezidualisierungsassays

Bei den Dezidualisierungsversuchen wurden pro Gen paarweise Vergleiche verschiedener Behandlungen an voneinander abhängigen Stichproben mithilfe eines einseitigen t-Tests analysiert. Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Tests wurden mithilfe der Software GraphPad Prism, Version 5.03 (San Diego, USA) durchgeführt.

### **2.10.3 Statistische Analyse der Daten aus den Assays für EMT**

Sowohl bei der Analyse der Induktion als auch der Reversibilität der EMT wurden pro Gen paarweise Vergleiche verschiedener Behandlungen an voneinander abhängigen Stichproben mithilfe eines zweiseitigen t-Tests analysiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expressionsanalyse

#### 3.1.1 Expression der Komponenten der BMP-Signalkaskade im humanen Endometrium und in endometrialen Läsionen

Die Expression des BMP-Signalings im reproduktiven System von Nagern und Menschen ist von diversen Arbeitsgruppen untersucht worden (s. 1.4.3). Eine genauere Analyse der Expression im humanem Endometrium und endometrialen Läsionen wurde jedoch nicht durchgeführt. Um der Frage nachzugehen, ob im humanen Endometrium und in endometrialen Läsionen eine funktionales BMP-Signaling stattfindet, wurde zunächst mittels qPCR untersucht ob alle relevanten Komponenten exprimiert sind. Zu den essentiellen Komponenten gehören BMP2, 4, 6 und 7, sowie deren Rezeptoren BMPR1A (ALK-3), BMPR1B (ALK-6) und BMPR2. Des Weiteren wurde die Expression der für diesen Signalweg spezifischen Rezeptor-SMADs (SMAD1/5/8) und dem *Common-SMAD* 4, dass bei mehreren Signalwegen eine Rolle spielt (z.B. TGF $\beta$ -Signalweg), analysiert. Auch die BMP-Antagonisten Noggin und USAG1 wurden untersucht, denn USAG1 kann BMP2, 4, 6 und 7 binden und inhibieren (Laurikkala *et al.*, 2003; Yanagita *et al.*, 2004) und Noggin bindet diverse BMPs, darunter auch BMP2, 4, 6 und 7. Durch die Bindung inhibiert Noggin BMP2, 4 und 7. Neueste Ergebnisse zeigen, dass die BMP6 Aktivität durch die Bindung an Noggin nicht beeinträchtigt wird (Song *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2011).

In Abbildung 8 und Abbildung 9 ist dargestellt, dass alle untersuchten Komponenten der BMP-Signalkaskade im Endometrium, in ovariellen Zysten und in peritonealen Läsionen in der proliferativen sowie der sekretorischen Phase exprimiert sind.

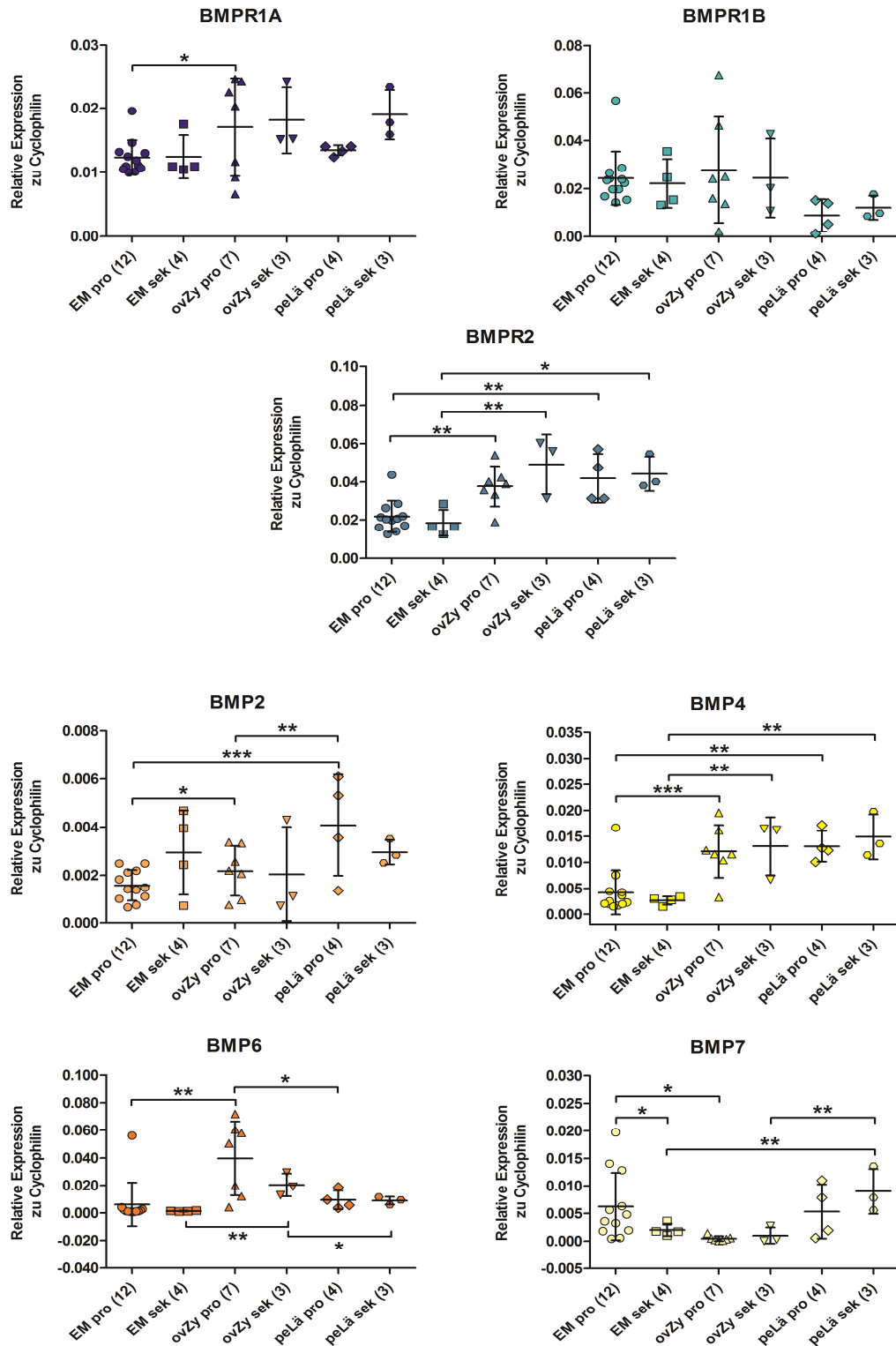
Eine signifikant vom Zyklus abhängige Expression wurde nur bei BMP7 (Abbildung 8) detektiert. BMP7 ist in der proliferativen Phase im Endometrium im Mittel um den Faktor 3 stärker exprimiert als in der sekretorischen Phase. Alle anderen untersuchten Gene weisen keine Zyklusabhängigkeit in ihrer Expression auf.

Für viele der untersuchten Komponenten konnten Expressionsunterschiede im Vergleich zwischen Endometrium und endometrialen Läsionen detektiert

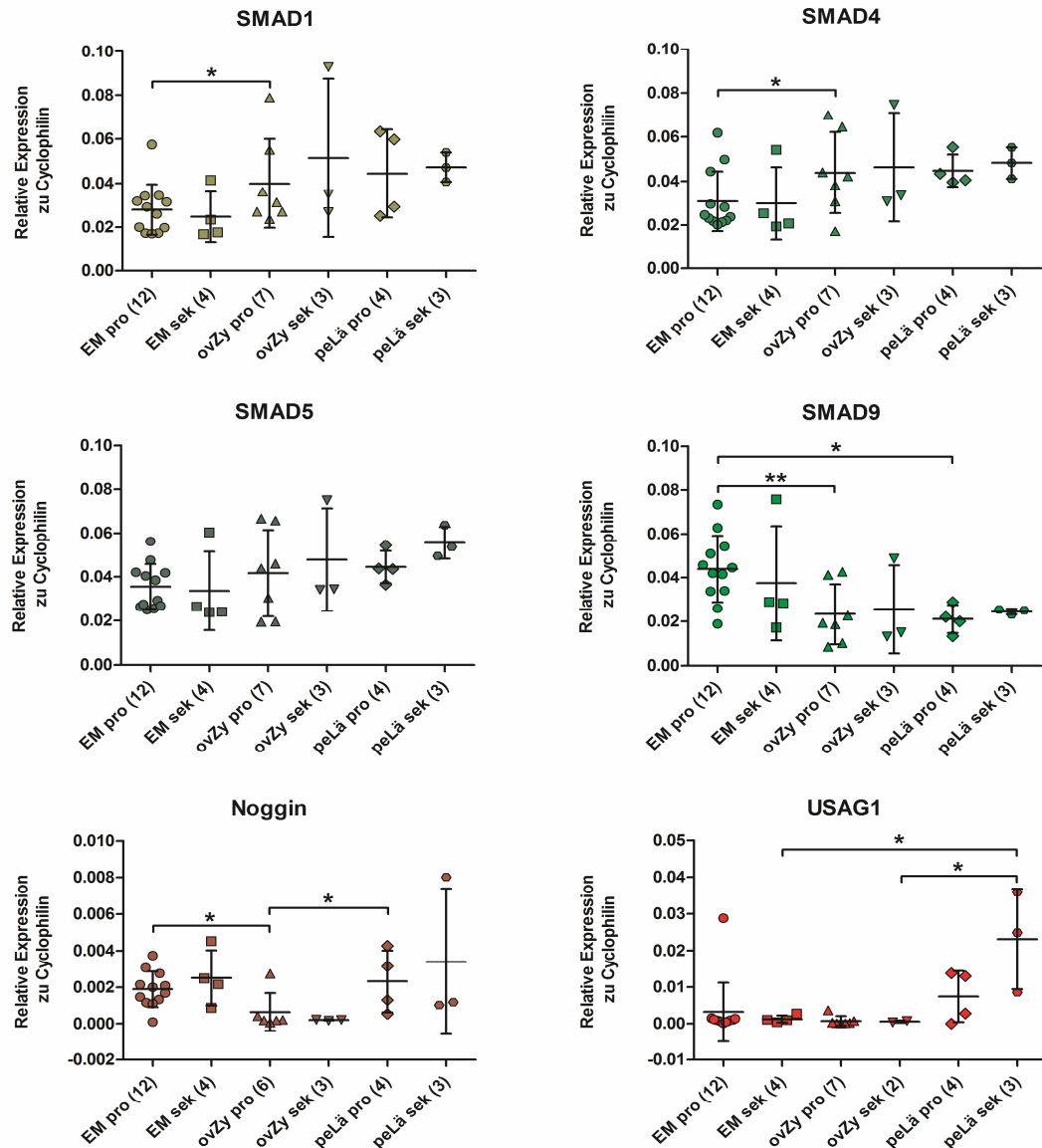
werden. BMPR2 ist in ovariellen Zysten und in peritonealen Läsionen in beiden Zyklusphasen stärker exprimiert als im Endometrium. Tendenziell ist es für BMPR1A ähnlich, allerdings ist nur die verstärkte Expression in ovariellen Zysten gegenüber dem Endometrium in der proliferativen Phase signifikant. BMP2 ist in peritonealen Läsionen in der proliferativen Phase am stärksten exprimiert. Die Expression in den peritonealen Läsionen ist um den Faktor 2 stärker als in ovariellen Zysten und um den Faktor 3 stärker als im proliferativen Endometrium. Die Expression von BMP4 ist, ähnlich wie die Expression von BMPR2, in den zwei Läsionsarten in beiden Zyklusphasen erhöht. BMP6 ist in den ovariellen Zysten signifikant stärker exprimiert als im Endometrium und in peritonealen Läsionen. BMP7 ist in der sekretorischen Phase in peritonealen Läsionen stärker exprimiert als in ovariellen Zysten und im Endometrium. Die Expression in der proliferativen Phase ist in ovariellen Zysten signifikant niedriger als im Endometrium. (Abbildung 8)

Die Expression von SMAD1, 5 und 4 (Abbildung 9) ist in ovariellen Zysten und peritonealen Läsionen tendenziell stärker als im Endometrium. Eine signifikant stärkere Expression von SMAD1 und SMAD4 findet man in proliferativen ovariellen Zysten. SMAD9 dagegen ist in der proliferativen Phase in den beiden Läsionsarten schwächer exprimiert als im Endometrium.

Noggin (Abbildung 9) ist in proliferativen Zysten signifikant schwächer exprimiert als in proliferativem Endometrium und in proliferativen Läsionen. USAG1 (Abbildung 9) ist in der sekretorischen Phase in Läsionen signifikant stärker exprimiert als in ovariellen Zysten und im Endometrium. Eine stärkere Expression von USAG1 in peritonealen Läsionen gegenüber Endometrium und Peritoneum konnte auch in zwei Expressionsstudien der Bayer Pharma AG gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 8: Expression der BMP-Rezeptoren und der BMPs im Endometrium und in endometrialen Läsionen während des Zyklus.** Die Gesamt-RNA wurde aus den Geweben isoliert, revers transkribiert und mittels qPCR mit den entsprechenden Primern analysiert. Die BMP-Rezeptoren und die BMPs sind im humanen Endometrium, in ovariellen Zysten und peritonealen Läsionen exprimiert. BMP7 ist im Endometrium zyklusabhängig exprimiert. Dargestellt ist die relative Expression zu Cyclophilin der einzelnen Proben sowie der Mittelwert  $\pm$  SD der verschiedenen Gewebe. Die Anzahl der verwendeten Proben ist in Klammern angegeben. \* $p > 0,05$ , \*\* $p > 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . pro, proliferativ; sek, sekretorisch; EM, Endometrium; ovZy, ovarielle Zyste; peLä; peritoneale Läsion.



**Abbildung 9: Expression der SMADs und der BMP-Antagonisten im Endometrium und in endometrialen Läsionen während des Zyklus.** Die Gesamt-RNA wurde aus den Geweben isoliert, revers transkribiert und mittels qPCR mit den entsprechenden Primern analysiert. Die SMADs und die BMP-Antagonisten sind im humanen Endometrium, in ovariellen Zysten und peritonealen Läsionen exprimiert. Dargestellt ist die relative Expression zu Cyclophilin der einzelnen Proben sowie der Mittelwert  $\pm$  SD der verschiedenen Gewebe. Die Anzahl der verwendeten Proben ist in Klammern angegeben. \* $p > 0,05$ , \*\* $p > 0,01$ . pro, proliferativ; sek, sekretorisch; EM, Endometrium; ovZy, ovarielle Zyste; peLä; peritoneale Läsion.

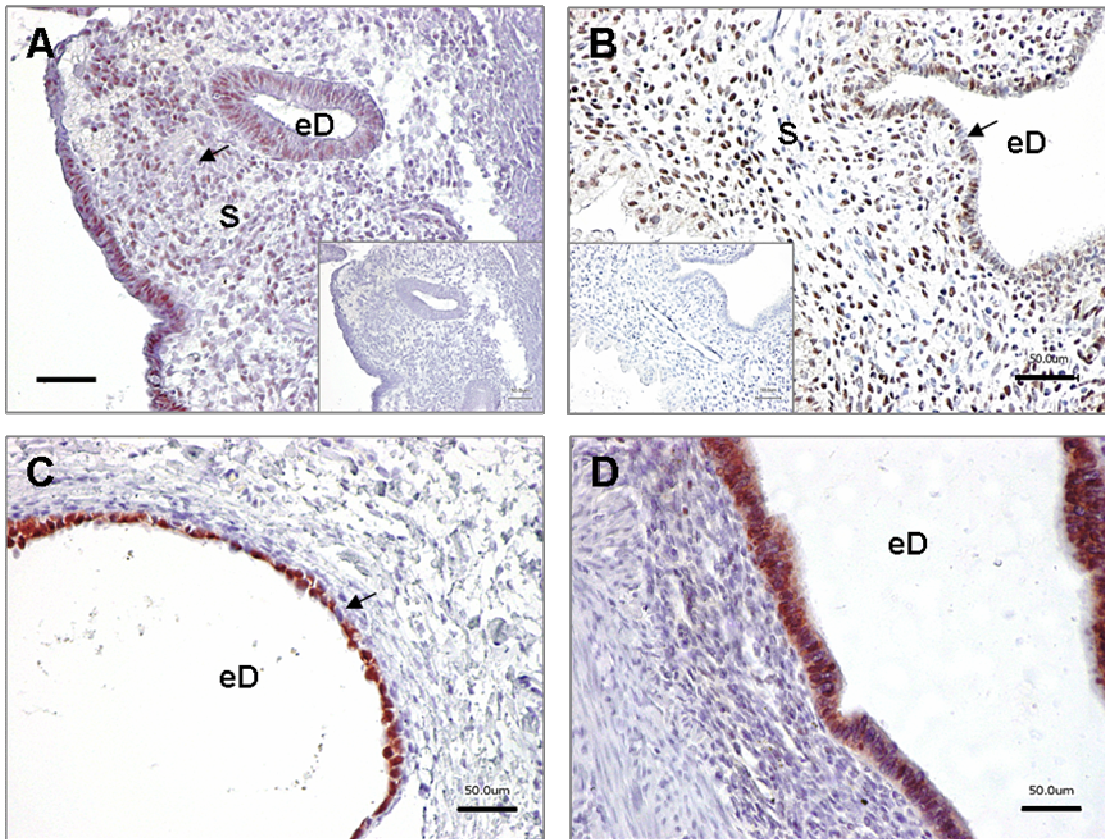
Insgesamt lässt sich sagen, dass alle Komponenten der BMP-Signalkaskade im humanen Endometrium und in peritonealen und ovariellen Läsionen exprimiert sind. Somit ist prinzipiell ein funktionales BMP-Signaling möglich. Eine zyklusabhängige Expression konnte im Endometrium für BMP7 festgestellt werden.

Die Expressionsunterschiede einiger Komponenten der BMP-Signalkaskade zwischen Endometrium und endometrialen Läsionen legen den Schluss einer veränderten Regulation des BMP-Signalings bei Endometriose nahe.

### **3.1.2 Nachweis eines funktionalen BMP-Signalings auf Proteinebene**

Die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass alle Komponenten der BMP-Signalkaskade im Endometrium und in endometrialen Läsionen exprimiert sind. Ausgehend von der Hypothese, dass in diesen Geweben ein funktionales BMP-Signaling stattfindet, wäre der Nachweis von phosphorylierten SMADs mittels Immunhistochemie ein Indiz für die Aktivität der Signalkaskade. Denn die Aktivierung der BMP-Rezeptoren durch Ligandenbindung führt zur Phosphorylierung der Rezeptor-SMADs (s. 1.4.2). Daher wurden humane Schnitte von Endometrium, peritonealen Läsionen und rektovaginalen Läsionen aus der proliferativen und sekretorischen Phase mit einem Antikörper gegen phospho-SMAD1/5/8 gefärbt.

Immunhistochemisch konnte pSMAD-1/5/8 in Stromazellen und in Zellen der epithelialen Drüsen im proliferativen und sekretorischen Endometrium nachgewiesen werden (Abbildung 10A und B). In peritonealen Läsionen (Abbildung 10C) und rektovaginalen Läsionen (Abbildung 10D) konnte pSMAD-1/5/8 in epithelialen Drüsen detektiert werden. Die Pfeile in Abbildung 10 zeigen negative Kerne.



**Abbildung 10: Immunhistochemische Detektion von pSMAD-1/5/8 im Endometrium und in endometrialen Läsionen.** Immunhistochemische Lokalisierung von pSMAD-1/5/8 zum Nachweis der Aktivität der BMP-Signalkaskade auf Paraffinschnitten von proliferativem Endometrium (A), sekretorischem Endometrium (B), einer peritonealen Läsion (C) und einer rektovaginalen Läsion (D). Braun (DAB, B) oder rot (NovaRed, A, C und D) gefärbte Kerne sind immunreaktiv. Bild (A) enthält eine Negativ-Kontrolle (nur mit Antikörper-Diluent inkubiert) und Bild (B) enthält eine IgG-Kontrolle. Die Pfeile zeigen exemplarisch negative Zellkerne. Maßstabsbalken = 50 µm. eD, epitheliale Drüsen; S, Stroma.

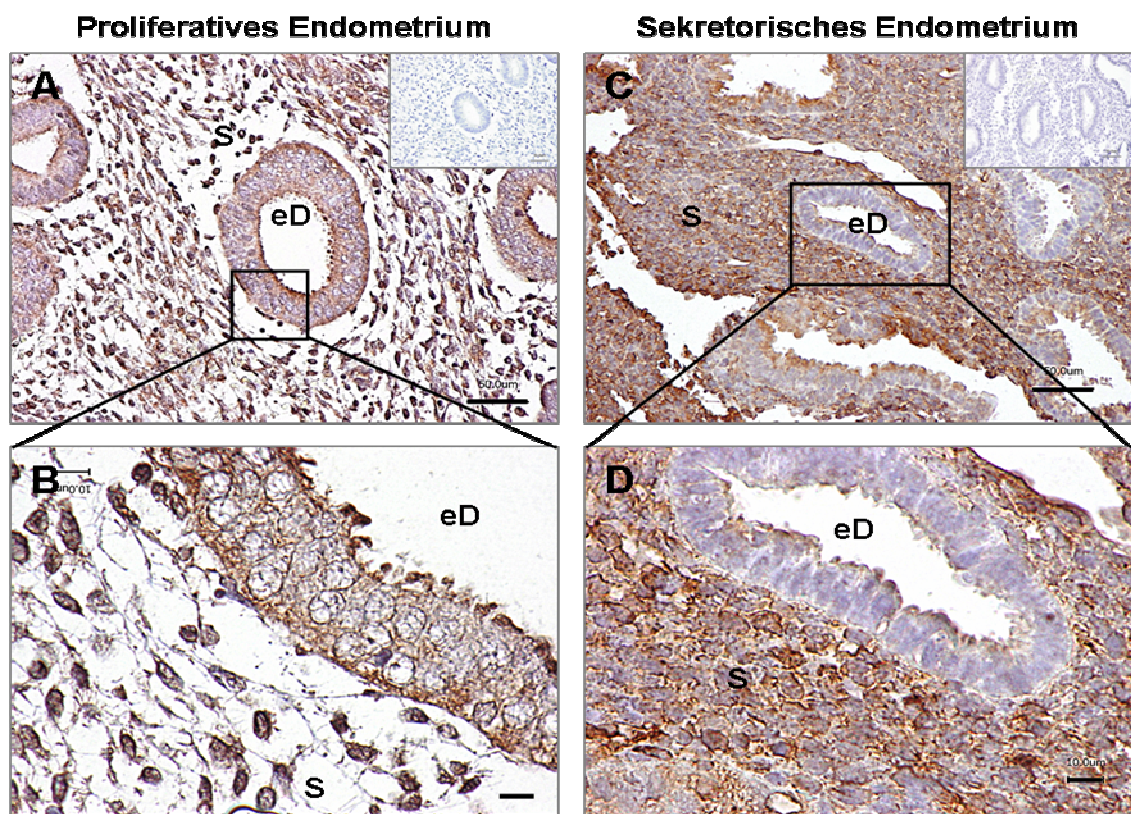
Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse, kann man davon ausgehen, dass im Endometrium und bei Endometriose ein funktionales BMP-Signaling stattfindet.

### 3.1.3 Nachweis der zyklusabhängigen Expression von BMP7 auf Proteinebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass BMP7 im humanen Endometrium zyklisch abhängig exprimiert wird (s. 3.1.1, Abbildung 8), wurde mittels immunhistochemischer Analyse überprüft ob diese Zyklusabhängigkeit auch auf Proteinebene nachweisbar ist. Dazu wurden Schnitte von humanem Endometrium aus der proliferativen und sekretorischen Phase mit einem Antikörper gegen BMP7 gefärbt.

Es zeigte sich, dass BMP7 im proliferativen und sekretorischen Endometrium nachweisbar ist. Auf Proteinebene ändert sich die Lokalisation von BMP7 während des Zyklus räumlich. BMP7 ist in der proliferativen Phase in EEC und ESC exprimiert. In der sekretorischen Phase, besonders während der Dezidualisierung, ist BMP7 sehr stark in den ESC exprimiert, aber nicht in den EEC (Abbildung 11).

Die verstärkte BMP7-Expression in den ESC in der sekretorischen Phase ist ein Hinweis dafür, dass BMP7 eine wichtige Rolle bei der Dezidualisierung spielt.



**Abbildung 11: Immunhistochemische Detektion von BMP7 im proliferativen und sekretorischen Endometrium.** Immunhistochemische Lokalisierung von BMP7 auf Paraffinschnitten von proliferativem (A, B) und sekretorischem (C, D) Endometrium. Braun gefärbte Gewebe sind immunreaktiv. Die Kerne wurden blau angefärbt. Die oberen Bilder enthalten Negativ-Kontrollen (Inkubation nur mit Antikörper Diluent) in der oberen rechten Ecke. Maßstabsbalken A und C = 50 µm, Maßstabsbalken B und D = 10 µm. eD, epitheliale Drüsen; S, endometriales Stroma.

## 3.2 Dezidualisierung

Die Dezidualisierung ist die Vorbereitung der ESC auf die Einnistung einer befruchteten Eizelle. Beim Menschen findet die Dezidualisierung in jedem Zyklus in der sekretorischen Phase statt (s. 1.1.2). Ausgehend von der Hypothese, dass BMPs die Dezidualisierung der ESC vermindern, wurde zunächst ein Assay zur *in vitro* Dezidualisierung etabliert, an dem im Anschluss der Einfluss der BMPs auf die Dezidualisierung analysiert werden konnte.

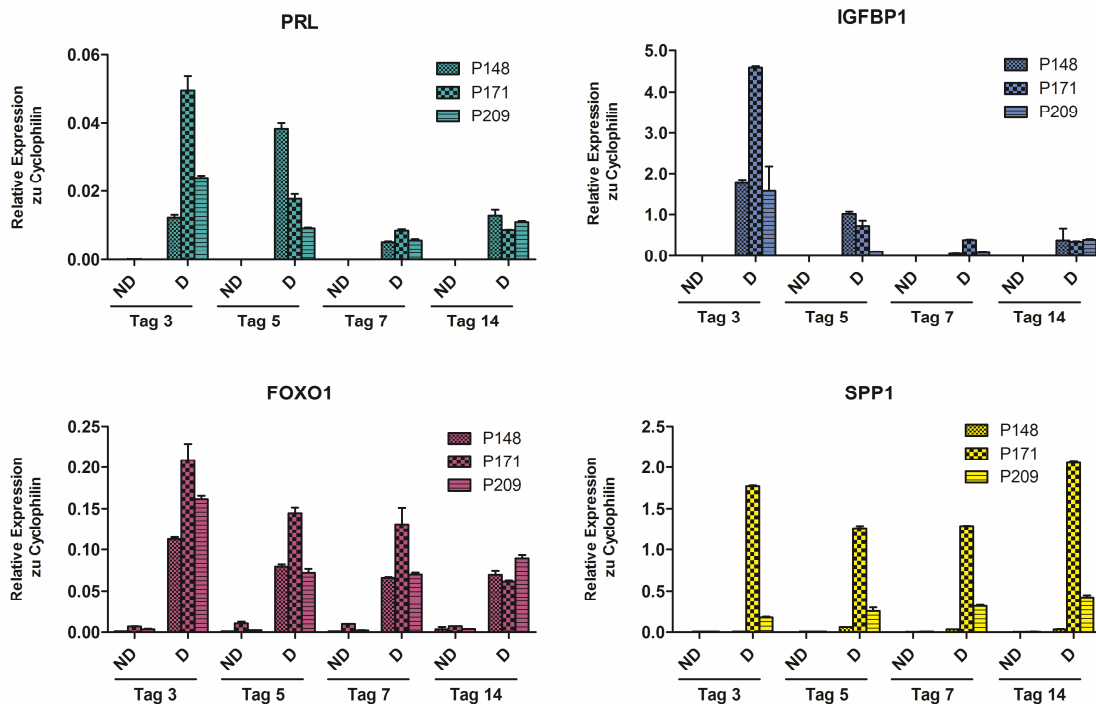
### 3.2.1 Etablierung des *in vitro* Dezidualisierungsassays

Eine *in vitro* Dezidualisierung von humanen ESC kann durch Behandlung der Zellen mit Progesteron und Östrogen oder durch cAMP induziert werden (vgl. 1.1.2). Da allerdings bekannt ist, dass primäre humane endometriale Zellen in Zellkultur nur sehr schwach hormonresponsiv sind (Kirk und Irwin, 1980) und auch im Rahmen der Dezidualisierungsversuchen für diese Arbeit die Hormonrezeptoren in den ESC kaum nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), wurde die Dezidualisierung mittels cAMP ausgelöst.

Eine erfolgreiche Dezidualisierung wurde durch eine erhöhte Expression der Dezidualisierungsmarker PRL, IGFBP1, FOXO1 und SPP1 und durch die morphologischen Veränderungen von Fibroblasten-artigen ESC zu epitheloiden Dezidualzellen bestimmt.

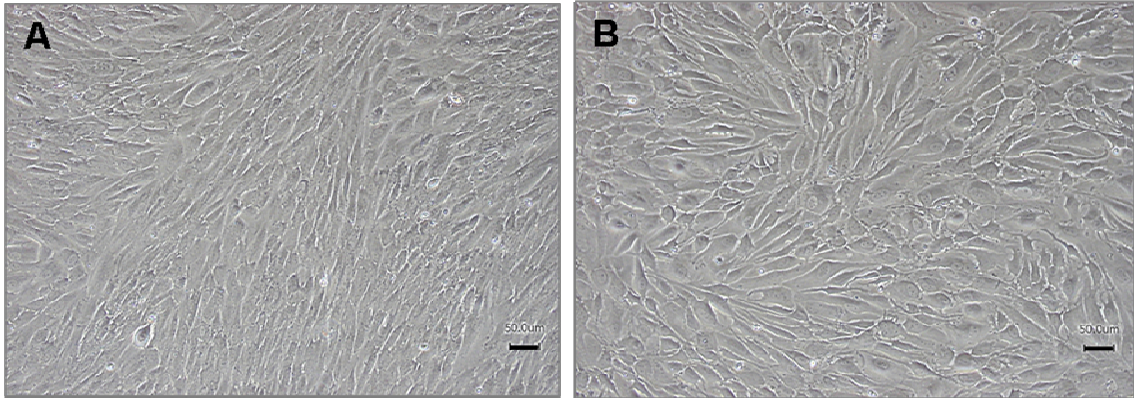
Bei der Untersuchung von primären dezidualisierten Zellen von drei verschiedenen Patientinnen, zeigte sich, dass die Expression der untersuchten Dezidualisierungsmarker im Vergleich zu den nicht-dezidualisierten Zellen ab Tag 3 ansteigt. Die Dezidualisierungsmarker PRL, IGFBP1 und SPP1 werden nur in den durch cAMP dezidualisierten Zellen exprimiert. Die stärkste Expression von PRL findet man an Tag 3 und Tag 5. IGFBP1 ist in allen Patientinnen an Tag 3 am stärksten exprimiert. Bis zu Tag 14 nimmt die Expression ab. Die SPP1-Expression ist an allen Messtagen ähnlich. FOXO1 ist gering in nicht-dezidualisierten Zellen exprimiert. Durch die Dezidualisierung kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Expression, die über die 14 Tage abnimmt (Abbildung 12). Um zu überprüfen, ob es sich bei den

Expressionsänderungen um Effekte durch die Dezidualisierung handelt wurde bei einer Patientin auch die Expression am Tag 0 überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die ESC an Tag 0 kein PRL und IGFBP1 exprimieren. FOXO1 und SPP1 sind an Tag 0 sehr viel schwächer exprimiert als in dezidualisierten ESC (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 12: Erhöhte Expression der Dezidualisierungsmarker in humanen ESC während der *in vitro* Dezidualisierung durch 0,5 mM cAMP.** Die Expression der Dezidualisierungsmarker wurde in nicht-dezidualisierten (ND) und dezidualisierten (D) Zellen nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mittels qPCR bestimmt. PRL, IGFBP1 und SPP1 sind in dezidualisierten Zellen ab Tag 3 stark exprimiert, konnten aber in nicht-dezidualisierten ESC nicht nachgewiesen werden. FOXO1 weist eine geringe basale Expression in den nicht-dezidualisierten ESC auf. Aber auch FOXO1 wird durch die cAMP-Behandlung stärker exprimiert. Die Expression von PRL, IGFBP1 und FOXO1 während der Dezidualisierung nimmt über die 14 Tage ab. An Tag 0 sind PRL und IGFBP1 nicht exprimiert und FOXO1 und SPP1 sind nur sehr schwach exprimiert (Daten nicht gezeigt). Dargestellt ist die relative Expression zu Cyclophilin von ESC aus drei Patientinnen (P).

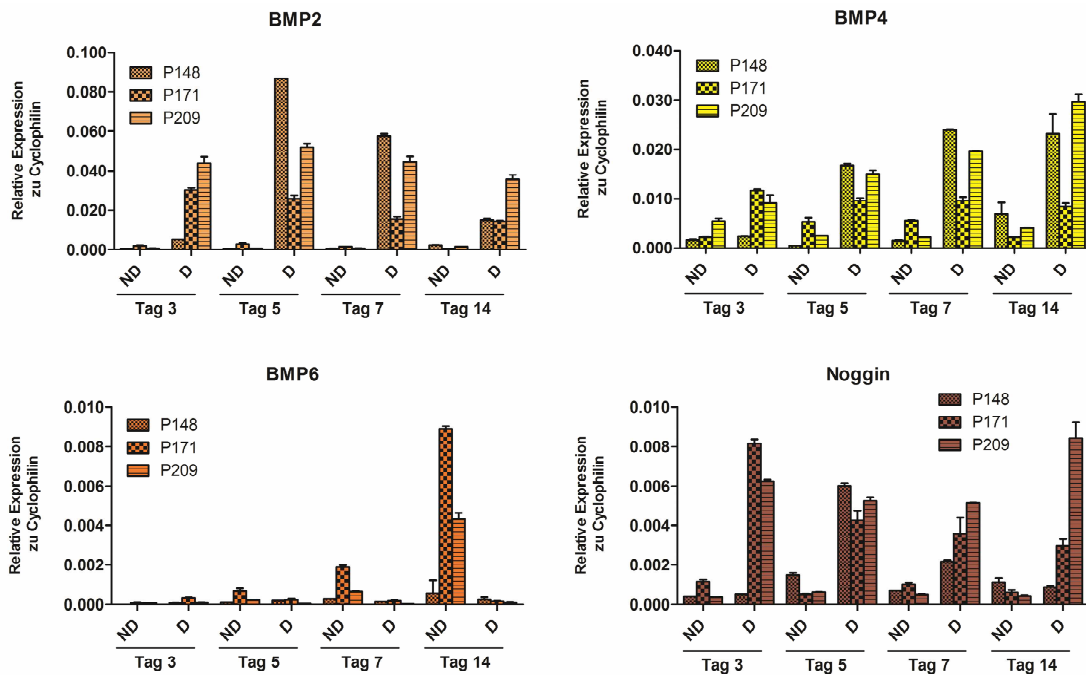
Morphologisch kann man ab Tag 5 die typischen Veränderungen dezidualisierter Zellen erkennen. Die ESC vergrößern sich und werden zu sogenannten Dezidualzellen (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Morphologie dezidualisierter ESC *in vitro*.** (A) Unbehandelte Zellen nach fünf Tagen in Kultur mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie. (B) Dezidualisierte Zellen nach fünf Tagen Behandlung mit 0,5 mM cAMP. Die ESC sind vergrößert und abgerundet. Maßstabsbalken = 50 µm.

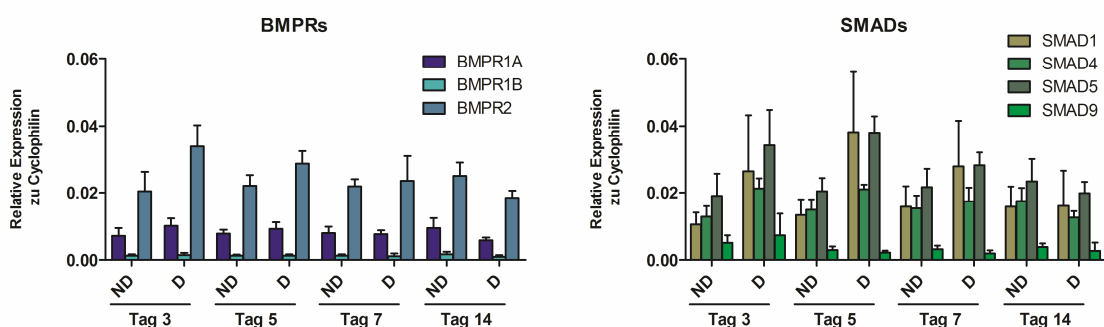
Auch die Expression der BMP-Signaling Komponenten wurde während der Dezidualisierung untersucht.

In allen drei Patientinnen ist während der Dezidualisierung eine stärkere BMP2-Expression zu detektieren. Die maximale BMP2-Expression in dezidualisierten ESC wird an Tag 5 erreicht. Auch BMP4 wird während der Dezidualisierung stärker exprimiert als in nicht-dezidualisierten ESC. Die Expression steigt in den dezidualisierten Zellen über 14 Tage an. BMP6 ist insgesamt nur sehr schwach exprimiert. Ab Tag 7 steigt die BMP6-Expression in den nicht-dezidualisierten ESC stark an. Noggin ist in den dezidualisierten ESC tendenziell stärker exprimiert als in den nicht-dezidualisierten ESC. Nur bei einer Patientin (P148) ist die Noggin-Expression in dezidualisierten und nicht-dezidualisierten ESC an Tag 3 und Tag 14 ähnlich (Abbildung 14). Die Expression an Tag 0 ist für BMP2, BMP4, BMP6 und Noggin ähnlich der Expression in nicht-dezidualisierten Zellen (Daten nicht gezeigt). BMP7 und der BMP-Antagonist USAG1 konnten in diesem Assay nicht detektiert werden.



**Abbildung 14: Expression von BMP2, BMP4, BMP6 und Noggin während der *in vitro* Dezidualisierung durch 0,5 mM cAMP.** Die Expression von BMP2, 4 und 6 sowie von Noggin wurde in nicht-dezidualisierten (ND) und dezidualisierten (D) Zellen nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mittels qPCR bestimmt. Die Expression von BMP2, BMP4 und tendenziell auch von Noggin ist in den dezidualisierten ESC stärker als in den nicht-dezidualisierten Zellen. Noggin und BMP6 sind insgesamt nur sehr schwach exprimiert. Anders als bei BMP2 und BMP4, steigt die BMP6 Expression bei längerer Kulturdauer in den ND ESC an. Dargestellt ist die relative Expression zu Cyclophilin von ESC aus drei Patientinnen (P).

Die Expression der BMP-Rezeptoren und der SMADs bleibt durch die durch cAMP induzierte Dezidualisierung unverändert (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Expression der BMPRs und SMADs während der *in vitro* Dezidualisierung durch 0,5 mM cAMP.** Die Expression der BMPRs und der SMADs wurde in nicht-dezidualisierten (ND) und dezidualisierten (D) Zellen nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mittels qPCR bestimmt. Die BMP-Rezeptoren 1A, 1B und 2 sind in dezidualisierten und nicht-dezidualisierten ESC exprimiert. Auch die SMADs 1, 4, 5 und 9 sind in D und ND exprimiert. Die Expression der BMPRs und der SMADs bleibt von der cAMP-Behandlung unbeeinflusst. Dargestellt ist die relative Expression zu Cyclophilin (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten mit ESC von drei verschiedenen Patienten.

Zwar nimmt die Expression der Dezidualisierungsmarker PRL, IGFBP1 und FOXO1 in den dezidualisierten ESC an Tag 5 wieder leicht ab (Abbildung 12), aber die Expression von BMP2 und BMP4 ist an Tag 5 am stärksten oder steigt sogar bis zu Tag 14 noch weiter an (Abbildung 14). Um die Auswirkungen der BMPs auf die Dezidualisierung zu untersuchen wurde daher für weitere Versuche Tag 5 als Endpunkt gewählt.

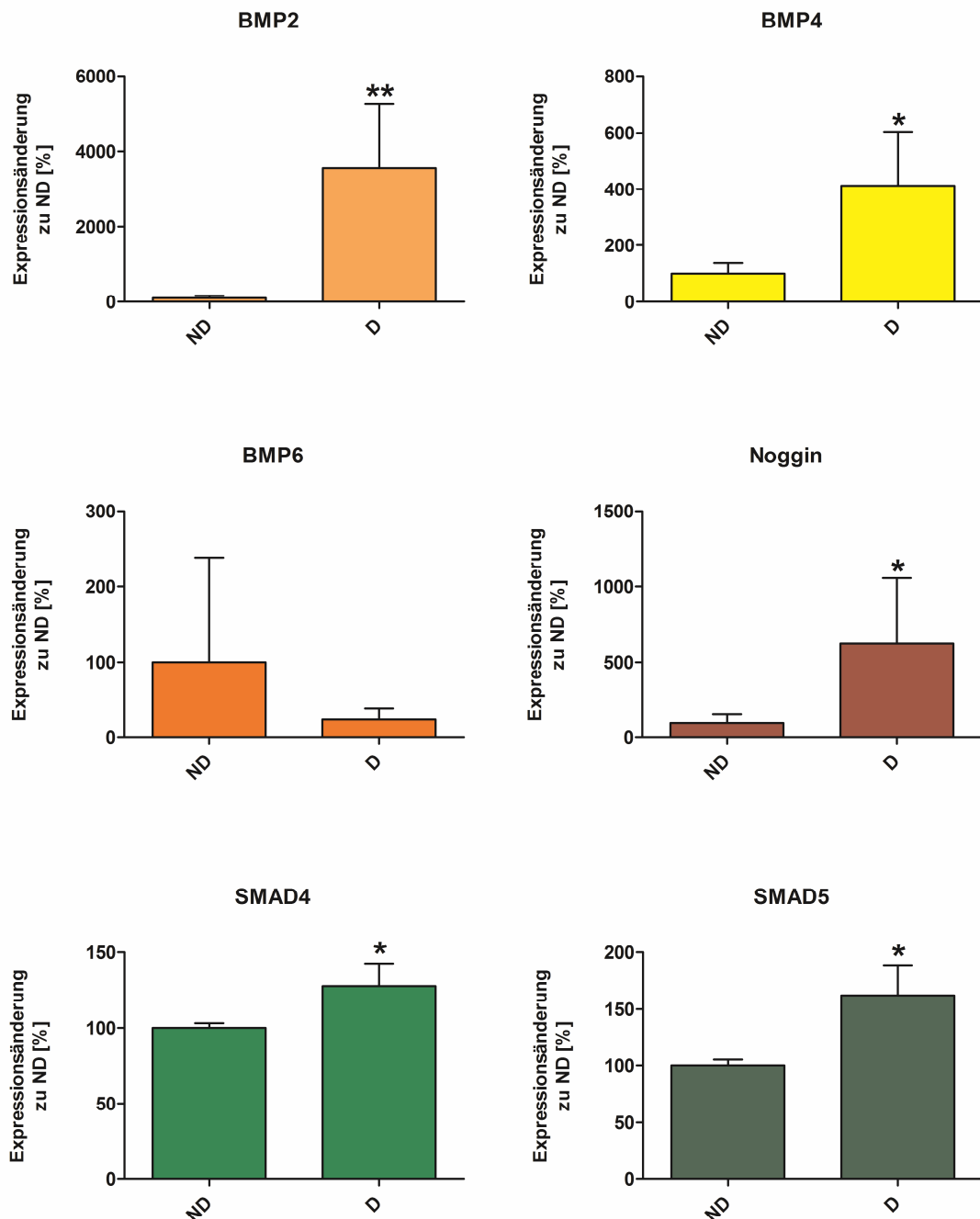
### **3.2.2 Effekt der Dezidualisierung auf die Expression der BMP-Signaling Komponenten**

Es ist bekannt, dass BMP2 während der *in vitro* Dezidualisierung verstärkt (Li *et al.*, 2007; Stoikos *et al.*, 2008) und BMP7 vermindert (Kodama *et al.*, 2010) exprimiert wird. Um dies zu Überprüfen und um weitere Expressionsänderungen von Komponenten der BMP-Signalkaskade durch die Dezidualisierung zu finden, wurde die Expression der Komponenten nach fünftägiger Behandlung mit cAMP in dezidualisierten ESC untersucht.

Eine verstärkte Expression von BMP2 nach 5 Tagen Behandlung mit cAMP konnte auch im Rahmen dieser Arbeit detektiert werden (Abbildung 16). BMP7 wurde in diesem Dezidualisierungsassay nicht detektiert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BMP4, der BMP-Antagonist Noggin, SMAD4 und SMAD5 durch die Dezidualisierung signifikant stärker exprimiert werden (Abbildung 16). Im Gegensatz dazu wird BMP6 tendenziell, aber nicht signifikant, vermindert exprimiert.

Wie auch schon in 3.2.1 beschrieben, bleibt die Expression der BMP-Rezeptoren durch die Behandlung mit cAMP unverändert (Daten nicht gezeigt). Auch das Expressionsniveau von SMAD1 und SMAD9 bleibt statistisch unverändert (Daten nicht gezeigt).

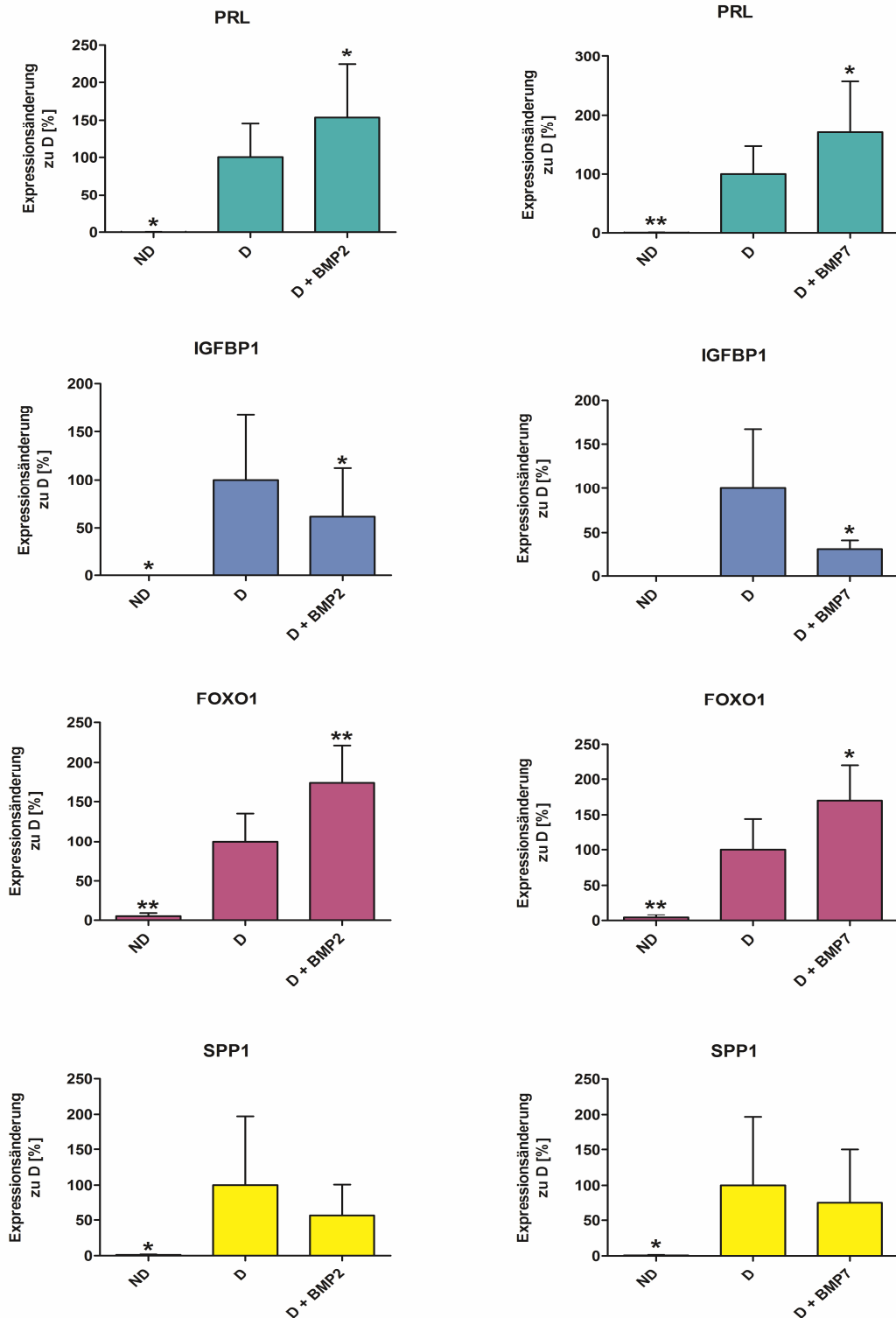


**Abbildung 16: Expression von BMP2, BMP4, BMP6, Noggin, SMAD4 und SMAD5 nach fünftägiger Dezidualisierung.** ESC wurden für 5 Tage mit 0,5 mM cAMP behandelt. Anschließend wurde die Expression der Gene mittels qPCR bestimmt und mit der Expression in nicht-dezidualisierten (ND) ESC verglichen. Die Expression von BMP2, BMP4, Noggin, SMAD4 und SMAD5 wird durch die cAMP-Behandlung signifikant induziert. Die BMP6-Expression ist im Vergleich zu den Kontrollzellen niedriger, dies ist allerdings nicht signifikant. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Expressionsänderung zur Kontrolle (ND) definiert als 100 %  $\pm$  SD. In fünf unabhängigen Versuchen wurden ESC aus drei Patientinnen verwendet. \*p < 0,05 und \*\*p < 0,01 im Vergleich zu ND (t-Test). D, dezidualisierte ESC.

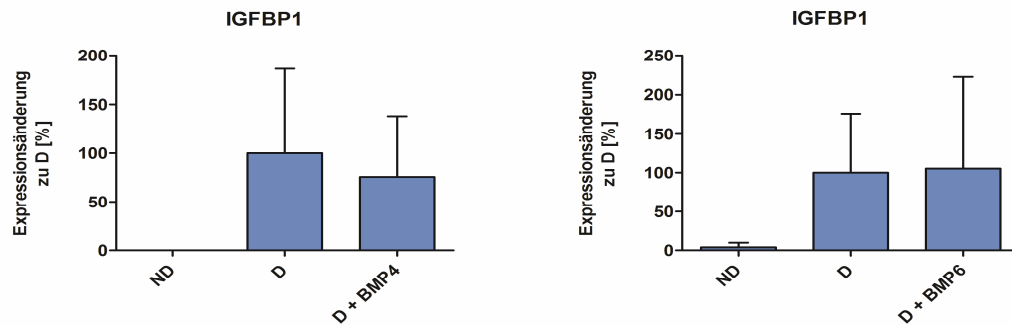
### 3.2.3 Beeinflussung der Dezidualisierungsmarker-Expression durch die Zugabe von BMPs während der Dezidualisierung

Aufgrund der Literaturdaten zum Einfluss der BMPs auf die Dezidualisierung, besteht die Vermutung, dass die BMPs die Dezidualisierung vermindern (s. 1.4.3). Um dies zu untersuchen wurde der Dezidualisierungsassay mit Zugabe von BMP2, BMP7, BMP4 und BMP6 durchgeführt. Hierzu wurden ESC für 5 Tage mit cAMP und zusätzlich mit 50 ng/ml BMP2, 50 ng/ml BMP4, 200 ng/ml BMP6 oder 100 ng/ml BMP7 behandelt und anschließend die Expression der Dezidualisierungsmarker analysiert. Die Konzentrationen von BMP2 und BMP7 wurden ausgewählt, weil sie in Dezidualisierungsversuchen, die in der Literatur beschrieben sind, zu maximalen Effekten (BMP2: Verstärkung der PRL Sekretion, BMP7: Verminderung der IGFBP1 Sekretion) führten (Stoikos *et al.*, 2008; Kodama *et al.*, 2010). Für BMP4 wurde in Vorversuchen der Effekt von 5 ng/ml und von 50 ng/ml verglichen, wobei mit 50 ng/ml ein stärkerer Effekt erzielt wurde.

Durch die Zugabe der BMPs während des fünftägigen Dezidualisierungsassays veränderte sich die Expression von PRL, IGFBP1 und FOXO1. Die Expression von SPP1 blieb durch die zusätzliche Behandlung mit den BMPs unbeeinflusst (Abbildung 17, Daten für BMP4 und 6 nicht gezeigt). PRL und FOXO1 werden durch die Behandlung mit cAMP und BMPs stärker induziert als nur durch cAMP. Die IGFBP1-Expression wird im Gegensatz dazu durch die Zugabe von BMP2 oder BMP7 während der Dezidualisierung um den Faktor 1,6 bei Zugabe von BMP2 und um den Faktor 3,2 bei Zugabe von BMP7 vermindert (Abbildung 17). Durch Zugabe von BMP4 und BMP6 bleibt die IGFBP1-Expression unbeeinflusst (Abbildung 18).



**Abbildung 17: Effekt der exogenen Zugabe von BMP2 oder BMP7 auf die Expression der Dezidualisierungsmarker.** Die Expression von PRL, IGFBP1, FOXO1 und SPP1 wurde in unbehandelte Zellen oder für fünf Tage behandelte Zellen mit 0,5 mM cAMP alleine oder in Kombination mit BMP2 (50 ng/ml) oder mit BMP7 (100 ng/ml) mittels qPCR bestimmt. Die Expression von PRL und FOXO1 wird durch BMP2 und BMP7 verstärkt, die Expression von IGFBP1 vermindert. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Expressionsänderung zu dezidualisierten Zellen (D) definiert als 100 %  $\pm$  SD. In fünf unabhängigen Versuchen wurden ESC aus drei Patientinnen verwendet. \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zu D (t-Test). ND, nicht-dezidualisierte ESC.



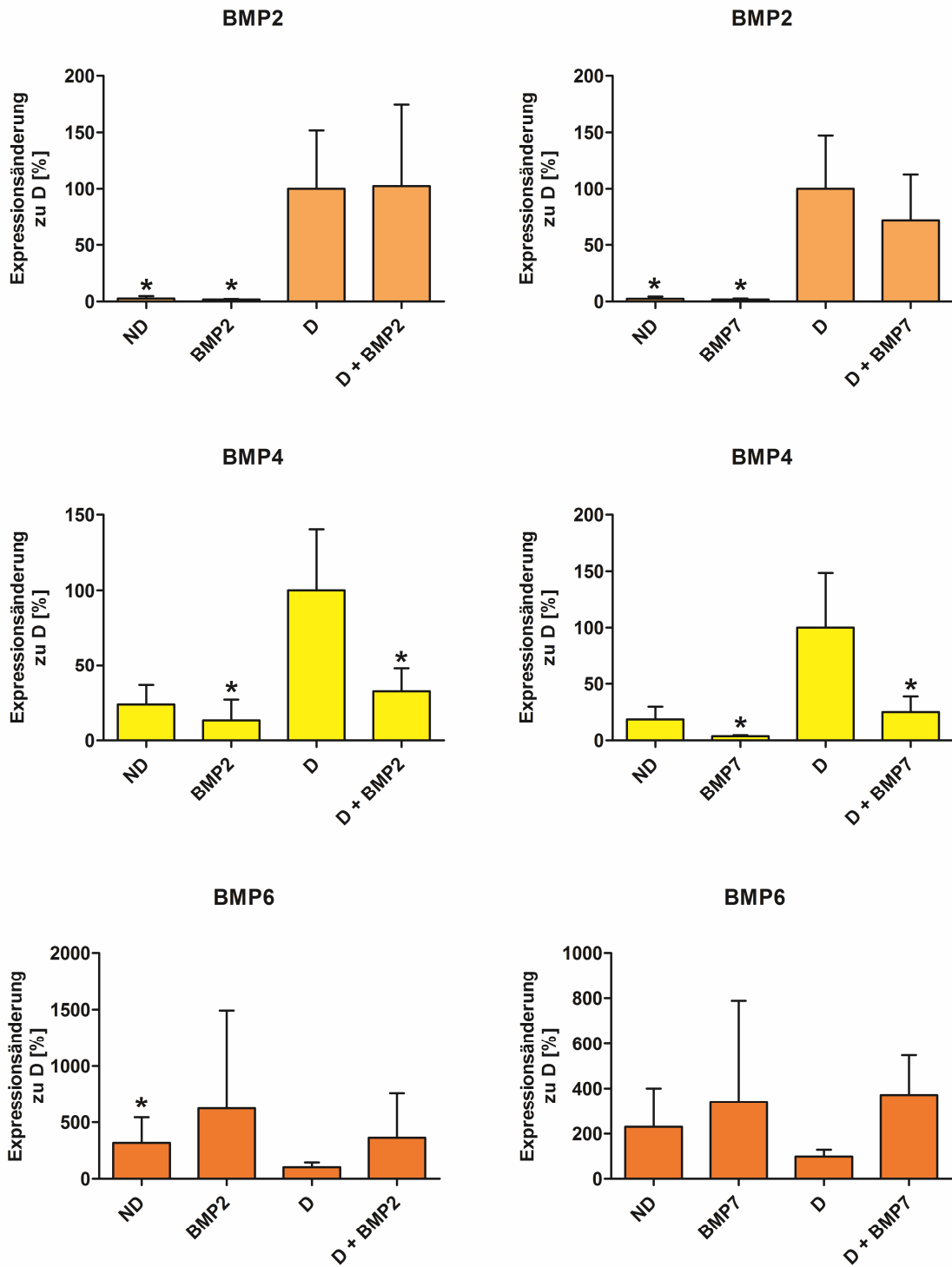
**Abbildung 18: Effekt der exogenen Zugabe von BMP4 oder BMP6 auf die Expression von IGFBP1.** Die Expression von IGFBP1 wurde in unbehandelte Zellen oder für fünf Tage behandelte Zellen mit 0,5 mM cAMP alleine oder in Kombination mit BMP4 (50 ng/ml) oder mit BMP6 (200 ng/ml) mittels qPCR bestimmt. Die Zugabe von BMP4 oder BMP6 während der Dezidualisierung hat keinen Einfluss auf die Expression des Dezidualisierungsmarkers IGFBP1. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Expressionsänderung zu dezidualisierten Zellen (D) definiert als 100 %  $\pm$  SD. In vier unabhängigen Versuchen wurden ESC aus drei Patientinnen verwendet. ND, nicht-dezidualisierte ESC.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Hypothese, dass die BMPs die Dezidualisierung vermindern, nicht bestätigt werden. PRL und FOXO1 werden bei der exogenen Zugabe der BMPs verstärkt exprimiert und IGFBP1 wird durch die Zugabe von BMP2 und BMP7 während der Dezidualisierung vermindert exprimiert. Die SPP1-Expression wird durch die BMPs nicht beeinflusst. Es scheint so zu sein, dass die durch BMP2 und BMP7 verminderte IGFBP1-Expression während der Dezidualisierung eine andere Aufgabe erfüllt.

### 3.2.4 Beeinflussung der BMP-Signaling Komponenten durch die Zugabe von BMPs während der Dezidualisierung

Zusätzlich zur Untersuchung der Veränderungen der Dezidualisierungsmarker-Expression durch die Zugabe von BMPs während der Dezidualisierung wurde auch die Expression der BMPs, BMP-Rezeptoren, SMADs und des BMP-Antagonisten Noggin untersucht.

Die Expression von BMP2 bleibt von der Zugabe von BMP2, 4, 6 oder 7 alleine oder mit cAMP unbeeinflusst (Abbildung 19, Daten zur Zugabe von BMP4 und BMP6 nicht gezeigt). Wie schon in Kapitel 3.2.2 gezeigt, kommt es zu einer Induktion der BMP2-Expression durch cAMP.



**Abbildung 19: Effekt der exogenen BMP2 oder BMP7 Zugabe auf die Expression von BMP2, BMP4 und BMP6.** Die Expression von BMP2, 4 und 6 wurde in unbehandelte Zellen oder für fünf Tage behandelte Zellen mit 0,5 mM cAMP alleine, BMP2 (50 ng/ml) oder BMP7 (100 ng/ml) alleine oder cAMP und BMPs in Kombination mittels qPCR bestimmt. Die BMP2- und die BMP6-Expression wird durch die Zugabe von BMP2 oder BMP7 während der Dezidualisierung nicht beeinflusst. Die BMP4-Expression wird vermindert. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Expressionsänderung zu dezidualisierten Zellen (D) definiert als 100 %  $\pm$  SD. In drei unabhängigen Versuchen wurden ESC aus drei Patientinnen verwendet. \*p < 0,05 im Vergleich zu D (t-Test). ND, nicht-dezidualisierte ESC.

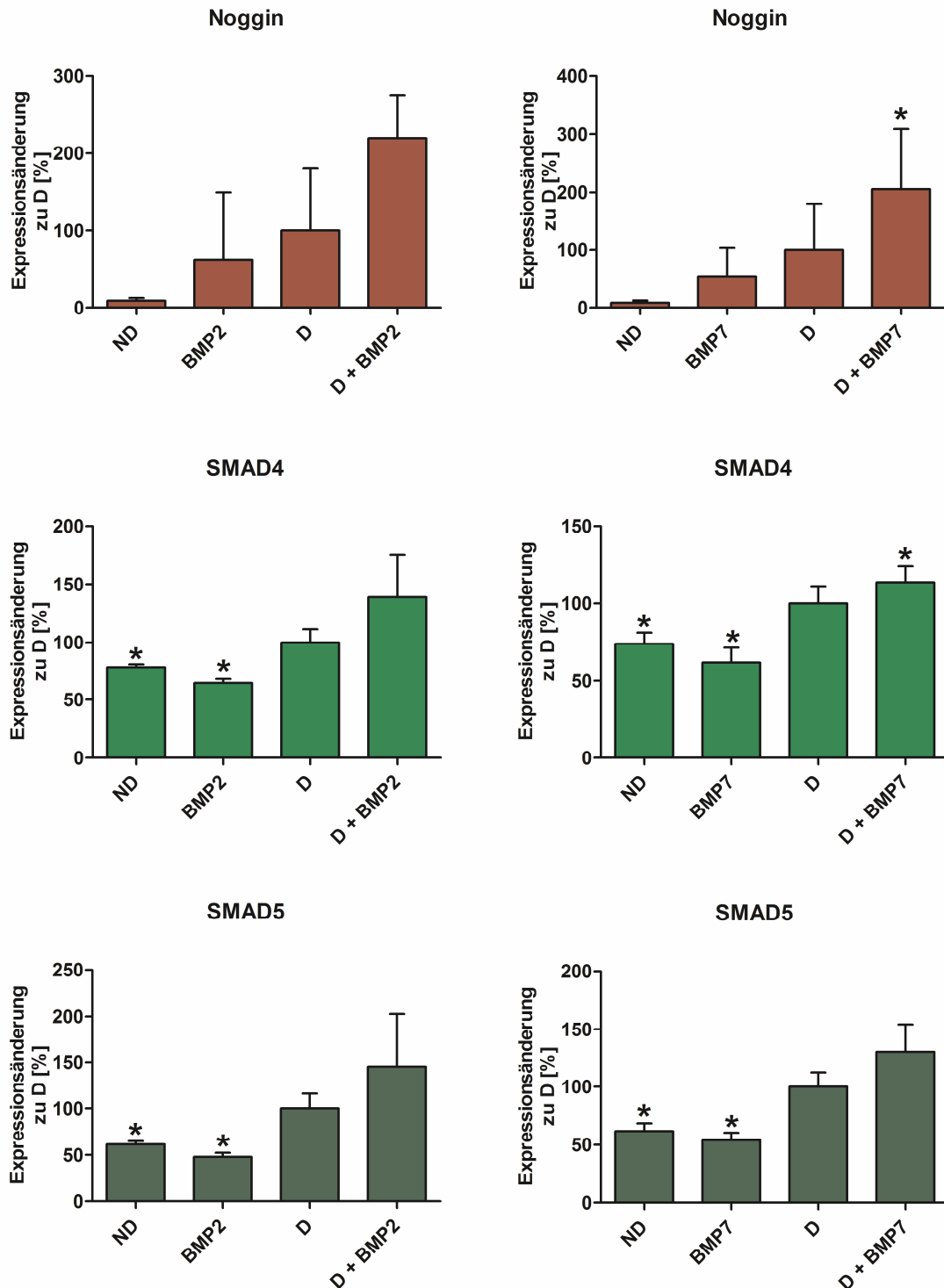
Die BMP4-Expression wird durch die Zugabe von BMP2, 7 und 6 während der Dezidualisierung im Vergleich zu dezidualisierten Zellen signifikant schwächer. Für die Zugabe von BMP4 lässt sich ein ähnlicher Trend erkennen. Die Ergebnisse für die BMP2 und BMP7 Zugabe sind in Abbildung 19 dargestellt (Daten zur Zugabe von BMP4 und BMP6 nicht gezeigt).

Die BMP6-Expression ist durch die Behandlung nicht signifikant verändert. Der Trend, dass BMP6 durch die Behandlung mit cAMP vermindert exprimiert wird (Abbildung 16) ist auch hier zu erkennen. Im Versuch mit BMP2 konnte sogar eine signifikante stärkere BMP6-Expression in den nicht-dezidualisierten Zellen im Vergleich zu dezidualisierten ESC detektiert werden (Abbildung 19).

Noggin wird durch die Zugabe von BMP4 oder BMP7 während der Dezidualisierung erhöht. Tendenziell führt auch die BMP2 Zugabe zu einer Erhöhung von Noggin. BMP6 beeinflusst die Noggin-Expression nicht (Abbildung 20, Daten zur BMP4 und BMP6 Zugabe nicht gezeigt).

Die Expression von SMAD1 und SMAD9 wird durch die Zugabe von BMP2 oder BMP7 nicht signifikant beeinflusst. SMAD5 und SMAD4 sind in dezidualisierten Zellen stärker exprimiert als in nicht-dezidualisierten Zellen und nicht-dezidualisierten Zellen, die mit BMP2 oder 7 behandelt wurden (Abbildung 20). Dies konnte auch schon in 3.2.2 gezeigt werden. Die Behandlung von ESC mit cAMP und BMP7 führt zu einer signifikanten Erhöhung der SMAD4-Expression.

Die BMPR1B-Expression ist durch Dezidualisierung oder BMP Zugabe nicht beeinflusst. Auch die Expression von BMPR1A ist durch BMP2, 4 und 7 nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Durch die Zugabe von BMP6 zur Dezidualisierung wird die Expression von BMPR1A signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt). Die BMPR2 Expression wird nur durch die Zugabe von BMP2 und cAMP signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 20: Effekt der exogenen BMP2 oder BMP7 Zugabe auf die Expression von Noggin, SMAD4 und SMAD5.** Die Expression von Noggin, SMAD4 und SMAD5 wurde in unbehandelte Zellen oder für fünf Tage behandelte Zellen mit 0,5 mM cAMP alleine, BMP2 (50 ng/ml) oder BMP7 (100 ng/ml) alleine oder cAMP und BMPs in Kombination mittels qPCR bestimmt. Die exogene Zugabe der BMPs während der Dezidualisierung führte zu einer leicht erhöhten Expression der untersuchten Gene. Signifikant war dieser Expressionsanstieg für Noggin und SMAD4 bei BMP7 Zugabe. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Expressionsänderung zur Kontrolle (dezidualisierte ESC; D) definiert als 100 %  $\pm$  SD. Ergebnisse von ESC aus drei Patientinnen aus drei unabhängigen Versuchen. \*p < 0,05 im Vergleich zu D (t-Test). ND, nicht-dezidualisierte ESC.

### 3.3 Epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist die Umwandlung von Epithelzellen in Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp, die sich aus dem Zellverband lösen können um sich an einem anderen Ort anzusiedeln (s. 1.3). Dieser Prozess führt z.B. zur Tumorprogression. Die Endometriose ist eine benigne Erkrankung, trotzdem gibt es Ähnlichkeiten mit Tumorerkrankungen. Mechsner *et al.* haben z.B. endometriale Läsionen, und ER-PR-positive Einzelzellen in Lymphknoten gefunden (Mechsner *et al.*, 2010). Daher wird vermutet, dass vereinzelte endometriale Zellen über die Lymphe oder das Blut an andere Orte gelangen und dort Läsionen etablieren können (s. 1.2.1). Ob diese Theorie auf der Fähigkeit beruht, dass endometriale Epithelzellen eine EMT durchlaufen können, soll im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden. Weiterhin soll überprüft werden, ob die EMT durch BMP7 reversibel ist, wie es für Brustkrebszellen beschrieben ist (s. 1.4.4). Dies könnte zum einen eine mögliche Behandlungsoption für Endometriose sein. Zum anderen könnte es sein, dass dieser Mechanismus durch die erhöhte USAG1-Expression in den peritonealen Läsionen (s. 3.1.1, Abbildung 9) inhibiert wird, was theoretisch die Persistenz der Läsionen erhöhen könnte.

#### 3.3.1 PCR Array für epithelial-mesenchymale Transition

Um Markergene für eine EMT zu finden, wurde zunächst ein PCR Array durchgeführt. Mit diesem Array wird die Expression von 84 Schlüsselgenen, die während der EMT ihre Expression ändern oder die diese Expressionsänderung regulieren, gemessen. Dafür wurden Hec1B-Zellen für 48 h mit 10 ng/ml TGF $\beta$ 3 behandelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass 10 ng/ml TGF $\beta$  eine EMT induzieren können (Nogai *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Da primäre EEC nur begrenzt zur Verfügung stehen wurden hier zunächst nur Hec1B Zellen eingesetzt.

Mittels dieses Arrays konnten zwölf Gene detektiert werden, deren Expression in den Hec1B Zellen durch die Behandlung mit TGF $\beta$ 3 um einen Faktor  $\geq 3$  induziert wurde (s. Tabelle 6). Die Kontrolle für die reverse Transkription und

die Kontrolle auf genomische DNA, die der Array beinhaltet, waren beide unauffällig. Von den zwölf induzierten Genen waren BMP7, KRT14 und MMP9 nur sehr schwach exprimiert ( $C_t > 30$ ), daher wurden auch diese Gene nicht weiter untersucht. Am stärksten wurde MMP2 induziert, gefolgt von PLEK2 und FN1.

**Tabelle 6: Durch Induktion der EMT in Hec1B Zellen mittels PCR Array gefundene hochregulierte Gene.** Die Expression von 84 Schlüsselgenen der EMT wurde mithilfe des PCR Arrays in unbehandelten Hec1B Zellen und für 48 h mit TGF $\beta$ 3 (10 ng/ml) behandelten Hec1B Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Gene, die um einen Faktor  $\geq 3$  induziert wurden.

Gen	Gen Symbol	Funktionale Gengruppierung (nach Herstellerangaben)	Induktion $\geq 3$
Matrix Metalloproteinase 2	MMP2	Induktion bei EMT Extrazelluläre Matrix- und Zell-Adhäsion	55,0
Plekstrin 2	PLEK2	Zytoskelett	27,5
Fibronektin 1	FN1	Induktion bei EMT Migration und Beweglichkeit Extrazelluläre Matrix- und Zell-Adhäsion	24,0
Bone morphogenetic protein 7	BMP7	Differenzierung und Entwicklung Zellwachstum und Proliferation Extrazelluläre Matrix- und Zell- Adhäsion TGF $\beta$ /BMP-Signalweg	11,9
Keratin 7	KRT7	Zytoskelett	4,1
Vimentin	VIM	Induktion bei EMT Zytoskelett Migration und Beweglichkeit	4,0
Plasminogen Aktivator Inhibitor 1	SERPINE1	Induktion bei EMT Extrazelluläre Matrix- und Zell-Adhäsion	3,9
Matrix Metalloproteinase 9	MMP9	Induktion bei EMT Extrazelluläre Matrix- und Zell-Adhäsion	3,8
Transmembranprotein 132A	TMEM132A	Induktion bei EMT	3,7
Integrin $\beta$ 1	ITGB1	Migration und Beweglichkeit Extrazelluläre Matrix- und Zell-Adhäsion Integrin-Signalweg	3,2
Keratin 14	KRT14	Differenzierung und Entwicklung	3,2

Gen	Gen Symbol	Funktionale Gengruppierung (nach Herstellerangaben)	Induktion ≥ 3
Integrin αV	ITGAV	Extrazelluläre Matrix- und Zell-Adhäsion Integrin-Signalweg	3,1

### 3.3.2 Assay für EMT

Um die Hypothese zu überprüfen, dass EEC eine EMT eingehen können, wurde die Expression der im PCR Array detektierten Markergene für EMT auch in TGFβ1 und TGFβ3 behandelten EEC gemessen. Als Vergleich wurden auch Hec1B Zellen behandelt und untersucht.

Die mittels PCR Array ausgewählten Gene und KRT18 konnten auch im Assay für EMT durch eine Behandlung mit TGFβ3 in Hec1B Zellen induziert werden (s. Tabelle 7). MMP2, PLEK2, FN1 und VIM werden nach 48 h Behandlung mit TGFβ3 signifikant induziert. Wobei MMP2, wie im PCR Array, am stärksten induziert wird (Faktor: 72,3). Nach 96 h Behandlung mit TGFβ3 steigt die Expression der untersuchten Gene noch weiter an (signifikant zur Lösungsmittel-Kontrolle bei PLEK2, VIM und KRT18).

Mit TGFβ1 konnten ähnliche Ergebnisse bei den Hec1B Zellen erzielt werden, wie mit TGFβ3 (s. Tabelle 7). Alle untersuchten Gene werden durch die Behandlung induziert. Neben MMP2, PLEK2, FN1 und VIM werden weiterhin SERPINE1 und KRT7 nach 48 h signifikant induziert. Auch mit TGFβ1 wird die stärkste Induktion bei MMP2 erreicht (Faktor: 96,0). Nach 96 h Behandlung mit TGFβ1 steigt die Expression von den meisten untersuchten Genen weiter an. Leichte Expressionsabfälle wurden für PLEK2, SERPINE1 und KRT7 detektiert.

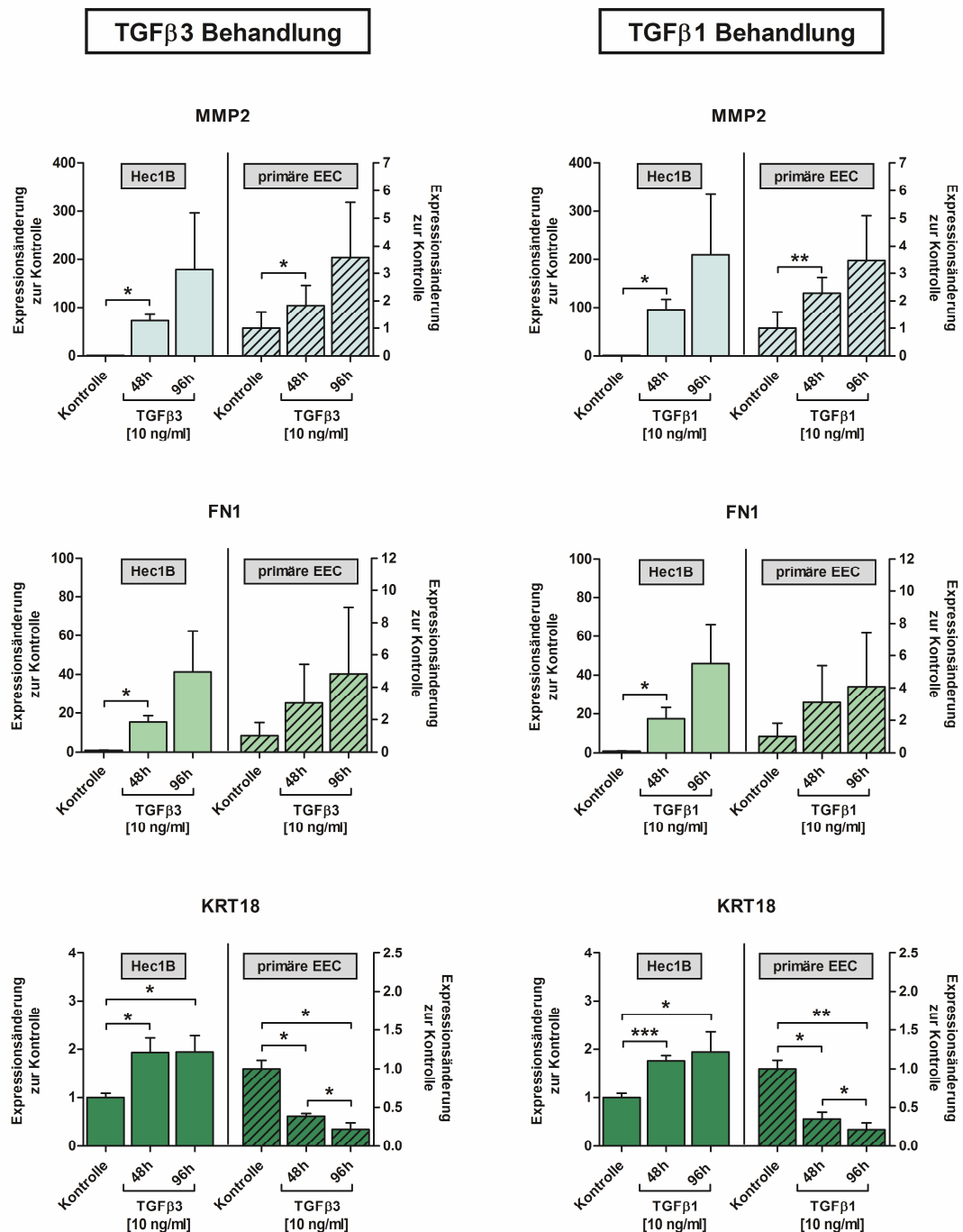
Im Vergleich zum EMT-Array werden nicht alle Gene um einen Faktor ≥ 3 induziert, da für diese Versuche ein kleineres *Well*-Format und eine andere PCR-Technik verwendet wurden.

Die Expressionänderung durch die Behandlung mit TGFβ1 oder 3 ist in den EEC sehr viel geringer als in den Hec1B Zellen. Vergleichbar zu den Hec1B Zellen werden in den EEC FN1, PLEK2, VIM und MMP2 induziert. Wobei in den

EEC nur FN1 und MMP2 nach 96 h Behandlung um einen Faktor  $\geq 3$  induziert werden. Allerdings ist die Induktion von FN1 durch große Standardabweichungen nicht signifikant. Die KRT18-Expression in den EEC wird durch die Behandlung mit TGF $\beta$ 3 und 1 an beiden Zeitpunkten signifikant herunterreguliert. Wobei man auch einen signifikanten Abfall zwischen 48 h und 96 h Behandlung detektieren kann.

Die alleinige Behandlung der Hec1B Zellen mit dem Lösungsmittel der TGFs führt nach 96 h zu einer signifikanten Induktion der VIM-Expression. In den EEC wird die PLEK2-Expression durch Behandlung mit dem Lösungsmittel der TGFs nach 96 h signifikant vermindert (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 21 ist exemplarisch die Expressionsänderung der Gene MMP2, FN1 und KRT18 durch TGF $\beta$ 3 oder TGF $\beta$ 1 in Hec1B und EEC dargestellt.



**Abbildung 21: Induktion der EMT durch TGFβ1 oder TGFβ3 in Hec1B und EEC.** Dargestellt sind exemplarisch die Gene MMP2, FN1 und KRT18. Die Expression der Gene wurde nach der Behandlung mit 10 ng/ml TGFβ1 oder TGFβ3 für 48 h oder 96 h mittels qPCR bestimmt. In den Hec1B Zellen führt sowohl TGFβ1 als auch TGFβ3 zur Induktion der Gene. In den EEC wird die Genexpression von MMP2 und FN1 durch TGFβ1 und TGFβ3 induziert. Die KRT18-Expression nimmt in den EEC durch die Behandlung ab. Alle Ergebnisse sind als mittlerer Faktor der Expressionsänderung zur Lösungsmittel-Kontrolle definiert als  $1 \pm \text{SD}$  dargestellt. Sowohl für die Hec1B als auch für die EEC wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dafür wurden EEC aus drei Patientinnen verwendet. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (t-Test).

Um zu untersuchen, ob die EMT durch BMP7 reversibel ist wurden Hec1B Zellen und EEC zunächst für 48 h mit 10 ng/ml TGF $\beta$ 1 oder TGF $\beta$ 3 behandelt und anschließend für 48 h mit BMP7 bzw. mit der Lösungsmittel-Kontrolle für BMP7. Anschließend wurde die Expression der EMT-Markergene gemessen. Die eingesetzte Konzentration für BMP7 waren 100 ng/ml, denn mit dieser Konzentration konnte in NMuMG Zellen ein Rückgang der EMT gezeigt werden (Zeisberg *et al.*, 2003).

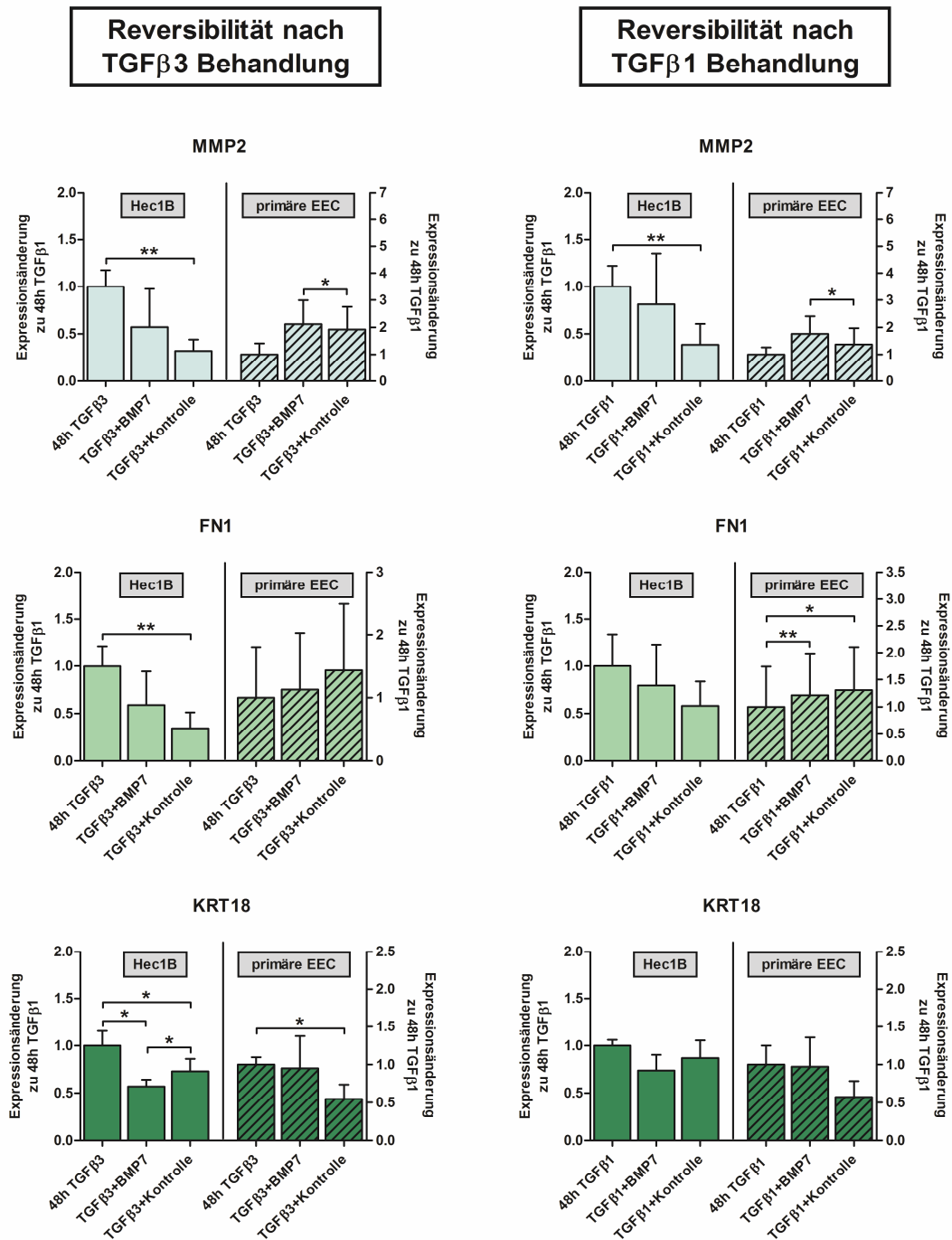
Ohne TGF $\beta$ 1 oder 3 Stimulus fällt die Expression der untersuchten Gene in den Hec1B Zellen ab (s. Tabelle 8). Bei vorheriger Behandlung mit TGF $\beta$ 1 kommt es bei ITGAV, ITGB1, KRT7, MMP2, PLEK2 und SERPINE1 zu einer signifikant niedrigeren Expression im Vergleich zu der Expression nach 48 h Behandlung mit TGF $\beta$ 1. Für TGF $\beta$ 3 ist diese Expressionsminderung bei FN1, MMP2, PLEK2, VIM und KRT18 signifikant. Durch die Behandlung mit BMP7 ist die Expression von deutlich weniger Genen signifikant vermindert. Bei vorheriger TGF $\beta$ 1 Behandlung sind dies KRT7, PLEK2 und SERPINE1 und bei vorheriger TGF $\beta$ 3 Behandlung sind es PLEK2, VIM und KRT18. Nach Vorbehandlung mit TGF $\beta$ 1 oder TGF $\beta$ 3 ist die Expression von SERPINE1, VIM und KRT18 in den BMP7 behandelten Zellen signifikant niedriger als bei der Lösungsmittel-Kontrolle von BMP7. Hier scheint BMP7 einen reversiblen Einfluss auf die Genexpression zu haben. In der TGF $\beta$ 3 Gruppe ist die Genexpression von PLEK2 und ITGAV in den BMP7 behandelten Zellen signifikant stärker als bei der Lösungsmittel-Kontrolle von BMP7. In der TGF $\beta$ 1 Gruppe sieht man die gleiche Tendenz. Dies spricht dafür, dass BMP7 die Reversibilität verlangsamt.

Bei den EEC steigt die Expression von FN1 und ITGB1 in der TGF $\beta$ 1 Gruppe und von TMEM132A in der TGF $\beta$ 3 Gruppe bei der Lösungsmittel-Kontrolle signifikant an. Die KRT18-Expression fällt durch die Behandlung mit der Lösungsmittel-Kontrolle von BMP7 in der TGF $\beta$ 3 Gruppe signifikant ab. Die Behandlung mit BMP7 führt in der TGF $\beta$ 1 Gruppe zu einer signifikanten Expressionssteigerung bei FN1 und ITGB1. Beim Vergleich zwischen BMP7 und seiner Lösungsmittel-Kontrolle fallen zwei Gene auf. Die SERPINE1-Expression wird in der TGF $\beta$ 3 Gruppe in BMP7 behandelten Zellen schwächer exprimiert als in Zellen, die die Lösungsmittel-Kontrolle erhielten.

Die MMP2-Expression ist in beiden Gruppen in BMP7 behandelten Zellen erhöht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Die alleinige Behandlung mit BMP7 führt in den Hec1B Zellen zu einer signifikanten Induktion der PLEK2-Expression und in den EEC zur signifikanten Induktion der VIM-Expression (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 22 ist exemplarisch das Ergebnis der Untersuchung auf Reversibilität durch BMP7 der Genexpressionsänderungen von MMP2, FN1 und KRT18 dargestellt.



**Abbildung 22: Testung auf Reversibilität der EMT durch BMP7 in Hec1B und EEC.** Dargestellt sind exemplarisch die Gene MMP2, FN1 und KRT18. Zunächst wurden die Zellen für 48 h mit 10 ng/ml TGFβ1 oder TGFβ3 behandelt um die EMT zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h mit 100 ng/ml BMP7 oder der Lösungsmittel-Kontrolle von BMP7 behandelt. Dann wurde die Genexpression mittels qPCR bestimmt. In den Hec1B Zellen ist die Induktion von MMP2 und FN1 reversibel. BMP7 scheint die Reversibilität zu verlangsamen. Die KRT18-Expression wird durch BMP7 stärker vermindert als durch die Kontrolle. In den EEC ist die durch TGFβ induzierte Genexpression von MMP2 und FN1 durch BMP7 oder die Kontrolle nicht reversibel. BMP7 kann die KRT18-Expression in EEC auf dem Level der TGFβ Behandlung halten. Alle Ergebnisse sind als mittlerer Faktor der Expressionsänderung zu 48 h Behandlung mit TGFβ1 oder TGFβ3 definiert als  $1 \pm SD$  dargestellt. Sowohl für die Hec1B als auch für die EEC wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dafür wurden EEC aus drei Patientinnen verwendet. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (t-Test).

Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass Hec1B und EEC Zellen einen EMT-ähnlichen Prozess durchlaufen können. Die Ergebnisse zur Reversibilität der EMT durch BMP7 sind nicht eindeutig.

**Tabelle 7: Übersicht über die Ergebnisse zur TGFβ1 oder TGFβ3 induzierten EMT in Hec1B und EEC.** Alle Ergebnisse sind als mittlerer Faktor der Expressionsänderung zur Lösungsmittel-Kontrolle (definiert als 1) ± SD dargestellt. Sowohl für die Hec1B als auch für die EEC wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dafür wurden EEC aus drei Patientinnen verwendet. a: p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle; b: p < 0,05, im Vergleich zu 48 h TGFβ1 oder 3; c: p < 0,01, im Vergleich zur Kontrolle; d: p < 0,01, im Vergleich zu 48 h TGFβ1 oder 3; e: p < 0,001, im Vergleich zur Kontrolle (t-Test).

Gene	Hec1B Zellen				EEC Zellen			
	TGFβ3 induzierte Expressionsänderung		TGFβ1 induzierte Expressionsänderung		TGFβ3 induzierte Expressionsänderung		TGFβ1 induzierte Expressionsänderung	
	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h
<b>MMP2</b>	72,3 (± 12,69) <sup>a</sup>	179,1 (± 117,27)	96,0 (± 21,25) <sup>a</sup>	209,7 (± 125,12)	1,8 (± 0,73) <sup>a</sup>	3,6 (± 2,00)	2,3 (± 0,57) <sup>c</sup>	3,5 (± 1,64)
<b>PLEK2</b>	42,1 (± 14,87) <sup>a</sup>	43,9 (± 29,50)	51,7 (± 15,16) <sup>a</sup>	40,5 (± 16,20)	2,5 (± 0,22) <sup>a</sup>	2,6 (± 0,42) <sup>a</sup>	2,8 (± 0,17) <sup>c</sup>	2,6 (± 0,22) <sup>c, d</sup>
<b>FN1</b>	15,3 (± 3,26) <sup>a</sup>	41,3 (± 21,18)	17,4 (± 5,88) <sup>a</sup>	46,0 (± 20,10)	3,0 (± 2,42)	4,8 (± 4,13)	3,1 (± 2,29)	4,1 (± 3,32)
<b>VIM</b>	4,8 (± 1,30) <sup>a</sup>	5,9 (± 2,06) <sup>a</sup>	5,2 (± 1,00) <sup>a</sup>	5,3 (± 0,30) <sup>c</sup>	1,8 (± 0,40) <sup>a</sup>	2,0 (± 0,40) <sup>a</sup>	2,0 (± 0,10) <sup>c</sup>	1,8 (± 0,38)
<b>SERPINE1</b>	4,8 (± 1,82)	5,9 (± 3,18)	4,5 (± 1,05) <sup>a</sup>	4,1 (± 0,71) <sup>a</sup>	1,4 (± 1,00)	0,8 (± 0,53)	1,9 (± 1,63)	0,7 (± 0,51)
<b>KRT7</b>	2,9 (± 1,21)	3,3 (± 1,28) <sup>b</sup>	3,1 (± 0,83) <sup>a</sup>	2,5 (± 0,75)	1,0 (± 0,81)	0,7 (± 0,75)	1,2 (± 0,93)	0,7 (± 0,64)
<b>TMEM132A</b>	2,7 (± 1,00)	3,2 (± 1,33)	2,5 (± 0,70)	3,3 (± 1,26)	1,1 (± 0,50)	2,1 (± 0,71)	1,2 (± 0,57)	1,9 (± 0,76)
<b>ITGAV</b>	2,5 (± 0,86)	2,8 (± 1,01)	2,5 (± 0,55) <sup>a</sup>	2,5 (± 0,75)	0,8 (± 0,45)	1,0 (± 0,77)	0,8 (± 0,45)	0,9 (± 0,56) <sup>a</sup>
<b>ITGB1</b>	2,2 (± 1,14)	2,3 (± 0,86)	1,9 (± 0,31)	2,2 (± 0,46)	1,2 (± 0,17)	1,6 (± 0,45)	1,2 (± 0,10)	1,4 (± 0,31)
<b>KRT18</b>	1,9 (± 0,30) <sup>a</sup>	1,9 (± 0,34) <sup>a</sup>	1,8 (± 0,11) <sup>e</sup>	1,9 (± 0,41) <sup>a</sup>	0,4 (± 0,04) <sup>a</sup>	0,2 (± 0,09) <sup>a, b</sup>	0,4 (± 0,09) <sup>a</sup>	0,2 (± 0,09) <sup>b, c</sup>

**Tabelle 8: Übersicht über die Ergebnisse zur Testung der Reversibilität der EMT durch BMP7 in Hec1B und EEC.** Alle Ergebnisse sind als mittlerer Faktor der Expressionsänderung zu 48 h Behandlung mit TGFβ1 oder TGFβ3 definiert als  $1 \pm \text{SD}$  dargestellt. Sowohl für die Hec1B als auch für die EEC wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dafür wurden EEC aus drei Patientinnen verwendet. a:  $p < 0,05$ , im Vergleich zu 48 h TGFβ1 oder 3; b:  $p < 0,05$ , im Vergleich zu TGFβ1 oder 3 + BMP7; c:  $p < 0,01$ , im Vergleich zu 48 h TGFβ1 oder 3; d:  $p < 0,01$ , im Vergleich zu TGFβ1 oder 3 + BMP7 (t-Test).

Gene	Hec1B Zellen				EEC Zellen			
	Expressionsänderung nach 48 h TGFβ3 und		Expressionsänderung nach 48 h TGFβ1 und		Expressionsänderung nach 48 h TGFβ3 und		Expressionsänderung nach 48 h TGFβ1 und	
	48 h BMP7	48 h Kontrolle	48 h BMP7	48 h Kontrolle	48 h BMP7	48 h Kontrolle	48 h BMP7	48 h Kontrolle
<b>MMP2</b>	0,6 ( $\pm$ 0,40)	0,3 ( $\pm$ 0,12) <sup>c</sup>	0,8 ( $\pm$ 0,54)	0,4 ( $\pm$ 0,22) <sup>c</sup>	2,1 ( $\pm$ 0,89)	1,9 ( $\pm$ 0,84) <sup>b</sup>	1,8 ( $\pm$ 0,66)	1,4 ( $\pm$ 0,60) <sup>b</sup>
<b>PLEK2</b>	0,2 ( $\pm$ 0,05) <sup>a</sup>	0,1 ( $\pm$ 0,03) <sup>a, b</sup>	0,3 ( $\pm$ 0,10) <sup>a</sup>	0,2 ( $\pm$ 0,06) <sup>a</sup>	1,3( $\pm$ 0,38)	1,2 ( $\pm$ 0,28)	1,2 ( $\pm$ 0,20)	1,0 ( $\pm$ 0,22)
<b>FN1</b>	0,6 ( $\pm$ 0,35)	0,3 ( $\pm$ 0,17) <sup>c</sup>	0,8 ( $\pm$ 0,44)	0,6 ( $\pm$ 0,26)	1,1 ( $\pm$ 0,90)	1,4 ( $\pm$ 1,06)	1,2 ( $\pm$ 0,77) <sup>c</sup>	1,3 ( $\pm$ 0,80) <sup>a</sup>
<b>VIM</b>	0,4 ( $\pm$ 0,21) <sup>a</sup>	0,5 ( $\pm$ 0,25) <sup>c</sup>	0,6 ( $\pm$ 0,02)	0,7 ( $\pm$ 0,01) <sup>b</sup>	0,9 ( $\pm$ 0,04)	1,1 ( $\pm$ 0,29)	0,9 ( $\pm$ 0,10)	1,0 ( $\pm$ 0,19)
<b>SERPINE1</b>	0,1 ( $\pm$ 0,04)	0,3 ( $\pm$ 0,02) <sup>b</sup>	0,2 ( $\pm$ 0,03) <sup>a</sup>	0,5 ( $\pm$ 0,07) <sup>a, b</sup>	0,3 ( $\pm$ 0,23)	0,5 ( $\pm$ 0,26) <sup>b</sup>	0,4 ( $\pm$ 0,24)	0,4 ( $\pm$ 0,23)
<b>KRT7</b>	0,6 ( $\pm$ 0,22)	0,6 ( $\pm$ 0,26)	0,5 ( $\pm$ 0,18) <sup>a</sup>	0,6 ( $\pm$ 0,16) <sup>a</sup>	0,6 ( $\pm$ 0,66)	0,7 ( $\pm$ 0,69)	0,6 ( $\pm$ 0,58)	0,6 ( $\pm$ 0,57)
<b>TMEM132A</b>	0,6 ( $\pm$ 0,11)	0,6 ( $\pm$ 0,25)	0,7 ( $\pm$ 0,27)	0,7 ( $\pm$ 0,30)	1,7 ( $\pm$ 0,76)	1,7 ( $\pm$ 0,52) <sup>a</sup>	1,7 ( $\pm$ 0,82)	1,7 ( $\pm$ 0,75)
<b>ITGAV</b>	0,6 ( $\pm$ 0,10)	0,5 ( $\pm$ 0,08) <sup>d</sup>	0,7 ( $\pm$ 0,10)	0,6 ( $\pm$ 0,07) <sup>a</sup>	1,2 ( $\pm$ 0,69)	1,1 ( $\pm$ 0,71)	1,2 ( $\pm$ 0,64)	1,1 ( $\pm$ 0,56)
<b>ITGB1</b>	0,5 ( $\pm$ 0,16)	0,5 ( $\pm$ 0,10)	0,7 ( $\pm$ 0,17)	0,7 ( $\pm$ 0,16) <sup>c</sup>	1,2 ( $\pm$ 0,25)	1,2 ( $\pm$ 0,19)	1,4 ( $\pm$ 0,13) <sup>a</sup>	1,2 ( $\pm$ 0,09) <sup>a</sup>
<b>KRT18</b>	0,6 ( $\pm$ 0,07) <sup>a</sup>	0,7 ( $\pm$ 0,13) <sup>a, b</sup>	0,7 ( $\pm$ 0,17)	0,9 ( $\pm$ 0,19)	1,0 ( $\pm$ 0,42)	0,5 ( $\pm$ 0,19) <sup>a</sup>	1,0 ( $\pm$ 0,39)	0,6 ( $\pm$ 0,21)

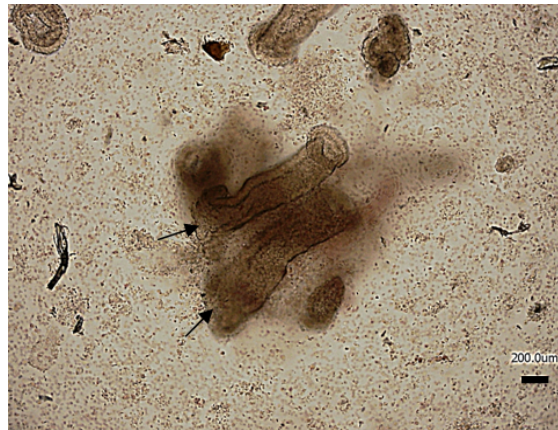
### 3.4 Dreidimensionales Zellkulturmodell

Es gibt viele Hinweise, dass Veränderungen des eutopen Endometriums eine Rolle bei der Entstehung der Endometriose spielen (vgl. 1.2.2). Um dies genauer untersuchen zu können wird ein Modell für humanes Endometrium benötigt, indem die parakrinen Wechselwirkungen zwischen ESC und EEC untersucht werden können. Dies ist in der Primärzellkultur nicht möglich. Des Weiteren ist es wichtig, dass die Zellen auch über eine längere Kulturdauer hormonresponsiv reagieren. Dies ist vor allem bei Primärzellkulturen epithelialer Zellen nicht der Fall (Kirk und Irwin, 1980; Alkhalaf *et al.*, 1991). Gründe für den Verlust der Hormonresponsivität sind zum einen der Verlust der Zell-Matrix-Interaktionen und zum anderen der Verlust des Kontaktes zwischen EEC und ESC (Li *et al.*, 1987; Mulholland *et al.*, 1988).

Ein Beispiel für ein *in vitro* Modell sind Explant-Kulturen. Bei dieser Kultivierungsart bleibt die Gewebeintegrität erhalten. Das Modell wurde schon von einigen Gruppen verwendet um verschiedene Effekte zu untersuchen (Illouz *et al.*, 2000; Fasciani *et al.*, 2003; Esfandiari *et al.*, 2007). Allerdings ist es nicht möglich, die parakrinen Beziehungen zwischen ESC und epithelialen Drüsen in diesem Modell zu untersuchen. Daher wurde versucht die vereinzelt Epithel- und Stromazellen räumlich getrennt voneinander zu kultivieren. Dazu wurden Epithelzellen als Monolayer auf Matrigel in einem Inlay über Stromazellen kultiviert, die entweder auf dem Plastik wuchsen oder eingebettet in eine Extrazellulärmatrix (Classen-Linke *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 2001; Pierro *et al.*, 2001). In solchen Modellen konnte gezeigt werden, dass Östrogen nur einen proliferativen Effekt auf die EEC ausübte, wenn diese zusammen mit darunter liegenden ESC kultiviert werden (Pierro *et al.*, 2001).

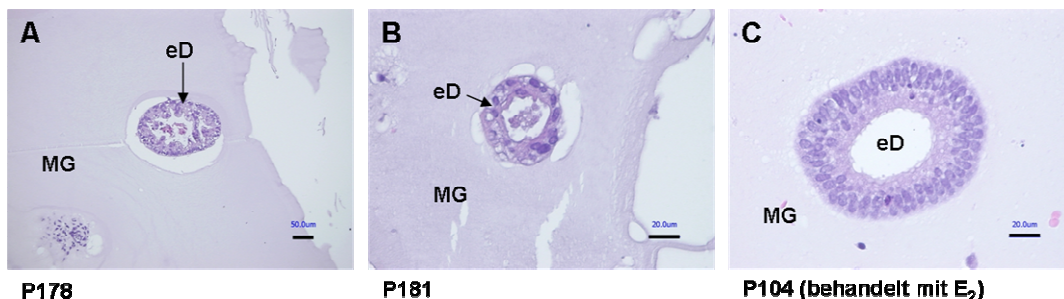
Um die parakrinen Beziehungen zwischen hormonresponsiven EEC und ESC untersuchen zu können, wurde für diese Arbeit ein dreidimensionales Zellkulturmodell nach Bläuer *et al.* etabliert und weiter optimiert. In diesem Modell werden die epithelialen Drüsen in Matrigel in einem Insert über den Stromazellen kultiviert (s. 2.2.6, Abbildung 7) (Bläuer *et al.*, 2005).

Hierzu wurde humanes Endometrium in einer Kollagenase-Lösung verdaut. Während des Verdauens werden ESC zu Einzelzellen verdaut und die epithelialen Drüsen bleiben erhalten (Abbildung 23).



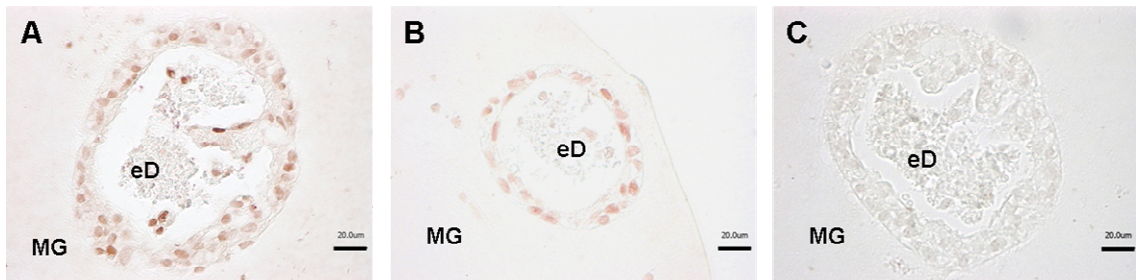
**Abbildung 23: Isolation von epithelialen Drüsen durch einen Verdau des Endometriums.** Während des Verdauens mit Kollagenase I lösen sich die epithelialen Drüsen und die Stromazellen aus dem Gewebeverband des Endometriums. Die ESC werden zu Einzelzellen verdaut und die epithelialen Drüsen bleiben erhalten. Die Pfeile zeigen epitheliale Drüsen, die noch von Gewebe umgeben sind.

Auch während der Kultivierung in Matrigel bleiben die Drüsen erhalten. Dies kann man an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten der in Matrigel eingebetteten Drüsen nach unterschiedlicher Kulturdauer erkennen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte von endometrialen Drüsen in Matrigel nach unterschiedlicher Kulturdauer.** Nach drei Tagen in dreidimensionaler Kultur mit Wachstumsmedium (A, B). Nach sechs Tagen in Kultur mit Testmedium (10 % steroidhormonfreies FCS) und 10 nmol/l  $E_2$  (C). Maßstabsbalken A = 50  $\mu\text{m}$ , B und C = 20  $\mu\text{m}$ . eD, epitheliale Drüsen; MG, Matrigel.

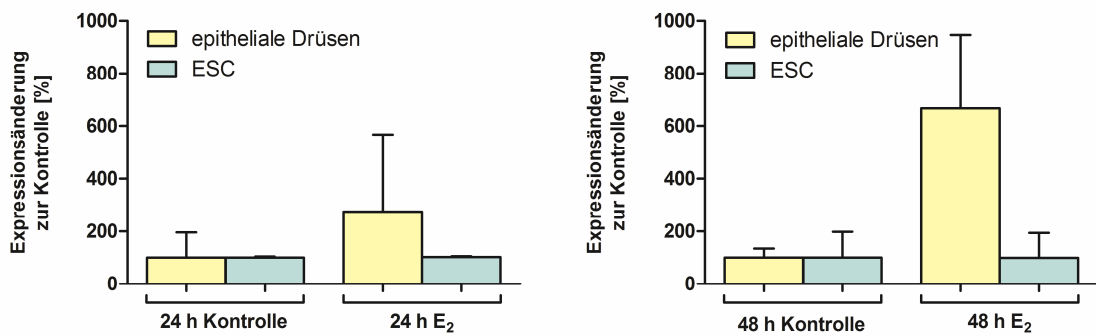
Immunhistochemisch lassen sich auch die Hormonrezeptoren für Progesteron und Östrogen in den Drüsen nach 7 Tagen in Kultur nachweisen (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Immunhistochemische Untersuchung der epithelialen Drüsen in Matrigel.** Epitheliale Drüsen wurden für sieben Tage im dreidimensionalen Zellkulturmodell kultiviert. (A) Nachweis des PR in epithelialen Drüsen durch rote Färbung der Zellkerne. (B) Nachweis des ER durch positive rot-gefärbte Zellkerne in epithelialen Drüsen. (C) Negativ-Kontrolle (nur mit Antikörper-Diluent inkubiert). eD, epitheliale Drüsen; MG, Matrigel.

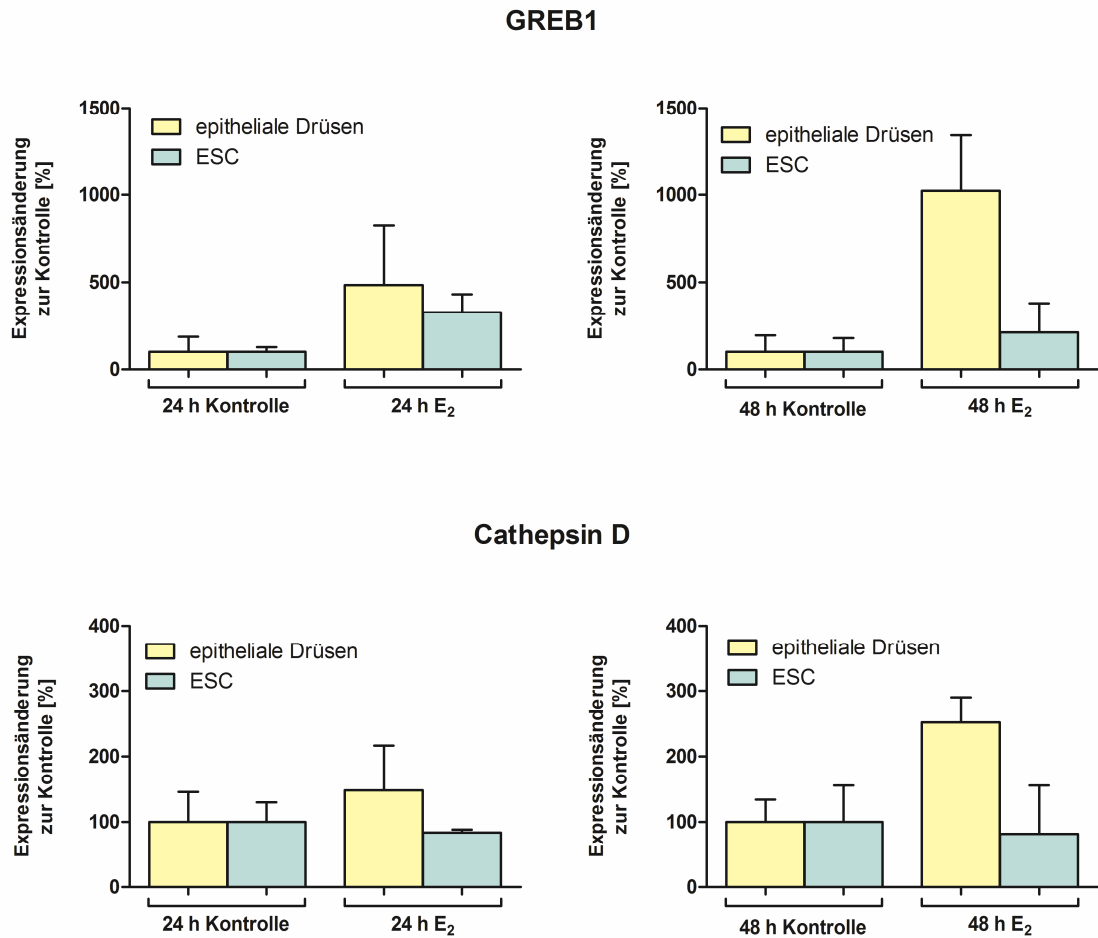
Um zu testen, ob die Zellen noch hormonresponsiv sind wurden die dreidimensionalen Kulturen für 24 und 48 h mit  $E_2$  in Testmedium (5 % steroidhormonfreies FCS) behandelt.  $E_2$  wurde in der in der Literatur beschriebenen Standardkonzentration von 10 nmol/l eingesetzt (Classen-Linke *et al.*, 1996; Pierro *et al.*, 2001; Bläuer *et al.*, 2005). Mittels qPCR wurde die Expression des PR nach der Behandlung untersucht. Wie man in Abbildung 26 sehen kann, wird PR stärker in epithelialen Drüsen exprimiert, die mit  $E_2$  behandelt wurden. Die PR-Expression unter  $E_2$ -Behandlung steigt über die Zeit an. In den ESC hat die Behandlung keinen Einfluss auf die PR-Expression.

## Progesteronrezeptor



**Abbildung 26: Effekte der Östrogenbehandlung auf die Expression des PR im dreidimensionalen Zellkulturmodell.** Nach 24 h Kultur wurden die Zellen für 24 und 48 h mit 10 nmol/l E<sub>2</sub> in Testmedium mit 5 % steroidhormonfreiem FCS behandelt. Anschließend wurde die Expression des PR mittels qPCR bestimmt. In den behandelten epithelialen Drüsen wird der PR stärker exprimiert als in den epithelialen Drüsen, die mit der Lösungsmittel-Kontrolle behandelt wurden. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Expressionsänderung zur Kontrolle definiert als 100 % ± SD. In zwei unabhängigen Versuchen wurden epitheliale Drüsen und ESC aus zwei Patientinnen verwendet.

Auch die östrogenresponsiven Gene *growth regulation by estrogen in breast cancer 1* (GREB1) und Cathepsin D (CTSD) konnten in diesem dreidimensionalen Zellkulturmodell durch eine Behandlung mit E<sub>2</sub> induziert werden.



**Abbildung 27: Induktion östrogenresponsiver Gene im dreidimensionalen Zellkulturmodell.** Nach 24 h Kultur wurden die Zellen für 24 und 48 h mit 10 nmol/l E<sub>2</sub> in Testmedium mit 5 % steroidhormonfreiem FCS behandelt. Anschließend wurde die Expression der Gene mittels qPCR bestimmt. Nach 48 h Behandlung mit E<sub>2</sub> wird GREB1 in epithelialen Drüsenzellen induziert. Auch Cathepsin D zeigt nach 48 h Behandlung mit E<sub>2</sub> eine leichte Induktion in den epithelialen Drüsenzellen. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Expressionsänderung zur Kontrolle definiert als 100 % ± SD. In zwei unabhängigen Versuchen wurden epitheliale Drüsen und ESC aus zwei Patientinnen verwendet.

Auch nach 7 Tagen Kultur konnten in diesem dreidimensionalen Modell die Hormonrezeptoren für Progesteron und Östrogen noch nachgewiesen werden. Weiterhin konnten zum ersten Mal in solch einem dreidimensionalen Modell östrogenresponsive Gene durch E<sub>2</sub> induziert werden.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob das BMP-Signaling bei der Entstehung und Persistenz der Endometriose eine Rolle spielt. Nachdem hier erstmals gezeigt werden konnte, dass alle untersuchten Komponenten der BMP-Signalkaskade im eutopen Endometrium, in ovariellen Zysten und in peritonealen Läsionen exprimiert sind (s. 3.1.1) und dass in diesen Geweben ein funktionelles BMP-Signalling stattfindet (s. 3.1.2), wurde zunächst untersucht welche Auswirkungen die BMPs auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen (ESC) *in vitro* haben und ob endometriale Epithelzellen unter dem Einfluss eines geeigneten Stimulus eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen. Anhand der Ergebnisse wurden Schlüsse zur Rolle des BMP-Signalings bei Endometriose gezogen.

### 4.1 Verminderte IGFBP1-Expression durch BMP2 und BMP7 während der Dezidualisierung

Da das Endometrium ein sehr dynamisches Gewebe ist, ändert sich auch die Expression von vielen Molekülen im Endometrium zeitlich und räumlich. Gene, deren Expression sich in der mittleren sekretorischen Phase ändert, spielen vermutlich eine Rolle bei der Vorbereitung des Endometriums auf die Einnistung einer befruchteten Eizelle, also bei der Dezidualisierung der Stromazellen (ESC). Daher war der erste Hinweis für eine Beteiligung von BMP7 an der Dezidualisierung die zyklische Expressionsänderung im Endometrium. BMP7 ist im proliferativen Endometrium stärker exprimiert als im sekretorischen Endometrium (s. 3.1.1, Abbildung 8). Dieser Abfall der Genexpression von BMP7 in der sekretorischen Phase wurde gleichzeitig publiziert (Kodama *et al.*, 2010). Immunhistochemisch konnte im Rahmen dieser Arbeit erneut gezeigt werden, dass BMP7 während des Zyklus im Endometrium unterschiedlich lokalisiert ist. In der proliferativen Phase ist BMP7 in Drüsen und ESC zu detektieren, in der sekretorischen Phase nur in ESC (s. 3.1.3, Abbildung 11) (Stoikos *et al.*, 2008). Die Schlussfolgerung, die auch Kodama *et al.* und Stoikes *et al.*, aus diesen Daten ziehen, ist, dass BMP7 eine

Rolle bei der Entwicklung eines empfängnisbereiten Endometriums spielt (Stoikos *et al.*, 2008; Kodama *et al.*, 2010). Die BMP2-Expression im humanen Endometrium unterscheidet sich nicht signifikant in der proliferativen und der sekretorischen Phase. Trotzdem besteht die Vermutung, dass BMP2 beim Menschen eine Rolle bei der Dezidualisierung spielt. BMP2 zeigt in humanem Endometrium die stärkste immunhistochemische Färbung in dezidualisierten ESC (Stoikos *et al.*, 2008). Ein konditionaler Knockout von BMP2 im Uterus von Mäusen führt dazu, dass die Dezidualisierungsreaktion gestört ist (Lee *et al.*, 2007). Somit scheint BMP2 ein wichtiger Mediator für die Dezidualisierung bei Mäusen und Menschen zu sein (s. auch 1.4.3).

Für die *in vitro* Dezidualisierungsassays wurden ESC aus humanem Endometrium isoliert. Dies ist von großer Bedeutung, denn es gibt Spezies-spezifische Unterschiede bei der Dezidualisierung. Ein gravierender Unterschied ist, dass beim Menschen in jedem Zyklus eine Dezidualisierung stattfindet. Bei Nagern dagegen wird die Dezidualisierung nur beim Vorhandensein einer befruchteten Eizelle eingeleitet (s. auch 1.1.2).

Für BMP7 konnte gezeigt werden, dass es im uterinen Epithel von Mäusen und Ratten exprimiert ist, ohne dass es, wie beim Menschen, zu einer Veränderung des Expressionmusters während des Zyklus kommt (Ozkaynak *et al.*, 1997; Erickson *et al.*, 2004). In Uteri von Mäusen wird die BMP7-Expression im Gegensatz zum Menschen durch eine Behandlung mit Östrogen vermindert, nicht aber durch die Behandlung mit Progesteron (Ozkaynak *et al.*, 1997). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass dieser Spezies-spezifische Unterschied in der Expression ein Indiz für eine teilweise unterschiedliche Funktion von BMP7 in Nagern und Menschen ist. Auch bei der BMP2-Expression gibt es Spezies-spezifische Unterschiede. In Rattenuteri konnten nämlich Expressionsunterschiede zwischen den Zyklusphasen detektiert werden (Erickson *et al.*, 2004). Weitere Spezies-spezifische Expressionsunterschiede konnten für die BMP-Rezeptoren detektiert werden. Sie werden im Rattenuterus zyklisch unterschiedlich exprimiert (Erickson *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Genexpression der drei untersuchten Rezeptoren im eutopen humanen Endometrium nachgewiesen

werden, die nicht zyklisch abhängig ist. Aufgrund dieser Unterschiede ist es wichtig die Dezidualisierung an humanem Material durchzuführen.

Um die Funktion der BMPs während der Dezidualisierung genauer untersuchen zu können, wurden humane ESC mittels cAMP *in vitro* dezidualisiert. Eine cAMP-abhängige *in vitro* Dezidualisierung konnte durch die Analyse der Veränderung der Zellmorphologie und durch Detektion der Dezidualisierungsmarker PRL, IGFBP1, FOXO1 und SPP1 nachgewiesen werden (s. 3.2.1). Die Expression von PRL, IGFBP1 und FOXO1 in den dezidualisierten ESC ist an Tag 3 am stärksten und nimmt bis zu Tag 14 ab. Dieser Abfall entspricht den Literaturdaten zur *in vitro* Dezidualisierung mit cAMP (vgl. 1.1.2). Durch die Dezidualisierung kommt es zu einer signifikanten Induktion der Genexpression von BMP2 und BMP4 in den ESC an Tag 5. BMP7 konnte in den ESC nicht nachgewiesen werden. BMP6 zeigt keine signifikanten Veränderungen durch die Dezidualisierung. Tendenziell ist BMP6 in dezidualisierten Zellen schwächer exprimiert (s. 3.2.2, Abbildung 16). Ein signifikanter Anstieg der BMP2-Expression durch die *in vitro* Dezidualisierung wurde bereits publiziert (Li *et al.*, 2007; Stoikos *et al.*, 2008).

Die in der Literatur beschriebene Expression von BMP7 während der *in vitro* Dezidualisierung konnte mit dem in dieser Arbeit gewählten experimentellen Ansatz nicht bestätigt werden. Dabei kann es nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in den primären Zellen und/oder Versuchsbedingungen zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben. Aufgrund des Expressionsunterschiedes von BMP7 zwischen proliferativem und sekretorischem Endometrium, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass BMP7 eine Funktion im Endometrium hat.

Einen leichten Anstieg der BMP4 Sekretion während der Dezidualisierung und die immunhistochemische Lokalisation von BMP4 im Cytoplasma von ESC in sekretorischem Endometrium konnte bereits nachgewiesen werden (Stoikos *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Daten teilweise bestätigt und erstmalig ein statistisch signifikanter Anstieg der BMP4-Expression während der Dezidualisierung nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Beteiligung von

BMP4 an parakrinen oder autokrinen Mechanismen während der Dezidualisierung. Allerdings konnte BMP4 in schwangeren Mäusen (Ying und Zhao, 2000) und im Rattenuterus nur in Endothelzellen von Gefäßen nachgewiesen werden. BMP4 scheint also Spezies-spezifisch exprimiert zu sein.

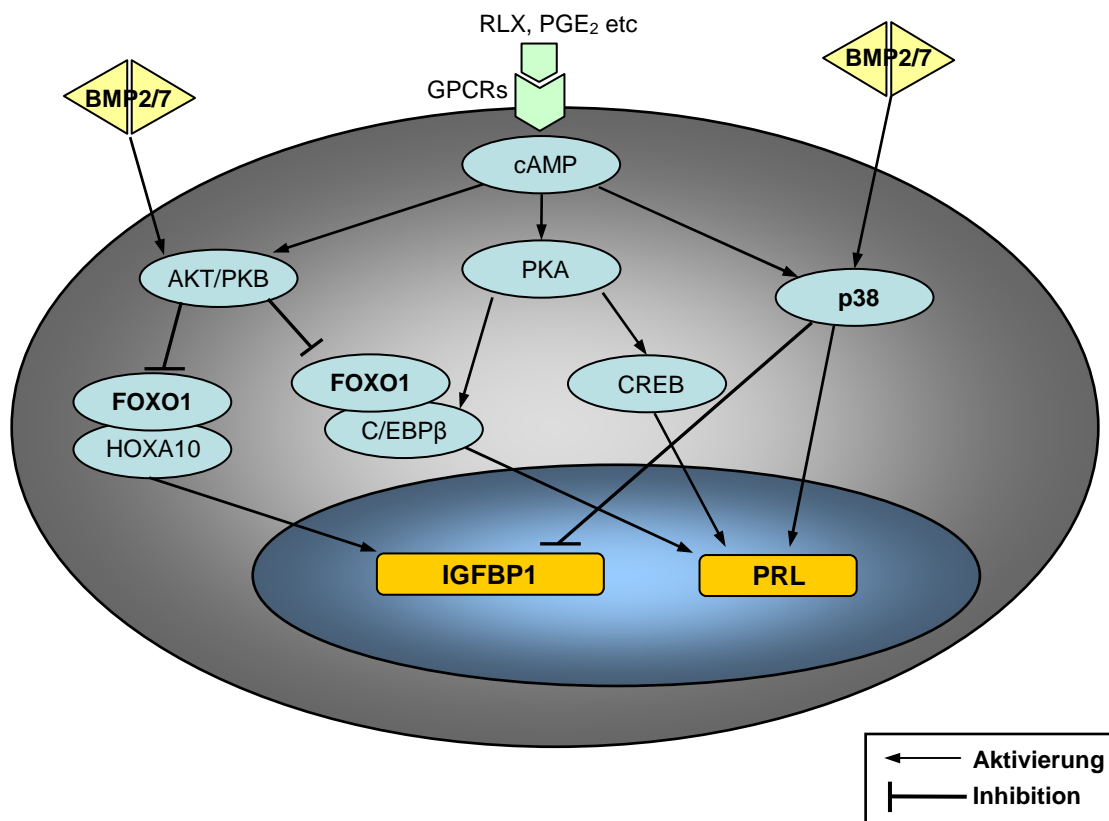
In weiteren Versuchen wurde untersucht welchen Einfluss die Zugabe der BMPs auf die Dezidualisierung hat. Bisher wurde vermutete, dass BMP2 die Dezidualisierung fördert (Stoikos *et al.*, 2008) und BMP7 die Dezidualisierung vermindert (Kodama *et al.*, 2010). Die Vermutung, dass BMP2 die Dezidualisierung fördert, basiert auf der Beobachtung, dass ESC, die für 8 Tage mit Östrogen und Progesteron dezidualisiert und zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen an BMP2 behandelt wurden, mehr PRL sekretieren, als ESC die nur mit Östrogen und Progesteron behandelt wurden (Stoikos *et al.*, 2008). Die stärkste PRL Sekretion konnte mit 50 ng/ml BMP2 erreicht werden. Kodama *et al.* dagegen konnte gleichzeitig zu den Ergebnissen in dieser Arbeit zeigen, dass IGFBP1 während der *in vitro* Dezidualisierung mit Östrogen und Progesteron und verschiedenen Konzentrationen von BMP7 nach 12 Tagen Behandlung vermindert exprimiert sowie sekretiert wird (Kodama *et al.*, 2010). Bei den meisten dieser Experimente wurde aber jeweils nur einer der Dezidualisierungsmarker untersucht. Nur Li *et al.* untersuchte die Expression von PRL und IGFBP1. Durch die Zugabe von 100 ng/ml BMP2 während der Dezidualisierung konnte bei diesen Experimenten nicht nur die PRL-Expression weiter induziert werden sondern auch die IGFBP1-Expression (Li *et al.*, 2007). Diese Daten wurden aber nicht weiter berücksichtigt, da die Herkunft der verwendeten humanen Zellen nicht eindeutig definiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Zugabe von BMP2 und BMP7 während der Dezidualisierung zu einer verstärkten Expression von PRL und FOXO1 führt. Die IGFBP1-Expression hingegen wird durch die Zugabe von BMP2 und BMP7 signifikant vermindert (s. 3.2.3, Abbildung 17). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BMP4 und BMP6 keinen Einfluss auf die IGFBP1-Expression haben (s. 3.2.3, Abbildung 18). Die

SPP1-Expression fällt tendenziell durch die Zugabe der BMPs leicht, jedoch nicht signifikant, ab (s. 3.2.3, Abbildung 17). Die Zugabe der verschiedenen BMPs während der Dezidualisierung führte nicht zu morphologischen Unterschieden der dezidualisierten ESC. Daher lässt sich nicht von einer verstärkten oder verminderten Dezidualisierung sprechen. Die verminderte IGFBP1-Expression könnte bei der Trophoblasteninvasion einer befruchteten Eizelle ins dezidualisierte Endometrium eine Rolle spielen. Die Invasion der Trophoblasten, um an maternale Blutgefäße zu gelangen, ist ein komplexer Prozess. Trophoblasten müssen an die extrazelluläre Matrix des dezidualisierten Endometriums adhären und sie anschließend proteolysieren. Dafür exprimieren Trophoblasten z.B. IGF-II und MMPs. Über Faktoren, die von dezidualisierten ESC sekretiert werden, wie z.B. IGFBP1 und TIMPs, wird die Invasion der Trophoblasten kontrolliert. IGF-II interagiert mit dezidualem IGFBP1. Durch die Bindung wird IGF-II inhibiert. Eine IGF-II Überexpression führt zu Tumorigenese und anti-Apoptose. Hohe Konzentrationen von IGFBP1 aus dem dezidualisierten Endometrium könnten allerdings die Rezeptivität des Endometriums senken (als Review s. Fowler *et al.*, 2000). IGF-II kann wiederum die IGFBP1-Expression in ESC inhibieren (Irwin *et al.*, 2001). Die, durch eine Behandlung mit BMP2 oder BMP7 verminderte IGFBP1-Expression während der Dezidualisierung, könnte somit zur Entwicklung der Mikroumgebung an der Grenzfläche zwischen Trophoblast und Dezidua beitragen. Ob sich die verminderte IGFBP1-Expression positiv oder negativ auf die Invasion der Trophoblasten und somit auf die Infertilität auswirkt muss im Vergleich mit Zellen von gesunden Frauen weiter untersucht werden.

#### 4.1.1 Mögliche Signalwege zur Regulation der Expression von PRL und IGFBP1

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zur Funktion von BMP2 und BMP7 erweitern das bisherige Verständnis zur BMP-abhängigen Differenzierungs- und Signalkaskade während der Dezidualisierung. PRL und IGFBP1 werden durch die BMPs unterschiedlich reguliert. In Abbildung 28 sind schematisch die möglichen Signalwege dargestellt, die in einer differenzierten Regulation der Genexpression von PRL und IGFBP1 während der Dezidualisierung involviert sein könnten.



**Abbildung 28: Mögliche Signalwege zur Regulation von PRL und IGFBP1 durch BMP2 und BMP7 während der Dezidualisierung.** BMP2, BMP7 und cAMP aktivieren die Proteinkinase B (AKT/PKB), diese inhibiert FOXO1 und somit auch die Expression von IGFBP1 und PRL. Die PRL-Expression wird aber auch durch CREB induziert, welches von PKA aktiviert wird. Die PRL-Expression könnte trotz der cAMP-Inhibition weiter gesteigert werden, denn BMP2 und BMP7 aktivieren p38, welches PRL unabhängig von cAMP, induzieren kann. IGFBP1 könnte durch p38 inhibiert werden.

Die PRL-Expression wird über drei mögliche Signalwege induziert.

Erstens kann die PRL-Expression über FOXO1 reguliert werden. Die intrazellulär erhöhten cAMP-Level während der Dezidualisierung führen zu einer Aktivierung des PKA-Signalwegs. Dies führt zur Expression von PRL (Telgmann und Gellersen, 1998). Mediatoren dieses Prozesses sind FOXO1 und *CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$*  (C/EBP $\beta$ ). Beide werden im sekretorischen Endometrium stärker exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass FOXO1 an C/EBP $\beta$  binden kann und beide funktional kooperieren um die PRL-Expression zu induzieren (Christian *et al.*, 2002). Wie in der Einleitung schon beschrieben ist FOXO1 eins der ersten und stärksten induzierten Gene bei der Dezidualisierung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion von FOXO1 an Tag 3 am stärksten ist (s. 3.2.1, Abbildung 12). FOXO1 ist im humanen Endometrium und im Endometrium von Pavianen exprimiert (Christian *et al.*, 2002; Kim und Fazleabas, 2004). In der sekretorischen Phase des Zyklus und während der Schwangerschaft ist die FOXO1-Expression hochreguliert. Es muss aber auch FOXO1-unabhängige Mechanismen geben, die zur PRL Induktion beitragen, denn durch einen siRNA-knockout von FOXO1 während der *in vitro* Dezidualisierung wurde die PRL-Expression nicht vermindert (Buzio *et al.*, 2006). Daher ist ein zweiter möglicher Signalweg über den die PRL-Expression verstärkt wird, die Phosphorylierung nukleärer Proteine durch die PKA, wie z.B. das *cyclic AMP responsive element-binding protein* (CREB) (Gerlo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Auf dem PRL Promotor gibt es eine imperfekte CRE-Position, an die CREB binden kann und so die Expression von PRL induziert (Gerlo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Ein dritter Signalweg zur Induktion von PRL könnte über die Map Kinase p38, unabhängig von FOXO1 und PKA, verlaufen. Für BMP2 und BMP4 konnte gezeigt werden, dass sie über die Map Kinase Kinase TAK1 und das *Tak binding protein 1* (TAB1) die Map Kinase p38 aktivieren können (als Review s. Nohe *et al.*, 2004). Auch für den BMP2 regulierten Umbau des Aktin-Zytoskeletts für die Zellmigration in mesenchymalen Zellen ist eine Aktivierung von p38 notwendig (Gamell *et al.*, 2011). Ein Umbau des Zytoskeletts findet auch bei der Dezidualisierung der ESC statt. Da BMP2 und BMP7 identische Rezeptoren nutzen können ist es wahrscheinlich, dass auch BMP7 diesen

Signalweg induzieren kann. Eine Aktivierung von p38 durch BMPs kann in der eosinophilen Zelllinie Eo1-1 zu einer Erhöhung der PRL-Expression führen (Gerlo *et al.*, 2005). Gerlo *et al.* konnte zeigen, dass die alleinige Aktivierung von p38, unabhängig von PKA, nicht ausreicht um die PRL-Expression zu induzieren. Die Gruppe vermutet aber, dass dieser Signalweg die PRL-Expression, im Vergleich zur alleinigen Induktion mit cAMP, noch verstärken kann. Somit könnte die Aktivierung von p38 durch BMP2 oder BMP7, die erhöhte Expression von PRL während der Dezidualisierung mit cAMP erklären.

Die Aktivierung der IGFBP1-Expression während der Dezidualisierung verläuft über cAMP und FOXO1. Die Inhibierung der IGFBP1-Expression durch BMP2 und BMP7 könnte über die AKT/PKB oder über die Map Kinase p38 erfolgen.

Während der Dezidualisierung kann FOXO1, neben der PRL-Expression, auch die IGFBP1-Expression induzieren (Kim und Fazleabas, 2004). In ESC aus Pavianen interagiert FOXO1 mit dem nukleären Transkriptionsfaktor HOXA10, wodurch die IGFBP1-Expression während der Dezidualisierung gesteigert wird (Kim und Fazleabas, 2004; Monsalve und Olmos, 2011). In humanen ESC konnte eine Interaktion von HOXA10 mit dem IGFBP1-Promotor und eine verstärkte IGFBP1 Promotoraktivität nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2002). FOXO1 scheint ein Schlüssel-Molekül für die Expressionsregulation von IGFBP1 zu sein. Eine Überexpression von FOXO1 in ESC führt auch ohne einen Induktor für die Dezidualisierung zu einer verstärkten IGFBP1-Expression und ein siRNA-Knockout von FOXO1 unter Behandlung mit Hormonen und cAMP führt zu einem Abfall der IGFBP1-Expression (Buzzio *et al.*, 2006). Ein wichtiger Faktor für die Aktivität von FOXO1 ist seine Lokalisation. *In vitro* induziert cAMP die FOXO1-Expression in ESC (s. 3.2.1, Abbildung 12, (Christian *et al.*, 2002; Gellersen und Brosens, 2003)). Entsprechend dazu konnte eine Akkumulation von FOXO1 in Kernen dezidualisierter Stromazellen *in vivo* nachgewiesen werden (Gellersen und Brosens, 2003).

In osteogenen Zellen konnte die Aktivierung der AKT/PKB durch BMP2 gezeigt werden (Ghosh-Choudhury *et al.*, 2002). Die AKT/PKB kann FOXO1 durch

Phosphorylierung inaktivieren. Die Phosphorylierung von FOXO1 durch AKT/PKB führt zu einem Export von FOXO1 aus dem Nukleus (Maruyama und Yoshimura, 2008; Monsalve und Olmos, 2011), wodurch die aktivierende Funktion von FOXO1 verloren geht. Das heißt, dass die BMPs über die AKT/PKB FOXO1 inhibieren. Dadurch kann die IGFBP1-Expression vermindert werden. Dies legt allerdings die Vermutung nahe, dass das AKT/PKB Signaling normalerweise während der Dezidualisierung supprimiert ist. In früheren Arbeiten konnte auch eine Hypophosphorylierung der AKT/PKB in dezidualisierten ESC *in vitro* nachgewiesen werden (Yoshino *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist phosphorylierte AKT/PKB in dezidualen ESC *in vivo* stark exprimiert (Toyofuku *et al.*, 2006). *In vivo* sind wahrscheinlich weitere Wachstumsfaktoren (wie z.B. IGF-I) involviert, die die AKT/PKB über PI3K aktivieren. Im *in vitro* System, das im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, wird die AKT/PKB wahrscheinlich von BMP2 und 7 aktiviert. In weiteren Versuchen sollte mittels Immunfluoreszenz die Translokation von AKT/PKB und FOXO1 in den Kern der ESC überprüft werden.

Die Aktivierung von p38 durch BMP2 und BMP7 könnte die IGFBP1-Expression während der Dezidualisierung vermindern. Die Map Kinase p38 kann, neben BMP2 und BMP7, auch durch IL1 $\beta$  aktiviert werden (Strakova *et al.*, 2000). Strakova *et al.* konnte zeigen, dass beide, cAMP und IL1 $\beta$ , in Gegenwart von Hormonen die IGFBP1-Expression in ESC induzieren kann. Bei einer Behandlung mit IL1 $\beta$ , cAMP und Hormonen dagegen, wird die IGFBP1-Expression in ESC von Primaten und Menschen um 74 % vermindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dezidualisierung mit cAMP induziert. Die Zellen wurden dabei in normalem FCS kultiviert. Somit waren vermutlich auch geringe Mengen an Hormonen vorhanden. Es besteht also die Vermutung, dass BMP2 und BMP7, ähnlich wie IL1 $\beta$ , zusammen mit cAMP und Hormonen eine inhibierende Wirkung auf die IGFBP1-Expression haben.

## 4.2 Dezidualisierungskapazität von endometrialen Läsionen

Es ist bekannt, dass ESC von endometrialen Läsionen eine verringerte Dezidualisierungskapazität haben (vgl. 1.2.2.2). Es wird spekuliert, dass die verringerte Dezidualisierungskapazität mit einer erhöhten Überlebensfähigkeit und verstärkter Proliferation der ESC in Läsionen assoziiert ist (Klemmt *et al.*, 2006). Die Expressionsunterschiede zwischen Endometrium und endometrialen Läsionen, die mittels der Genexpressionsanalyse festgestellt werden konnten, lassen vermuten, dass das BMP-Signaling bei Endometriose anders reguliert ist als im eutopen Endometrium. Ob die veränderte Expression der BMP-Komponenten für die verringerte Dezidualisierungskapazität der Läsionen auch eine Rolle spielt, ist aufgrund der Expressionsdaten nicht eindeutig zu zeigen.

Auffällig ist, dass der BMPR2 unabhängig von der Zyklusphase in beiden untersuchten Läsionsarten und der BMPR1A in den proliferativen Zysten erhöht ist, jedoch für den BMPR1B keine signifikanten Änderungen in der Genexpression in den Läsionen detektiert. Laut Literatur ist BMPR1B aber essentiell für die Dezidualisierung (Yi *et al.*, 2001). Eine im Verhältnis zu BMPR1B erhöhte Expression von BMPR1A könnte zu einer verminderten Dezidualisierungskapazität beitragen.

Wie unter 4.1 beschrieben fördern BMP2 und BMP7 die Expression von PRL und vermindern die Expression von IGFBP1 während der Dezidualisierung *in vitro*. Eine verstärkte oder verminderte Dezidualisierung durch BMP2 oder BMP7 konnte morphologisch nicht beobachtet werden. Die Auswirkungen der erhöhten BMP2-Expression in proliferativen Zysten und peritonealen Läsionen und der erhöhten BMP7-Expression in sekretorischen peritonealen Läsionen auf die Dezidualisierungskapazität der endometrialen Zellen muss also weiter untersucht werden. Laut Literatur ist BMP4 während der Dezidualisierung bei Mäusen in den Endothelzellen endometrialer Gefäße exprimiert (Ying und Zhao, 2000). Die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass BMP4 in beiden Läsionsarten unabhängig von der Zyklusphase verstärkt exprimiert wird. Ob dies einen positiven oder negativen Einfluss auf die Dezidualisierung hat, muss noch erforscht werden.

Die erhöhte BMP6-Expression in den Zysten könnte mit der in der Literatur vermuteten Rolle von BMP6 bei der Auswahl des dominanten Follikels vor dem Eisprung zusammenhängen. Bei Ratten nimmt die BMP6-Expression in den Granulosazellen kurz vor der Auswahl des dominanten Follikels stark ab. BMP6 kann die nötigen Aktivitäten des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) unterdrücken. Somit könnte es sein, dass die Auswahl dominanter Follikel durch die Überexpression von BMP6 in endometrialen Zysten gestört ist (als Review s. Shimasaki *et al.*, 2004).

Insgesamt kann man sagen, dass die Expression der meisten BMP-Komponenten in endometrialen Läsionen und Zysten verändert ist. Es gibt auch einige Expressionsunterschiede zwischen den peritonealen Läsionen und den ovariellen Zysten. Dies deutet darauf hin, dass sich die Funktionen des BMP-Signaling auch in den Läsionsarten unterscheiden. Um welche Funktionen es sich dabei genau handelt und welche Rolle das BMP-Signaling in den Läsionen hat, muss noch herausgefunden werden.

### **4.3 Ausblick Dezidualisierung**

Um zu überprüfen, ob BMP2 und BMP7 über die hier beschriebenen Signalwege mit FOXO1 und p38 die PRL- und IGFBP1-Expression in Dezidualzellen regulieren, sollten siRNA-knockout Experimente für FOXO1 und p38 durchgeführt werden. Weiterhin könnten Immunfluoreszenz Versuche mit FOXO1 und PKB/AKT einen Aufschluss über deren Translokation in den Kern während der Dezidualisierung geben.

Sehr interessant wäre es, die Rolle von BMP7 und BMP2 während der Dezidualisierung *in vivo* zu testen. Dafür könnte man ein Mausmodell zur Dezidualisierung verwenden und bei der Induktion der Dezidualisierung zusätzlich BMP2 oder BMP7 zugeben.

Dezidualisierungsversuche mit Zellen aus Zysten oder peritonealen Läsionen könnten Aufschluss darüber geben, ob die Dezidualisierungskapazität dieser Zellen vermindert ist. Allerdings ist es sehr schwer aus Zysten oder peritonealen Läsionen Zellen zu isolieren. Die Zellisolation und -identifikation müsste zunächst optimiert werden. Weiterhin sollte getestet werden, welchen

Einfluss die Zugabe der BMP-Antagonisten Noggin oder USAG1 auf die Dezydualisierung mit cAMP hat. Wird die IGFBP1-Expression durch die Zugabe eines BMP-Antagonisten nicht vermindert, ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass BMP2 und BMP7 für die verminderte IGFBP1-Expression während der Dezydualisierung verantwortlich sind. Auch Dezydualisierungsversuche mit ESC von gesunden Frauen wären sehr interessant. Da aber von gesunden Frauen kein Endometrium entnommen werden kann, müsste man z.B. Endometrium von Frauen mit Myomen verwenden.

#### **4.4 Humane endometriale Epithelzellen können einen EMT-ähnlichen Phänotypen ausbilden**

Bisher gibt es einige indirekte Hinweise dafür, dass EEC eine EMT durchlaufen können. Es konnte gezeigt werden, dass EEC durch eine Behandlung mit TGF $\beta$ 1 in einem zellulären Invasions-Assay stärker invasieren als unbehandelte EEC (Liu *et al.*, 2009). Unter dem Einfluss von Östrogen zeigen auch Ishikawa Zellen (immortalisierte Epithelzellen aus einem endometrialen Adenokarzinom) eine verstärkte Migration und Invasion (Chen *et al.*, 2010). Wie schon unter 1.3.1 beschrieben konnten aus endometrialen Läsionen und aus eutopem Endometrium von Frauen mit Endometriose zwei verschiedene Zellpopulationen epithelialer Zellen isoliert werden. Es handelt sich dabei um E-Cadherin positive EEC und E-Cadherin negative EEC. Wobei die E-Cadherin negativen Zellen invasive Eigenschaften haben. Aus den E-Cadherin negativen EEC aus Läsionen wurden Zelllinien etabliert, die ähnliche invasive Eigenschaften haben wie die primären endometrialen Zellen (Zeitvogel *et al.*, 2001). Die Invasivität hängt eher mit einer erhöhten N-Cadherin Expression zusammen als mit der verminderten E-Cadherin Expression. Die Zelllinien haben allerdings auch einige Stromazell-Eigenschaften (Banu *et al.*, 2008). Daher wird vermutet, dass die Zellen schon einen Teil der EMT durchlaufen haben (Grund *et al.*, 2008). Durch eine Behandlung mit TNF $\alpha$  konnte die EMT noch verstärkt werden, was sich in einer vermehrten Invasion der Zellen äußerte (Grund *et al.*, 2008).

Mittels eines PCR Arrays für EMT-Markergene konnten eine Vielzahl von EMT relevanten Genexpressionsänderungen in Hec1B und EEC Zellen unter Behandlung mit TGF $\beta$ 1 und 3 identifiziert werden (s. 3.3.2, Tabelle 7). Mithilfe dieser Markergene konnte gezeigt werden, dass Hec1B und EEC Zellen ihren epithelialen Charakter durch die Behandlung mit TGF $\beta$ 1 oder TGF $\beta$ 3 verlieren können um sich in einen Zelltyp mit mesenchymalen Eigenschaften umzuwandeln. Diese Daten zeigen erstmalig für Hec1B und EEC Zellen, dass sie prinzipiell dazu in der Lage sind, einen EMT-ähnlichen Prozess zu durchlaufen.

Dass die Genexpression der untersuchten Gene in Hec1B Zellen stärker induziert wird als in EEC, kann viele Gründe haben. *In vitro* Studien der EMT sind schwierig, weil die meisten Zellen aufgrund der Kulturbedingungen, nicht vollständig polarisiert sind und keine *tight junctions* haben (Thiery und Sleeman, 2006). Dies limitiert die Untersuchung der EMT. Also müsste man zunächst untersuchen ob Hec1B und EEC Zellen *tight junctions* ausbilden können oder nicht. Ein weiterer Grund könnte die Heterogenität der primären EEC aus unterschiedlichen Patienten sein oder die Kontamination der Kultur mit ESC. Es ist bekannt, dass die ESC die EEC nach mehreren Passagen überwachsen können. Daher wurden für die Versuche hier auch nur EEC bis zur Passage 5 verwendet. Die Kinetik der EMT kann sehr unterschiedlich sein. Es kann Stunden bis Wochen dauern (Thiery und Sleeman, 2006). Da die Hec1B Zellen schneller wachsen als die EEC haben sie auch einen schnelleren Metabolismus. Daher können sie besser durch TGF $\beta$  stimuliert werden, wodurch die stärkere Genexpressionsänderung erklärbar ist. In Zukunft sollte getestet werden nach wie vielen Stunden Inkubation mit TGF $\beta$  die maximalen Genexpressionsänderungen erreicht werden. Voraussichtlich wird die maximale Genexpressionsänderung in den Hec1B Zellen früher erreicht als in den EEC.

Die EMT konnte in Hec1B und EEC durch BMP7 nicht so eindeutig umgekehrt werden, wie es für Nieren- und Brustkrebszellen beschrieben ist (vgl. 1.4.4). In den Hec1B Zellen ist die Genexpression nach der Behandlung mit BMP7 oder mit dem Lösungsmittel für BMP7 für alle untersuchten Gene niedriger als in

TGF $\beta$  stimulierten Hec1B Zellen. Die EMT ist anscheinend in den Hec1B Zellen ohne Zugabe von BMP7 reversibel. BMP7 scheint die Umkehrung der EMT teilweise sogar zu verlangsamen, denn für PLEK2 und ITGAV ist die Genexpression der BMP7 behandelten Zellen signifikant höher als die der mit Lösungsmittel behandelten Zellen in der zuvor mit TGF $\beta$ 3 behandelten Gruppe. Dieser Effekt ist tendenziell auch bei FN1, MMP2 und PLEK2 zu sehen. Bei SERPINE1, KRT18 und VIM scheint BMP7 die Reversibilität der EMT zu beschleunigen, denn im Vergleich zwischen BMP7 und der Lösungsmittel-Kontrolle ist die Expression der Gene bei BMP7 signifikant niedriger. Der hier erzeugte EMT-ähnliche Phänotyp ist vielleicht noch nicht weit genug im EMT-Prozess fortgeschritten und daher reversibel. Dies sollte nach einer längeren Induktion der EMT getestet werden. Außerdem könnte es einen Einfluss haben, dass die EMT nur mit TGF $\beta$  induziert wurden. Eine EMT in Nierenzelllinien ist durch die Kombination verschiedener Zytokine (z.B. TGF $\beta$ , FGF2 und EGF) stärker, als durch die Behandlung mit nur einem Zytokin (Okada *et al.*, 1997; Strutz *et al.*, 2002). Auch dieser Ansatz sollte bei den Hec1B Zellen getestet werden.

In den Primärzellen steigt die Genexpression von FN1, ITGB1 und TMEM132A nach TGF $\beta$  induzierter EMT und anschließender Behandlung mit dem Lösungsmittel von BMP7 signifikant an. Aufgrund des langsameren Metabolismus der EEC ist es denkbar, dass die Inkubation mit BMP7 zu kurz war, um einen Effekt auf die Genexpression zu induzieren. Die EEC sind möglicherweise noch mit der Umsetzung des TGF $\beta$ -Stimulus beschäftigt, was den weiteren Anstieg in der Genexpression erklären würde. Eine andere Möglichkeit wäre, dass BMP7 keinen Einfluss auf die Genexpression nach der EMT hat. Dagegen spricht, dass die Genexpression von SERPINE1 bei BMP7 Behandlung signifikant schwächer ist als bei der Behandlung mit Lösungsmittel (in der TGF $\beta$ 3-Gruppe). Ähnlich wie bei den Hec1B Zellen scheint BMP7 die Umkehrung der EMT bei SERPINE1 zu beschleunigen.

#### 4.4.1 KRT18-Expression während der EMT in Hec1B und EEC Zellen

Auffällig war in diesem Versuch die Expression von KRT18 in den EEC. KRT18 ist ein epithelialer Marker. Wenn Zellen eine EMT durchlaufen, sollte die KRT18-Expression also sinken, da die Zellen ihren epithelialen Phänotyp verlieren. In EEC konnte ein signifikanter Abfall der KRT18-Expression gezeigt werden. Dieser Abfall ist auch zeitlich signifikant (s. 3.3.2, Abbildung 21). In den Hec1B Zellen dagegen kommt es zu einem Anstieg der KRT18-Expression. In tubulären Nierenzellen konnte gezeigt werden, dass die Vimentin-Expression alleine durch TGF $\beta$ 1 induziert werden konnte. Die Zytokeratin-Expression konnte aber nur mit einer Kombination von TGF $\beta$ 1 und FGF2 reduziert werden (Strutz *et al.*, 2002). Dies spricht dafür, dass eine EMT stark vom zellulären Kontext abhängt. Bei der anschließenden Behandlung der Hec1B Zellen mit BMP7, scheint BMP7 die Reversibilität der KRT18-Expression zu beschleunigen. In den EEC konnte BMP7 die KRT18 Expression auf dem Level einer TGF $\beta$  Behandlung halten (s. 3.3.2, Abbildung 22). Die Frage ist, ob bei einer längeren Inkubation mit BMP7 die KRT18-Expression wieder induziert wird. Die Lösungsmittel-Kontrolle von BMP7 dagegen fiel weiter ab (signifikant für die zuvor mit TGF $\beta$ 3 behandelten Zellen). Hier sieht man wahrscheinlich noch die Nachwirkungen der TGF $\beta$ -Induktion.

#### 4.5 EMT bei der Entstehung und Persistenz der Endometriose

Bislang gibt es in der Literatur nur Indizien für die Beteiligung einer EMT an der Entstehung von Endometriose (vgl. 1.3.1). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass primäre EEC unter einem geeigneten Stimulus einen EMT-ähnlichen Phänotyp ausbilden können. Aufgrund dieser Eigenschaft von humanen EEC ist es möglich, dass epitheliale Einzelzellen ausreichend sind um eine Endometriose auszubilden. Damit wäre auch das beschriebene Auftreten von Läsionen in Lymphknoten erklärbar ((Mechsner *et al.*, 2010) und vgl. 1.2.1). Wenn sich EEC durch einen geeigneten Stimulus in phänotypisch mesenchymal-ähnliche Zellen umwandeln können, könnten sich diese Zellen aus dem Gewebeverband lösen, über Blut oder Lymphe in andere Organe

einwandern, sich dort ansiedeln, proliferieren und endometriale Läsionen bilden.

Die erhöhten TGF $\beta$ -Konzentrationen in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose (Küpker *et al.*, 1998; Pizzo *et al.*, 2002) könnten die Persistenz endometrialer Läsionen erhöhen, indem sie eine EMT der Epithelzellen in den Läsionen begünstigen und so die Invasivität fördern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine erhöhte Expression von BMP7 und USAG1 in sekretorischen peritonealen Läsionen nachgewiesen werden (s. 3.1.1, Abbildung 8 und Abbildung 9). Im Zusammenhang mit dem unter 1.4.4 beschriebenen Gleichgewicht zwischen TGF $\beta$ -Signalweg (mesenchymaler Phänotyp) und BMP7-Signalweg (epithelialer Phänotyp), kam die Vermutung auf, dass der BMP-Antagonist USAG1 BMP7 inhibieren könnte und so das Gleichgewicht zum TGF $\beta$ -Signalweg verschieben könnte. Dies würde eine EMT in Läsionen fördern. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte aber nicht gezeigt werden, dass BMP7 die induzierte EMT umkehren kann. Daher konnte diese Hypothese auch nicht bestätigt werden. Die erhöhte BMP7-Expression in sekretorischen peritonealen Läsionen hätte hier ein Indiz dafür sein können, dass die Invasivität der Läsionen nicht so ausgeprägt ist, wie bei malignen Erkrankungen.

#### 4.6 EMT in endometrialen Adenokarzinomen

Die Hec1B Zellen stammen aus einem endometrialen Adenokarzinom. Sie gehören zu den etablierten Zellkulturmodellen für die Erforschung der Endometriose. Da sie einfacher zu kultivieren sind und somit auch einfacher zu vermehren, wurde der PCR Array mit diesen Zellen und nicht mit EEC durchgeführt. Bislang wurde die EMT bei endometrialen Adenokarzinomen allerdings nur phänotypisch beschrieben. In Adenokarzinomen wurden z.B. mikrozystische, verlängerte und fragmentierte Drüsen (*microcystic, elongated and fragmented glands*, MELF) gefunden. Es besteht die Vermutung, dass MELF durch EMT entstehen. Eine immunhistochemische Analyse der MELF zeigte eine reduzierte E-Cadherin Expression und eine erhöhte

KRT7-Expression. Die Expression von Vimentin war variabel (Stewart und Little, 2009). Diese Arbeit bestätigt, dass Zellen aus endometrialen Adenokarzinomen einen EMT-ähnlichen Prozess durchlaufen können.

#### 4.7 Ausblick EMT

EMT ist ein sehr dynamischer Prozess, der von vielen verschiedenen Faktoren abhängt. Es sind noch viele Experimente nötig um die Rolle der EMT bei Endometriose genau definieren zu können.

Auf dieser Arbeit aufbauend sollten zunächst zeitabhängige Induktions- und Reversibilitätsversuche durchgeführt werden, um zu überprüfen, wann die maximale Expressionsänderung der EMT-Markergene erreicht ist und ob durch BMP7 eine Reversibilität erzielt werden kann oder nicht. Des Weiteren sollte überprüft werden inwieweit Hec1B und EEC *tight junctions* ausbilden. Dies könnte mittels eines Immunfluoreszenz-Nachweises von ZO-1 oder mittels Widerstandsmessungen konfluenter Zellen geprüft werden. Um die Probleme der eindimensionalen *in vitro* Kultur zu umgehen, könnten dreidimensionale Modelle verwendet werden, in denen die Epithelzellen polarisieren können und glanduläre Strukturen beibehalten oder bilden können. Dafür wäre das dreidimensionale Zellkulturmodell für das Endometrium gut geeignet, welches im Rahmen dieser Arbeit etabliert und optimiert wurde (s. 3.4). Durch die Behandlung der endometrialen Drüsen in Matrigel mit TGF $\beta$ 1 oder 3 sollte es möglich sein, dass sich die Drüsen auflösen und dass die EEC, bei einem geeigneten Stimulus im unteren Kompartiment, durch das Matrigel invasieren. Auf eine weitere Verwendung des dreidimensionalen Zellkulturmodell im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings verzichtet, da die experimentellen Daten gezeigt haben, dass die biologischen Unterschiede zwischen den Patienten-Geweben einen stark erhöhten Bedarf an Gewebe für Experimente mit ausreichenden Fallzahlen erfordern. Dieser konnte jedoch nicht durch die vorhandenen Kooperationen mit Kliniken sichergestellt werden.

Interessant wäre es auch, die BMPs und USAG1 in Peritonealfüssigkeiten von gesunden und kranken Frauen nachzuweisen um Unterschiede

herauszufinden, die eine EMT in kranken Frauen begünstigen. Allerdings ist es schwierig Peritonealflüssigkeit von gesunden Frauen zu bekommen. Weiterhin wäre interessant, ob die Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose eine EMT in kultivierten EEC auslösen kann und die von gesunden Frauen nicht.

Ein weiterer sehr interessanter Versuch wäre es, aufgereinigte humane EEC oder isolierte endometriale Drüsen mit TGF $\beta$  vorzubehandeln und in den Bauchraum von Mäusen zu injizieren, um zu sehen, ob Läsionen wachsen. Eine Variante wäre die gleichzeitige Gabe von Zellen und TGF $\beta$ .

## 5 Literaturverzeichnis

- Abbott J., Hawe J., Hunter D., Holmes M., Finn P. und Garry R.** (2004). Laparoscopic excision of endometriosis: A randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*, **82**, 878-884.
- Alkhalaf M., Mahfoudi A., Propper A.Y. und Adessi G.L.** (1991). Additive effect of oestradiol-17 $\beta$  and serum on synthesis of deoxyribonucleic acid in guinea-pig endometrial cells in culture. *J Reprod Fertil*, **93**, 295-302.
- Arnold J.T., Kaufman D.G., Seppälä M. und Lessey B.A.** (2001). Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod*, **16**, 836-845.
- Avsian-Kretchmer O. und Hsueh A.J.W.** (2004). Comparative Genomic Analysis of the Eight-Membered Ring Cystine Knot-Containing Bone Morphogenetic Protein Antagonists. *Mol Endocrinol*, **18**, 1-12.
- Balemans W. und Van Hul W.** (2002). Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators. *Dev Biol*, **250**, 231-250.
- Banu S.K., Lee J., Starzinski-Powitz A. und Arosh J.A.** (2008). Gene expression profiles and functional characterization of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells. *Fertil Steril*, **90**, 972-987.
- Bell S.C., Jackson J.A., Ashmore J., Zhu H.H. und Tseng L.** (1991). Regulation of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 Synthesis and Secretion by Progestin and Relaxin in Long Term Cultures of Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **72**, 1014-1024.
- Ben-Jonathan N., Lapensee C.R. und Lapensee E.W.** (2008). What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans? *Endocr Rev*, **29**, 1-41.
- Bläuer M., Heinonen P.K., Martikainen P.M., Tomás E. und Ylikomi T.** (2005). A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Hum Reprod*, **20**, 864-871.
- Brar A.K., Handwerker S., Kessler C.A. und Aronow B.J.** (2001). Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiol Genomics*, **7**, 135-148.
- Brosens I.** (2004). Endometriosis rediscovered? *Hum Reprod*, **19**, 1679-1680.
- Brosens J.J., Hayashi N. und White J.O.** (1999). Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology*, **140**, 4809-4820.
- Buijs J., Henriquez N., Van Overveld P., Van Der Horst G., Ten Dijke P. und Van Der Pluijm G.** (2007a). TGF- $\beta$  and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*, **24**, 609-617.
- Buijs J.T., Henriquez N.V., Van Overveld P.G.M., Van Der Horst G., Que I., Schwaninger R., Rentsch C., Ten Dijke P., Cleton-Jansen A.-M., Driouch K., Lidereau R., Bachelier R., Vukicevic S., Clézardin P.,**

- Papapoulos S.E., Cecchini M.G., Löwik C.W.G.M. und Van Der Pluijm G.** (2007b). Bone Morphogenetic Protein 7 in the Development and Treatment of Bone Metastases from Breast Cancer. *Cancer Res*, **67**, 8742-8751.
- Bulun S.E., Cheng Y.-H., Yin P., Imir G., Utsunomiya H., Attar E., Innes J. und Julie Kim J.** (2006). Progesterone resistance in endometriosis: Link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, **248**, 94-103.
- Burney R.O. und Lathi R.B.** (2009). Menstrual bleeding from an endometriotic lesion. *Fertil Steril*, **91**, 1926-1927.
- Burney R.O., Talbi S., Hamilton A.E., Vo K.C., Nyegaard M., Nezhat C.R., Lessey B.A. und Giudice L.C.** (2007). Gene Expression Analysis of Endometrium Reveals Progesterone Resistance and Candidate Susceptibility Genes in Women with Endometriosis. *Endocrinology*, **148**, 3814-3826.
- Buzzio O.L., Lu Z., Miller C.D., Unterman T.G. und Kim J.J.** (2006). FOXO1A Differentially Regulates Genes of Decidualization. *Endocrinology*, **147**, 3870-3876.
- Chen D., Zhao M. und Mundy G.R.** (2004). Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors*, **22**, 233 - 241.
- Chen Y.-J., Li H.-Y., Huang C.-H., Twu N.-F., Yen M.-S., Wang P.-H., Chou T.-Y., Liu Y.-N., Chao K.-C. und Yang M.-H.** (2010). Oestrogen-induced epithelial–mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *J Pathol*, **222**, 261-270.
- Christian M., Zhang X., Schneider-Merck T., Unterman T.G., Gellersen B., White J.O. und Brosens J.J.** (2002). Cyclic AMP-induced Forkhead Transcription Factor, FKHR, Cooperates with CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells. *J Biol Chem*, **277**, 20825-20832.
- Christofori G.** (2006). New signals from the invasive front. *Nature*, **441**, 444-450.
- Classen-Linke I., Kusche M., Knauthe R. und Beier H.M.** (1996). Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res*, **287**, 171-185.
- Constam D.B. und Robertson E.J.** (1999). Regulation of Bone Morphogenetic Protein Activity by Pro Domains and Proprotein Convertases. *J Cell Biol*, **144**, 139-149.
- Darrow S.L., Vena J.E., Batt R.E., Zielezny M.A., Michalek A.M. und Selman S.** (1993). Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiology*, **4**, 135-142.
- De Ziegler D., Fanchin R., De Moustier B. und Bulletti C.** (1998). The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol*, **39**, 149-166.
- Di Carlo C., Bonifacio M., Tommaselli G.A., Bifulco G., Guerra G. und Nappi C.** (2009). Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor,

- and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*, **91**, 2315-2323.
- Ebisawa T., Tada K., Kitajima I., Tojo K., Sampath T.K., Kawabata M., Miyazono K. und Imamura T.** (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci*, **112**, 3519-3527.
- Erickson G.F., Fuqua L. und Shimasaki S.** (2004). Analysis of spatial and temporal expression patterns of bone morphogenetic protein family members in the rat uterus over the estrous cycle. *J Endocrinol*, **182**, 203-217.
- Esfandiari N., Khazaei M., Ai J., Bielecki R., Gotlieb L., Ryan E. und Casper R.F.** (2007). Effect of a statin on an in vitro model of endometriosis. *Fertil Steril*, **87**, 257-262.
- Fasciani A., Bocci G., Xu J., Bielecki R., Greenblatt E., Leyland N. und Casper R.F.** (2003). Three-dimensional in vitro culture of endometrial explants mimics the early stages of endometriosis. *Fertil Steril*, **80**, 1137-1143.
- Fowler D.J., Nicolaides K.H. und Miell J.P.** (2000). Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, **6**, 495-504.
- Gaetje R., Kotzian S., Herrmann G., Baumann R. und Starzinski-Powitz A.** (1997). Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol*, **150**, 461-467.
- Gamell C., Susperregui A.G., Bernard O., Rosa J.L. und Ventura F.** (2011). The p38/MK2/Hsp25 Pathway Is Required for BMP-2-Induced Cell Migration. *PLoS ONE*, **6**, e16477.
- Gao J., Mazella J. und Tseng L.** (2002). Hox Proteins Activate the IGFBP-1 Promoter and Suppress the Function of hPR in Human Endometrial Cells. *DNA Cell Biol*, **21**, 819-825.
- Garai J., Molnar V., Varga T., Koppan M., Torok A. und Bodis J.** (2006). Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue. *Front Biosci*, **11**, 595-619.
- Gargett C.E., Chan R.W.S. und Schwab K.E.** (2008). Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol*, **288**, 22-29.
- Garry R.** (2004). The endometriosis syndromes: a clinical classification in the presence of aetiological confusion and therapeutic anarchy. *Hum Reprod*, **19**, 760-768.
- Gellersen B., Brosens I.A. und Brosens J.J.** (2007). Decidualization of the Human Endometrium: Mechanisms, Functions, and Clinical Perspectives. *Semin Reprod Med*, **25**, 445-453.
- Gellersen B. und Brosens J.** (2003). Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol*, **178**, 357-372.

- Gellersen B., Dimattia G.E., Friesen H.G. und Bohnet H.G.** (1989). Prolactin (PRL) mRNA from human decidua differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript. *Mol Cell Endocrinol*, **64**, 127-130.
- Gellersen B., Kempf R., Telgmann R. und Dimattia G.E.** (1994). Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol*, **8**, 356-373.
- Gerlo S., Verdood P., Hooghe-Peters E.L. und Kooijman R.** (2005). Multiple, PKA-dependent and PKA-independent, signals are involved in cAMP-induced PRL expression in the eosinophilic cell line Eol-1. *Cell Signal*, **17**, 901-909.
- Ghosh-Choudhury N., Abboud S.L., Nishimura R., Celeste A., Mahimainathan L. und Choudhury G.G.** (2002). Requirement of BMP-2-induced Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt Serine/Threonine Kinase in Osteoblast Differentiation and Smad-dependent BMP-2 Gene Transcription. *J Biol Chem*, **277**, 33361-33368.
- Griffith J.S., Liu Y.-G., Tekmal R.R., Binkley P.A., Holden A.E.C. und Schenken R.S.** (2010). Menstrual endometrial cells from women with endometriosis demonstrate increased adherence to peritoneal cells and increased expression of CD44 splice variants. *Fertil Steril*, **93**, 1745-1749
- Grinius L., Kessler C., Schroeder J. und Handwerker S.** (2006). Forkhead transcription factor FOXO1A is critical for induction of human decidualization. *J Endocrinol*, **189**, 179-187.
- Grund E.M., Kagan D., Tran C.A., Zeitvogel A., Starzinski-Powitz A., Nataraja S. und Palmer S.S.** (2008). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Regulates Inflammatory and Mesenchymal Responses via Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase, p38, and Nuclear Factor  $\kappa$ B in Human Endometriotic Epithelial Cells. *Mol Pharmacol*, **73**, 1394-1404.
- Halme J., Hammond M.G., Hulka J.F., Raj S.G. und Talbert L.M.** (1984). Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*, **64**, 151-154.
- Hasegawa A., Yoshino O., Osuga Y., Kodama A., Takamura M., Nishii O. und Taketani Y.** (2010). Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model. *Fertil Steril*, **93**, 2757-2759.
- Hogan B.L.M.** (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 432-438.
- Holoch K.J. und Lessey B.A.** (2010). Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol*, **53**, 429-438.
- Illouz S., Boubli L., Lavaut M.-N., Allasia C. und Charpin C.** (2000). Endometrial Response to Sexual Steroids as Assessed by Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  Output in Explant Culture and Hormone Receptor Expression. *Gynecol Obstet Invest*, **50**, 43-49.

- Irwin J.C., Suen L.-F., Faessen G.H., Popovici R.M. und Giudice L.C.** (2001). Insulin-Like Growth Factor (IGF)-II Inhibition of Endometrial Stromal Cell Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 and IGF-Binding Protein-1 Suggests Paracrine Interactions at the Decidua:Trophoblast Interface during Human Implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 2060-2064.
- Jabbour H. und Critchley H.** (2001). Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction*, **121**, 197-205.
- Jenkins S., Olive D.L. und Haney A.F.** (1986). Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol*, **67**, 335-338.
- Johnson G.A., Burghardt R.C., Bazer F.W. und Spencer T.E.** (2003). Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation. *Biol Reprod*, **69**, 1458-1471.
- Jones R.L., Stoikos C., Findlay J.K. und Salamonsen L.A.** (2006). TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*, **132**, 217-232.
- Kalluri R. und Neilson E.G.** (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, **112**, 1776-1784.
- Kim J.J. und Fazleabas A.T.** (2004). Uterine receptivity and implantation: the regulation and action of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), HOXA10 and forkhead transcription factor-1 (FOXO-1) in the baboon endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**,
- Kirk D. und Irwin J.C.** (1980). Normal human endometrium in cell culture. *Methods Cell Biol*, **21B**, 51-77.
- Kirsch T., Sebald W. und Dreyer M.K.** (2000). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*, **7**, 492-496.
- Klemmt P.A., Carver J.G., Kennedy S.H., Koninckx P.R. und Mardon H.J.** (2006). Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril*, **85**, 564-572.
- Klemmt P.A., Carver J.G., Koninckx P., Mcveigh E.J. und Mardon H.J.** (2007). Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Hum Reprod*, **22**, 3139-3147.
- Kodama A., Yoshino O., Osuga Y., Harada M., Hasegawa A., Hamasaki K., Takamura M., Koga K., Hirota Y., Hirata T., Takemura Y., Yano T. und Taketani Y.** (2010). Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. *Hum Reprod*, dep455.
- Koks C.a.M., Dunselman G.a.J., De Goeij A.F.P.M., Arends J.W. und Evers J.L.H.** (1997). Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril*, **68**, 560-564.

- Krause C., Guzman A. und Knaus P.** (2011). Noggin. *Int J Biochem Cell Biol*, **43**, 478-481.
- Küpker W., Schultze-Mosgau A. und Diedrich K.** (1998). Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update*, **4**, 719-723.
- Laurikkala J., Kassai Y., Pakkasjärvi L., Thesleff I. und Itoh N.** (2003). Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot. *Dev Biol*, **264**, 91-105.
- Lee K.Y., Jeong J.W., Wang J., Ma L., Martin J.F., Tsai S.Y., Lydon J.P. und Demayo F.J.** (2007). Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. *Mol Cell Biol*, **27**, 5468-5478.
- Li M.L., Aggeler J., Farson D.A., Hatier C., Hassell J. und Bissell M.J.** (1987). Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 136-140.
- Li Q., Kannan A., Wang W., Demayo F.J., Taylor R.N., Bagchi M.K. und Bagchi I.C.** (2007). Bone Morphogenetic Protein 2 Functions via a Conserved Signaling Pathway Involving Wnt4 to Regulate Uterine Decidualization in the Mouse and the Human. *J Biol Chem*, **282**, 31725-31732.
- Liu Y.-G., Tekmal R.R., Binkley P.A., Nair H.B., Schenken R.S. und Kirma N.B.** (2009). Induction of endometrial epithelial cell invasion and c-fms expression by transforming growth factor beta. *Mol Hum Reprod*, **15**, 665-673.
- Loureiro J., Schilte M., Aguilera A., Albar-Vizcaíno P., Ramírez-Huesca M., Pérez-Lozano M.L., González-Mateo G., Aroeira L.S., Selgas R., Mendoza L., Ortiz A., Ruíz-Ortega M., Van Den Born J., Beelen R.H.J. und López-Cabrera M.** (2010). BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. *Nephrol Dial Transplant*, **25**, 1098-1108.
- Lyons K., Graycar J.L., Lee A., Hashmi S., Lindquist P.B., Chen E.Y., Hogan B.L. und Derynck R.** (1989). Vgr-1, a mammalian gene related to Xenopus Vg-1, is a member of the transforming growth factor beta gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 4554-4558.
- Mahutte N.G. und Arici A.** (2002). New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *J Reprod Immunol*, **55**, 73-83.
- Maruyama T. und Yoshimura Y.** (2008). Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J*, **55**, 795-810.
- Matsuura K., Ohtake H., Katabuchi H. und Okamura H.** (1999). Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest*, **47**, 18-20.
- Mechsner S., Weichbrodt M., Riedlinger W.F.J., Kaufmann A.M., Schneider A. und Köhler C.** (2010). Immunohistochemical evaluation of

- endometriotic lesions and disseminated endometriosis-like cells in incidental lymph nodes of patients with endometriosis. *Fertil Steril*, **94**, 457-463.
- Micalizzi D.S. und Ford H.L.** (2009). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer. *Future Oncol*, **5**, 1129-1143.
- Monsalve M. und Olmos Y.** (2011). The Complex Biology of FOXO. *Curr Drug Targets*, **12**, 1322-1350.
- Mulholland J., Winterhager E. und Beier H.M.** (1988). Changes in proteins synthesized by rabbit endometrial epithelial cells following primary culture. *Cell Tissue Res*, **252**, 123-132.
- Münster K., Schmidt L. und Helm P.** (1992). Length and variation in the menstrual cycle--a cross-sectional study from a Danish county. *Br J Obstet Gynaecol*, **99**, 422-429.
- Nogai H., Rosowski M., Grun J., Rietz A., Debus N., Schmidt G., Lauster C., Janitz M., Vortkamp A. und Lauster R.** (2008). Follistatin antagonizes transforming growth factor- $\beta$ 3-induced epithelial-mesenchymal transition in vitro: implications for murine palatal development supported by microarray analysis. *Differentiation*, **76**, 404-416.
- Nohe A., Keating E., Knaus P. und Petersen N.O.** (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*, **16**, 291-299.
- Ohta S., Schoenwolf G.C. und Yamada G.** (2010). The cessation of gastrulation: BMP signaling and EMT during and at the end of gastrulation. *Cell Adh Migr*, **4**, 440-446.
- Okada H., Danoff T.M., Kalluri R. und Neilson E.G.** (1997). Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol Renal Physiol*, **273**, F563-574.
- Olive D.L. und Pritts E.A.** (2001). Treatment of Endometriosis. *N Engl J Med*, **345**, 266-275.
- Osteen K.G., Yeaman G.R. und Bruner-Tran K.L.** (2003). Matrix metalloproteinases and endometriosis. *Semin Reprod Med*, **21**, 155-164.
- Ozkaynak E., Jin D.F., Jelic M., Vukicevic S. und Oppermann H.** (1997). Osteogenic Protein-1 mRNA in the Uterine Endometrium. *Biochem Biophys Res Commun*, **234**, 242-246.
- Paria B.C., Ma W., Tan J., Raja S., Das S.K., Dey S.K. und Hogan B.L.** (2001). Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1047-1052.
- Piek E., Moustakas A., Kurisaki A., Heldin C.H. und Dijke P.T.** (1999). TGF- $\beta$  type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci*, **112**, 4557-4568.
- Pierro E., Minici F., Alesiani O., Miceli F., Proto C., Screpanti I., Mancuso S. und Lanzone A.** (2001). Stromal-Epithelial Interactions Modulate Estrogen Responsiveness in Normal Human Endometrium. *Biol Reprod*, **64**, 831-838.

- Pizzo A., Salmeri F.M., Ardita F.V., Sofo V., Tripepi M. und Marsico S.** (2002). Behaviour of Cytokine Levels in Serum and Peritoneal Fluid of Women with Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, **54**, 82-87.
- Romano L.A. und Runyan R.B.** (2000). Slug is an Essential Target of TGF $\beta$ 2 Signaling in the Developing Chicken Heart. *Dev Biol*, **223**, 91-102.
- Rutanen E.-M., Pekonen F. und Mäkinen T.** (1988). Soluble 34K Binding Protein Inhibits the Binding of Insulin-like Growth Factor I to Its Cell Receptors in Human Secretory Phase Endometrium: Evidence for Autocrine/Paracrine Regulation of Growth Factor Action. *J Clin Endocrinol Metab*, **66**, 173-180.
- Sampson J.** (1927a). Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, **14**, 422-469.
- Sampson J.A.** (1927b). Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol*, **3**, 93-110.
- Scheufler C., Sebald W. und Hülsmeier M.** (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, **287**, 103-115.
- Scotti S., Regidor P.-A., Schindler A.E. und Winterhager E.** (2000). Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod*, **6**, 610-617.
- Seppälä M., Koistinen R. und Rutanen E.-M.** (1994). Uterine endocrinology and paracrinology: insulin-like growth factor binding protein-1 and placental protein 14 revisited. *Hum Reprod*, **9**, 917-925.
- Shi Y. und Massagué J.** (2003). Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*, **113**, 685-700.
- Shimasaki S., Moore R.K., Otsuka F. und Erickson G.F.** (2004). The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocr Rev*, **25**, 72-101.
- Simmons D.G. und Kennedy T.G.** (2002). Uterine Sensitization-Associated Gene-1: A Novel Gene Induced Within the Rat Endometrium at the Time of Uterine Receptivity/Sensitization for the Decidual Cell Reaction. *Biol Reprod*, **67**, 1638-1645.
- Sinaii N., Plumb K., Cotton L., Lambert A., Kennedy S., Zondervan K. und Stratton P.** (2008). Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. *Fertil Steril*, **89**, 538-545.
- Song K., Krause C., Shi S., Patterson M., Suto R., Grgurevic L., Vukicevic S., Van Dinther M., Falb D., Ten Dijke P. und Alaoui-Ismaili M.H.** (2010). Identification of a Key Residue Mediating Bone Morphogenetic Protein (BMP)-6 Resistance to Noggin Inhibition Allows for Engineered BMPs with Superior Agonist Activity. *J Biol Chem*, **285**, 12169-12180.
- Stewart C.J.R. und Little L.** (2009). Immunophenotypic features of MELF pattern invasion in endometrial adenocarcinoma: evidence for epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology*, **55**, 91-101.

- Stoikos C.J., Harrison C.A., Salamonsen L.A. und Dimitriadis E.** (2008). A distinct cohort of the TGF $\beta$  superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. *Hum Reprod*, **23**, 1447-1456.
- Strakova Z., Srisuparp S. und Fazleabas A.T.** (2000). Interleukin-1 $\beta$  Induces the Expression of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 during Decidualization in the Primate. *Endocrinology*, **141**, 4664-4670.
- Strathy J.H., Molgaard C.A., Coulam C.B. und Melton L.J., 3rd** (1982). Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril*, **38**, 667-672.
- Stratton P. und Berkley K.J.** (2011). Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update*, **17**, 327-346.
- Strutz F., Zeisberg M., Ziyadeh F.N., Yang C.-Q., Kalluri R., Muller G.A. und Neilson E.G.** (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int*, **61**, 1714-1728.
- Suginami H.** (1991). A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol*, **165**, 214-218.
- Tanaka N., Miyazaki K., Tashiro H., Mizutani H. und Okamura H.** (1993). Changes in adenylyl cyclase activity in human endometrium during the menstrual cycle and in human decidua during pregnancy. *J Reprod Fertil*, **98**, 33-39.
- Tang B., Guller S. und Gurside E.** (1994). Mechanism of Human Endometrial Stromal Cells Decidualization. *Ann N Y Acad Sci*, **734**, 19-25.
- Telgmann R. und Gellersen B.** (1998). Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum Reprod Update*, **4**, 472-479.
- Thériault B.L., Shepherd T.G., Mujoomdar M.L. und Nachtigal M.W.** (2007). BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, **28**, 1153-1162.
- Thiery J.P.** (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 442-454.
- Thiery J.P. und Sleeman J.P.** (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 131-142.
- Toyofuku A., Hara T., Taguchi T., Katsura Y., Ohama K. und Kudo Y.** (2006). Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod*, **21**, 1122-1128.
- Urist M.R.** (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, **150**, 893-899.
- Van Der Linden P.J., De Goeij A.F., Dunselman G.A., Van Der Linden E.P., Ramaekers F.C. und Evers J.L.** (1994). Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril*, **61**, 85-90.

- Ventura F., Doody J., Liu F., Wrana J.L. und Massagué J.** (1994). Reconstitution and transphosphorylation of TGF- $\beta$  receptor complexes. *The EMBO journal*, **13**, 5581-5589.
- Von Bubnoff A. und Cho K.W.Y.** (2001). Intracellular BMP Signaling Regulation in Vertebrates: Pathway or Network? *Dev Biol*, **239**, 1-14.
- Von Wolff M., Bohlmann M.K., Fiedler C., Ursel S. und Strowitzki T.** (2004). Osteopontin is up-regulated in human decidual stromal cells. *Fertil Steril*, **81**, 741-748.
- Von Wolff M., Strowitzki T., Becker V., Zepf C., Tabibzadeh S. und Thaler C.J.** (2001). Endometrial osteopontin, a ligand of  $\beta_3$ -integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil Steril*, **76**, 775-781.
- Wahab N.A. und Mason R.M.** (2006). A critical look at growth factors and epithelial-to-mesenchymal transition in the adult kidney. Interrelationships between growth factors that regulate EMT in the adult kidney. *Nephron Exp Nephrol*, **104**, 129-134.
- Wang D., Minoura H., Sugiyama T., Tanaka K., Kawato H., Toyoda N. und Sagawa N.** (2007). Analysis on the promoter region of human decidual prolactin gene in the progesterone-induced decidualization and cAMP-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Cell Biochem*, **300**, 239-247.
- Witz C.A., Thomas M.R., Montoya-Rodriguez I.A., Nair A.S., Centonze V.E. und Schenken R.S.** (2001). Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. *Fertil Steril*, **75**, 385-390.
- Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M. und Wang E.A.** (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, **242**, 1528-1534.
- Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. und Massagué J.** (1994). Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature*, **370**, 341-347.
- Yanagita M., Oka M., Watabe T., Iguchi H., Niida A., Takahashi S., Akiyama T., Miyazono K., Yanagisawa M. und Sakurai T.** (2004). USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, **316**, 490-500.
- Yang S., Du J., Wang Z., Yuan W., Qiao Y., Zhang M., Zhang J., Gao S., Yin J., Sun B. und Zhu T.** (2007). BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing EF1 in breast cancer cells. *BMC Cancer*, **7**,
- Yi S.E., Lapolt P.S., Yoon B.S., Chen J.Y., Lu J.K. und Lyons K.M.** (2001). The type I BMP receptor Bmpr1B is essential for female reproductive function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7994-7999.
- Ying Y. und Zhao G.-Q.** (2000). Detection of Multiple Bone Morphogenetic Protein Messenger Ribonucleic Acids and Their Signal Transducer, Smad1, During Mouse Decidualization. *Biol Reprod*, **63**, 1781-1786.
- Yoshino O., Osuga Y., Hirota Y., Koga K., Yano T., Tsutsumi O. und Taketani Y.** (2003). Akt as a possible intracellular mediator for

decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*, **9**, 265-269.

**Zeisberg M., Hanai J.I., Sugimoto H., Mammoto T., Charytan D., Strutz F. und Kalluri R.** (2003). BMP-7 counteracts TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*, **9**, 964.

**Zeisberg M., Shah A.A. und Kalluri R.** (2005). Bone Morphogenic Protein-7 Induces Mesenchymal to Epithelial Transition in Adult Renal Fibroblasts and Facilitates Regeneration of Injured Kidney. *J Biol Chem*, **280**, 8094-8100.

**Zeitvogel A., Baumann R. und Starzinski-Powitz A.** (2001). Identification of an Invasive, N-Cadherin-Expressing Epithelial Cell Type in Endometriosis Using a New Cell Culture Model. *Am J Pathol*, **159**, 1839-1852.

**Zhou H.E. und Nothnick W.B.** (2005). The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Front Biosci*, **10**, 569-575.

## 6 Anhang

### 6.1 Publikationsliste

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2008 bis August 2011 in der Abteilung Women's Healthcare – Gynecological Therapy 1 bei der Bayer Pharma AG (ehemals: Bayer Schering Pharma AG) unter der Betreuung von Dr. Michael Peters und Dr. Frank Sacher angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits präsentiert und eine Publikation ist in Vorbereitung.

#### **Publikation:**

Rohn S, Fuhrmann U, Sacher F

**Reduced expression of IGFBP1 through BMP2 and BMP7 during decidualization in primary endometrial stromal cells *in vitro***

In Vorbereitung

#### **Poster:**

Rohn S, Fuhrmann U, Sacher F

**Expression of BMP ligands, receptors, signalling molecules and antagonists in endometrium and in primary endometrial stromal cells**

Young Scientists' Poster Session der Bayer Pharma AG, Oktober 2010, Berlin, Deutschland

Rohn S, Fuhrmann U, Sacher F

**Expression of BMP ligands, receptors, signalling molecules and antagonists in endometrium and in primary endometrial stromal cells**

8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, September 2010, Leuven, Belgien

Rohn S, Sacher F, Fuhrmann U, Peters M

**Establishment of a novel *in vitro* model for the study of endometriosis**

---

Young Scientists' Poster Session der Bayer Pharma AG, Oktober 2009, Berlin, Deutschland

Rohn S, Sacher F, Fuhrmann U, Peters M

**Etablierung eines neuen *in vitro* Modells zur Untersuchung der Endometriose**

8. Deutscher Endometriose Kongress, September 2009, Münster, Deutschland

Rohn S, Peters M, Fuhrmann U, Habenicht U-F

**Establishment of a novel *in vitro* model for the study of endometriosis**

Young Scientists' Poster Session der Bayer Pharma AG, Oktober 2008, Berlin, Deutschland

**Preise:**

Posterpreis für das Poster mit dem Titel "Establishment of a novel *in vitro* model for the study of endometriosis" bei der Young Scientists' Poster Session der Bayer Pharma AG im Oktober 2009 in Berlin

## 6.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Michaele Peters und Dr. Frank Sacher für die Betreuung der Arbeit. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen, waren stets diskussionsbereit und haben mit ihren hilfreichen Ideen entscheidend zur erfolgreichen Durchführung der Arbeit beigetragen. Dr. Frank Sacher danke ich besonders für seinen motivierenden Optimismus!

Genauso herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Enno Hartmann vom Institut für Biologie der Universität zu Lübeck für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit bedanken, sowie für seine wertvollen kritischen Kommentare und Anregungen bei seinen Besuchen bei der Bayer Pharma AG.

Prof. Dr. Ursula-Friederike Habenicht danke ich für die hilfreichen Diskussionen und die freundliche Bereitschaft die zweite Berichterstatteerin meiner Arbeit zu sein.

Bei Andrea Seipp und Manuela Steinbach möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken, für die Weitergabe ihres Wissens bezüglich vieler Methoden und Tricks und für die vielen fachlichen Diskussionen und privaten Gespräche. Auch Margrit Kontenak, Karin Zessin, Kerstin Folgnand und Susanne Ballaschk sei herzlich für ihre unermüdliche Hilfe bei den verschiedenen experimentellen Arbeiten gedankt.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern bei Women's Healthcare für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Dr. Ulrike Fuhrmann danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in ihrer Abteilung durchzuführen.

Ich danke allen meinen Kollegen und besonders den Doktoranden der Bayer Pharma AG für die informative Zeit und die angenehme Gesellschaft!

Besonders danken möchte ich zudem all denen, die sehr ausdauernd und kritisch das Manuskript dieser Arbeit korrigiert haben!

Meiner Mutter, meinen Geschwistern und DB danke ich für ihre liebevolle und ausdauernde Unterstützung!