

Aus dem Institut für Anatomie
am Universitätsklinikum Essen

Induktion der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen: Vergleichende Analysen bei Frauen mit und ohne Endometriose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Janine Moyer

aus Magdeburg

Dezember 2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78195

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240731-142145-1



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie (Leitung: Prof. Dr. Gunther Wennemuth) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ruth Grümmer
2. Gutachter: Prof. Dr. Sabine Kasimir-Bauer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2023

Teile der vorliegenden Arbeit wurden präsentiert:

18. Tag der Forschung der medizinischen Fakultät Duisburg/Essen, 2019 (Poster)

Janine Moyer, Ines Beyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Optimierung cAMP-vermittelter Signalwege zur Induktion der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen bei Patientinnen mit Endometriose*

19. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF) und der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM) in Düsseldorf 2019 (Vortrag)

Janine Moyer, Ines Beyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Optimierung cAMP-vermittelter Signalwege zur Induktion der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen bei Patientinnen mit Endometriose*

19. Tag der Forschung der medizinischen Fakultät Duisburg/Essen, 2020 (Online Vortrag)

Janine Moyer, Ines Beyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Optimizing cAMP mediated signalling pathways for decidualization induction of endometrial stroma cells of patients with endometriosis*

20. Tag der Forschung der medizinischen Fakultät Duisburg/Essen, 2021 (Online Vortrag)

Janine Moyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Induction of decidualization of endometrial stromal cells: Comparative analysis of women with and without endometriosis*

20. Arbeitskreis Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM) in Münster 2021 (Vortrag)

Janine Moyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Induktion der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen: Vergleichende Analysen bei Frauen mit und ohne Endometriose*

10th Young Physiologists Symposium 2021 (Online Vortrag)

Janine Moyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Addressing progesterone and cAMP signaling pathways for decidualization induction of endometrial stromal cells of patients with endometriosis*

14th World Congress on Endometriosis 2021 (Online Posterpräsentation)

Janine Moyer, Aida Nik Bakhsh, Ines Beyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Optimizing cAMP mediated signaling pathways for decidualization induction of endometrial stromal cells of patients with endometriosis*

37th Virtual Annual Meeting of ESHRE 2021 (Online Posterpräsentation)

Janine Moyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Addressing progesterone and cAMP signaling pathways for decidualization induction of endometrial stromal cells of patients with endometriosis*

11th Young Physiologists Symposium in Essen 2022 (Vortrag)

Janine Moyer, Dunja Baston-Büst, Gunther Wennemuth, Alexandra Bielfeld, Ruth Grümmer *Addressing progesterone and cAMP signaling pathways for decidualization induction of endometrial stromal cells of patients with endometriosis*

Für Bernhard

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	9
Summary	11
Abkürzungsverzeichnis	12
Abbildungsverzeichnis	14
Tabellenverzeichnis	17
1. Einleitung	18
1.1. Endometrium und Menstruationszyklus	18
1.2. Endometriose	20
1.2.1. Epidemiologie und Pathogenese.....	20
1.2.2. Klinische Symptome und Diagnose.....	25
1.2.3. Therapien und Forschungsansätze.....	26
1.3. Dezidualisierung.....	31
1.3.1. Funktion sowie morphologische und biochemische Veränderungen.....	31
1.3.2. Die Rolle des cAMP- und Progesteron-Signalwegs für die Dezidualisierung.....	33
1.4. <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Modelle zur Untersuchung von Behandlungsoptionen für die Endometriose	35
1.5. Zielsetzung.....	38
2. Material und Methoden	39
2.1. Material	39
2.1.1. Geräte	39
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	40
2.1.3. Chemikalien	41
2.1.4. Allgemeine Puffer und Lösungen	43
2.1.5. Puffer für molekularbiologische Methoden	43
2.1.6. Primer.....	44
2.1.7. Puffer für SDS-PAGE und WB	45
2.1.8. Längenstandard	46
2.1.9. Verwendete Enzyme und vorgefertigte Systeme/Kits	47
2.1.10. Zellkulturmedien und Puffer	47
2.1.11. Zellkulturzusätze und Substanzlösungen.....	48
2.1.12. Zusammensetzung von Zellkulturmedien.....	49
2.1.13. Verwendetes humanes Endometriumgewebe.....	50
2.1.14. Verwendete Software und Datenbanken.....	52

2.2.	Methoden	53
2.2.1.	Kultivierung humaner endometrialer Stromazellen (hESCs)	53
2.2.2.	Isolation von hESCs	53
2.2.3.	Kultivierung und Passagieren von hESCs	54
2.2.4.	Kryokonservierung und in Kulturnahme von hESCs	55
2.2.5.	Zellzahlbestimmung	56
2.2.6.	<i>In vitro</i> Induktion der Dezidualisierung von hESCs	56
2.2.7.	Tierexperimentelle Arbeiten	58
2.2.7.1.	Versuchstiere	58
2.2.7.2.	Transplantation von humanem Endometriumgewebe	58
2.2.7.3.	Substanzapplikationen	59
2.2.7.4.	Entnahme der transplantierten Gewebefragmente und Aufarbeitung ...	60
2.2.11.	Histologische Methoden und Auswertung	61
2.2.12.	Molekularbiologische Methoden	62
2.2.12.1.	Isolation von RNA	62
2.2.12.2.	Agarosegelelektrophorese	63
2.2.12.3.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	64
2.2.12.4.	Reverse Transkription	65
2.2.12.5.	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR/ <i>Realtime</i> -PCR)	66
2.2.12.6.	RT-PCR zur Etablierung der Primer für die <i>in vivo</i> Analysen	69
2.2.13.	Proteinbiochemische Methoden	70
2.2.13.1.	Prolaktinbestimmung mittels ELISA	70
2.2.13.2.	Proteinextraktion	71
2.2.13.3.	SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion	72
2.2.14.	Durchflusszytometrische Analyse	75
2.2.15.	Statistische Auswertung	77
3.	Ergebnisse	78
3.1.	Progesteron- und Glukokortikoid Rezeptorexpression im eutopen Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose	78
3.2.	Effekt verschiedener cAMP- und Forskolin-Konzentrationen auf die morphologische und funktionelle Dezidualisierung von hESCs	81
3.2.1.	Morphologische Dezidualisierung	81
3.2.2.	Zellgröße und Granularität	84
3.2.3.	Funktionelle Dezidualisierung	86
3.3.	Vergleich des Effekts von MPA und Progesteron auf die Dezidualisierungsinduktion über den cAMP-vermittelten Signalweg	88

3.3.1.	Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von MPA und Progesteron auf die 8-Br-cAMP-induzierte Dezidualisierung.....	88
3.3.2.	Vergleich des Progestineffekts auf die cAMP- und Forskolin-induzierte Dezidualisierung.....	90
3.3.3.	Analyse Dezidualisierungs-assoziiierter Faktoren.....	91
3.4.	Einfluss von Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors und von PDE-Inhibitoren auf die Dezidualisierung von hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose	97
3.4.1.	Analyse des Effektes von hCG und Relaxin auf die funktionelle Dezidualisierung.....	97
3.4.2.	Untersuchung Dezidualisierung-spezifischer Transkriptionsfaktoren ..	100
3.5.	Effekt von PDE-Inhibitoren auf die Forskolin-induzierte Dezidualisierung.....	102
3.5.1.	Funktionelle Dezidualisierung durch die Kombination von Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA	102
3.5.2.	Analyse Dezidualisierungs-spezifischer Marker nach kombinierter Behandlung mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA.....	104
3.5.3.	Analyse des Phosphodiesterasestatus in den hESCs nach Forskolin-induzierter Dezidualisierung	113
3.6.	Validierung der <i>in vitro</i> Ergebnisse in einem humanisierten Endometriose Mausmodell <i>in vivo</i>	117
3.6.1.	Analyse des eutopen Endometriums.....	117
3.6.2.	Analyse der ektopen endometrialen Läsionen nach Transplantation und Behandlung in der Nacktmaus	120
3.6.2.1.	Gewichte und Morphologie der ektopen humanen Endometriumgewebe	120
3.6.2.2.	Analyse der Genexpression Dezidualisierungs-assoziiierter Transkriptionsfaktoren in den ektopen humanen Endometriumfragmenten.....	123
4.	Diskussion	129
4.1.	Einfluss der Dezidualisierung auf zytologische Parameter.....	129
4.2.	Wirkung von Progestinen auf die <i>in vitro</i> Dezidualisierung endometrialer Stromazellen	131
4.3.	Vergleich des Effektes von 8-Br-cAMP und Forskolin auf die <i>in vitro</i> Dezidualisierung von hESCs.....	135
4.4.	Steigerung der Forskolin-induzierten Dezidualisierung von hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose	139
4.5.	Analyse von am Dezidualisierungsprozess-beteiligten Transkriptionsfaktoren.....	141
4.6.	Induktion der Dezidualisierung von hESCs durch Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren	148

4.7.	Induktion der Dezidualisierung im humanisierten Endometriose Mausmodell <i>in vivo</i>	150
4.8.	Schlussfolgerung.....	153
	Literaturverzeichnis	155
	Danksagung	170
	Lebenslauf	171
	Erklärungen	172

Zusammenfassung

Das Auftreten von endometrialem Gewebe außerhalb des *Cavum uteri* kennzeichnet die gynäkologische Erkrankung Endometriose, die weltweit bis zu 10 % der Frauen im reproduktiven Alter betrifft. Da bisher keine kausale Therapie existiert, ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen wünschenswert. Eine mögliche Progesteronresistenz in Endometriosepatientinnen kann zu Störungen in dem als Dezidualisierung bezeichneten Differenzierungsprozess der endometrialen Stromazellen führen und dadurch die Entstehung dieser Erkrankung begünstigen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Signalwege zur Induktion der Dezidualisierung als mögliche Therapieansätze untersucht. Hierzu wurden humane endometriale Stromazellen (hESCs) aus Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose isoliert und mit unterschiedlichen Induktoren des an diesem Prozess beteiligten cAMP- und Progesteronrezeptor-Signalweges *in vitro* inkubiert. Anhand morphologischer, molekularer und biochemischer Parameter wurde die erfolgreiche Dezidualisierungsinduktion überprüft. Während die Progestine Progesteron und MPA alleine keine funktionelle Induktion der Dezidualisierung zeigten, wurde diese durch die Stimulation des cAMP-Signalweges mit 8-Br-cAMP oder dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin signifikant erhöht und durch die Kombination mit MPA, nicht aber mit Progesteron, nochmals signifikant gesteigert. Dabei zeigte die Behandlung mit Forskolin im Gegensatz zu 8-Br-cAMP eine deutlich geringere Dezidualisierungsreaktion. Die Forskolin-induzierte Dezidualisierung konnte jedoch durch die Zugabe der PDE-Inhibitoren Milrinone oder Rolipram signifikant in den hESCs beider Patientinnenkohorten gesteigert werden. Auch diese wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit MPA nochmals deutlich erhöht, nicht aber durch die zusätzliche Inkubation mit hCG oder Relaxin als Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Dezidualisierungsreaktion ging hierbei mit einer Erhöhung von an diesem Prozess beteiligten Transkriptionsfaktoren einher, darunter für FOXO1 für den ein signifikanter Anstieg der Transkription bei parallel gesteigerter Prolaktinsekretion zu verzeichnen war. Bei der *in vivo* Überprüfung dieser *in vitro* gewonnenen Ergebnisse in einem humanisierten Endometriose Mausmodell nach intraperitonealer Transplantation von humanem eutopem Endometrium in die murine Bauchhöhle zeigten sich zwar keine eindeutig morphologisch dezidualisierten Bereiche in den endometrialen Läsionen, jedoch konnte auf molekularer Ebene eine beginnende

Dezidualisierungsreaktion der ektopen humanen Endometriumfragmente nach 6-tägiger Behandlung der Mäuse beobachtet werden. Aufgrund der noch zu geringen Fallzahl bedarf es hier jedoch weiterer Analysen zur Identifikation der optimalen Substanzkombination und Behandlungsdauer. Dies kann eine Grundlage für die Entwicklung innovativer medikamentöser Therapieansätze zur Vermeidung und/oder Behandlung der Endometriose bilden.

Summary

The appearance of endometrial tissue outside the uterine cavity characterizes the gynecological disease endometriosis, which affects up to 10 % of women of reproductive age worldwide. Since to date there is no causal therapy, the development of new therapy options is desirable. A possible progesterone resistance in endometriosis patients can lead to disorders in the differentiation process of the endometrial stromal cells known as decidualization and thus promote the development of this disease. Therefore, the present work examined signaling pathways for inducing decidualization as possible therapeutic approach. For this purpose, human endometrial stromal cells (hESCs) were isolated from the endometria of women with and without endometriosis and incubated in vitro with different inducers of the cAMP and progesterone receptor signaling pathway involved in this process. The successful induction of decidualization was checked on the basis of morphological, molecular and biochemical parameters. While the progestins progesterone and MPA did not induce any functional markers of decidualization, those were significantly increased by stimulating the cAMP signaling pathway with 8-Br-cAMP or the adenylate cyclase activator forskolin and even more increased by simultaneous application of MPA, but not of progesterone. In contrast to 8-Br-cAMP, treatment with forskolin induced a significantly lower decidualization reaction. However, the forskolin-induced decidualization significantly increased by addition of the PDE-inhibitors milrinone or rolipram in the hESCs of both patient cohorts. This was additionally significantly increased by the simultaneous treatment with MPA, but not by the additional incubation with hCG or relaxin as ligands of G protein-coupled receptors. The decidualization reaction was accompanied by an increase in transcription factors involved in this process, with a significant increase in transcription for FOXO1 in parallel to an increase in prolactin secretion. These results carved out in vitro were examined in vivo in a humanized endometriosis mouse model after transplantation of human eutopic endometrium into the murine peritoneal cave. Here, no clearly morphologically decidualized areas were detected in the endometrial lesions after treatment of mice for 6 days, but an incipient decidualization reaction could be observed at the molecular level in ectopic human endometrium transplants. However, further analysis of larger number of samples is required to identify the optimal combination of substances and duration of treatment. This can constitute a basis for the development of innovative drug therapy approaches to prevent and/or treat endometriosis.

Abkürzungsverzeichnis

AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CAM	Chicken chorioallantoic membrane model
cAMP	zyklisches Adenosintriphosphat
cDNA	complementary DNA
CEBP β	CCAAT/enhancer binding protein beta
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Zyklooxygenasen
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbant Assay
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	fibroblast growth factor
FSC	Forward scatter
FOXO1	Forkhead box O1
FW	Forward Primer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GR	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunde
HAND2	Heart and Neural Crest derivatives expressed 2
HRP	horseradish peroxidase
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
HSD17B2	17 β hydroxyteroid Dehydrogenase 2 Enzym
IGFBP-1	Insulin like growth factor binding protein 1
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
L	Liter
LH	Lutenisierendes Hormon
M	Molar
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolal
nm	Nanometer
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

nM	Nanomolar
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
pK-Wert	negative dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Rv	Reverse Primer
s	Sekunde/n
s.c.	subkutan
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SF1	Steroidogene Faktor 1
siRNA	small-interfering RNA
SSC	Sideward scatter
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
U	Unit
TEMED	Tetramethylethyleldiamin
V	Volt
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
8-Br-cAMP	8-Brom zyklisches Adenosinmonophosphat
1x	einfach konzentriert
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
x g	relative Zentrifugalkraft
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Endometrium im Menstruationszyklus	19
Abbildung 2: Schematische Darstellung von möglichen Lokalisationen von Endometrioseläsionen (A) und laparoskopischer Befund eines peritonealen Endometrioseherdes (B; Pfeil).....	20
Abbildung 3: Zusammenfassung von möglichen Mechanismen der Initiation und Progression der Endometriose	24
Abbildung 4: Histologie des Endometriums während proliferativer und sekretorischer Phase des Menstruationszyklus	32
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Beteiligung des Progesteronrezeptor- und cAMP-vermittelten Signalweges an der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen.....	34
Abbildung 6: Längenstandard für die Agarosegelelektrophorese (A) und zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in einer SDS-PAGE (B)	47
Abbildung 7: Zeitachse der Substanzapplikation in Nacktmäusen	59
Abbildung 8: Exemplarische Elektrophorese von isolierter Gesamt-RNA in einem 1-%-igem Agarosegel	64
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung einer Ponceau S-Färbung von Gesamtprotein auf einer Nitrozellulosemembran nach einem Western blot mit aufgetragenem Längenstandard (links)	73
Abbildung 10: Exemplarischer Dotplot nach Durchflusszytometrie.....	76
Abbildung 11: Western blot-Analyse der Proteinexpression der Progesteronrezeptoren PRA und PRB sowie des Glukokortikoidrezeptors (GR) im nativem eutopem Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose	79
Abbildung 12: Vergleich der Progesteron- (PRA und PRB) sowie Glukokortikoid- (GR) Rezeptormenge im nativem eutopen Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose	80
Abbildung 13: Morphologische Dezidualisierung von hESCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von 8-Br-cAMP (cAMP) oder Forskolin alleine und in Kombination mit MPA	83
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Messung der Zellgröße sowie -granularität nach Behandlung von hESCs mit verschiedenen Konzentrationen von 8-Br-cAMP und Forskolin alleine oder in Kombination mit MPA	85

Abbildung 15: Prolaktinkonzentration im Mediumüberstand nach Induktion der Dezidualisierung von hESCs durch verschiedene Konzentrationen von 8-Br-cAMP und Forskolin alleine oder in Kombination mit MPA	87
Abbildung 16: Vergleich der Prolaktinsekretion von hESCs nach Induktion der Dezidualisierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von MPA und Progesteron	89
Abbildung 17: Behandlungen mit Forskolin alleine oder in Kombination mit Progestinen führen zu einer deutlich geringeren Prolaktinsekretionen von hESCs im Vergleich zu entsprechenden 8-Br-cAMP-Behandlungen	91
Abbildung 18: Transkription Dezidualisierungs-spezifischer Transkriptionsfaktoren in hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose nach Behandlung mit Progesteron und MPA sowie 8-Br-cAMP und Forskolin alleine oder in Kombination	94
Abbildung 19: Western blot-Analyse der Proteinexpression des Transkriptionsfaktors FOXO1 nach Behandlung von hESCs mit 8-Br-cAMP und Forskolin alleine und in Kombination mit MPA oder Progesteron	96
Abbildung 20: Analyse der Prolaktinsekretion von hESCs nach Behandlung mit Liganden des G-Protein gekoppelten Rezeptors und PDE-Inhibitoren ± MPA	98
Abbildung 21: Effekt von PDE-Inhibitoren und Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf die Forskolin-induzierte Dezidualisierung der hESCs.....	99
Abbildung 22: Expression Dezidualisierungs-assoziiertes Transkriptionsfaktoren in hESCs nach Behandlung mit Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors und PDE-Inhibitoren in Kombination mit Forskolin	101
Abbildung 23: Synergistischer Effekt von PDE-Inhibitoren und MPA auf die Forskolin-induzierte Dezidualisierung von hESCs	104
Abbildung 24: Relative Expression von Transkriptionsfaktoren nach Induktion der Dezidualisierung von hESCs mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA	108
Abbildung 25: Western blot für das FOXO1 Protein nach kombinierter Behandlung der hESCs mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA	110
Abbildung 26: Quantifizierung des AKT1 Proteins sowie des Phosphorylierungsstatus von FOXO1 und AKT1 nach Behandlung mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA.....	112
Abbildung 27: Effekt der Behandlung von hESCs mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA alleine oder in Kombination auf die Transkription unterschiedlicher Isoformen von PDE3 und PDE4	115
Abbildung 28: Histologische Untersuchung der in den <i>in vivo</i> Versuchen eingesetzten eutopen humanen Endometriumgewebe.....	118

Abbildung 29: Western blot-Analyse für die Progesteronrezeptoren (PRA und PRB) und den Glukokortikoidrezeptor (GR) in den für die in vivo Versuche verwendeten eutopen humanen Endometrien	119
Abbildung 30: Makroskopisches Erscheinungsbild der humanen endometrialen Gewebefragmente vor Transplantation, angenäht am Peritoneum sowie nach Entnahme aus der Nacktmaus	121
Abbildung 31: Gewichte der ektopen Endometriumfragmente nach 6-tägiger Kultur in unterschiedlich behandelten Nacktmäusen	122
Abbildung 32: Histomorphologie der ektopen humanen Endometriumfragmente nach Transplantation in Nacktmäuse und 6-tägiger Behandlung mit Forskolin, Rolipram und MPA alleine oder in Kombination	123
Abbildung 33: Überprüfung der Humanspezifität verwendeter Primer mittels RT-PCR.....	125
Abbildung 34: <i>Realtime</i> -PCR-Analyse der relativen Expression von Dezidualisierungs-spezifischen Faktoren in humanen ektopen Endometriumfragmenten nach Transplantation in Nacktmäuse und 6-tägiger Behandlung mit Forskolin, Rolipram und MPA alleine oder in Kombination	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen für die <i>Realtime</i> -PCR	44
Tabelle 2: Trenn- und Sammelgelansatz (1x) für Tricingele der SDS-PAGE.....	46
Tabelle 3: Für die <i>in vitro</i> Versuche verwendetes Endometriumgewebe von Patientinnen ohne und mit Endometriose	51
Tabelle 4: Für das <i>in vivo</i> Endometriose Mausmodell verwendetes Endometriumgewebe.....	52
Tabelle 5: Lösungsmengen zum Passagieren von hESCs	55
Tabelle 6: Eingesetzte Substanzkonzentrationen/ <i>Well</i> mit zugehörigen Lösungsmittelkontrollen	57
Tabelle 7: Zusammensetzung und Verabreichungsform der Testsubstanzen für 6 parallel behandelte Nacktmäuse	60
Tabelle 8: HE-Färbung von Gewebeschnitten	61
Tabelle 9: Ansatz (1x) für die Reverse Transkription	65
Tabelle 10: Thermocyclerbedingungen für die Reverse Transkription	66
Tabelle 11: 1x Ansatz für die <i>Realtime</i> -PCR im qTOWER ³ G	67
Tabelle 12: Verwendete Primermixe für die <i>Realtime</i> -PCR	67
Tabelle 13: Bedingung der <i>Realtime</i> -PCR im qTOWER ³ G	68
Tabelle 14: Ansatz (1x) für RT-PCR mittels Bio-Rad Thermocycler	70
Tabelle 15: Bedingung zur Durchführung einer RT-PCR im Bio-Rad Thermocycler	70
Tabelle 16: Verwendete Primärantikörper für den Western blot	75

1. Einleitung

1.1. Endometrium und Menstruationszyklus

Das Endometrium ist ein dynamisches Gewebe und bildet die innerste Schicht des Uterus (Jain et al. 2022). Es besteht aus dem *Stratum functionale* (Funktionalis), welches während der Menstruation abgestoßen wird sowie dem darunter liegenden *Stratum basale* (Basalis) (Pfisterer et al. 2006). Die Basalis liegt dem Myometrium direkt auf und bleibt während der Menstruation erhalten. Aus dieser regeneriert sich in jedem Zyklus die Funktionalis (Jain et al. 2022; Weston und Rogers 2000). Das Endometrium setzt sich zusammen aus einem hochprismatischen Oberflächenepithel, das sich in die endometrialen Drüsen fortsetzt sowie dem Stroma, das von den Spiralarterien durchzogen wird (Ulfig 2019; Jain et al. 2022). Die zirkulierenden ovariellen Steroidhormone Östrogen und Progesteron regulieren die Funktion des Endometriums, wobei die dynamischen Veränderungen innerhalb des Gewebes der Vorbereitung sowie Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft dienen (Jain et al. 2022; Maybin und Critchley 2015; Hawkins und Matzuk 2008). Kommt keine Schwangerschaft zustande, tritt die Menstruation ein und der Zyklus beginnt erneut (Hawkins und Matzuk 2008).

Der Menstruationszyklus umfasst ca. 28 Tage und wird in die proliferative (Follikelphase) sowie die sekretorische Phase (Lutealphase) unterteilt (Hawkins und Matzuk 2008; Farage et al. 2009). Der erste Tag des Zyklus wird durch die einsetzende Menstruation gekennzeichnet (Hawkins und Matzuk 2008; Farage et al. 2009), die zwischen 4-6 Tagen andauern kann (Farage et al. 2009). Bis zum Tag 14 des Zyklus (erste Hälfte) beginnt das Endometrium unter dem dominierenden Einfluss von Östrogen, welches von den heranwachsenden Follikeln produziert wird, zu wachsen (Farage et al. 2009). Das Stroma sowie die endometrialen Drüsen proliferieren und die Spiralarterien verlängern sich (Hawkins und Matzuk 2008). Die steigende Serum-Östrogenkonzentration in der proliferativen Phase sorgt für eine Rückkopplung zur Hypophyse, die wiederum das luteinisierende Hormon (LH) ausschüttet. Der LH-Peak führt zur Ovulation und leitet die zweite Hälfte des Zyklus ein (Hawkins und Matzuk 2008; Farage et al. 2009). Die Ovulation führt zur Bildung des *Corpus Luteum*, welches das in der Sekretionsphase dominierende Hormon Progesteron sezerniert (Farage et al. 2009). Während dieser Phase durchlaufen die endometrialen Stromazellen

morphologische und funktionelle Veränderungen, die dem Prozess der Dezidualisierung zugrunde liegen (Jain et al. 2022; Maybin und Critchley 2015). In Abwesenheit einer Schwangerschaft kommt es in der späten Sekretionsphase zum Abbau des *Corpus Luteum* und damit zu einem Abfall des Östrogen- sowie Progesteronlevels (Hawkins und Matzuk 2008). Als Konsequenz des Rückgangs von Progesteron brechen die Spiralarterien auf, es kommt zum Einsetzen der Menstruation und zur Abstoßung der Funktionalis (Maybin und Critchley 2015). In Abbildung 1 wird der Ablauf des Menstruationszyklus schematisch dargestellt.

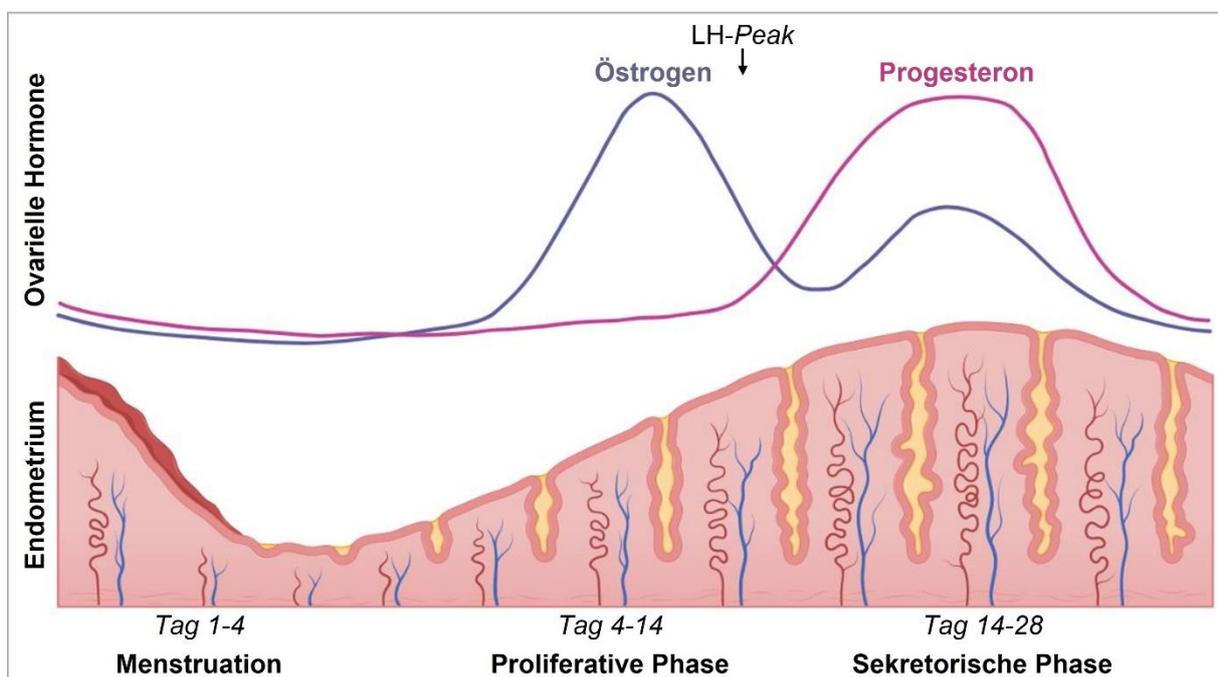


Abbildung 1: Das Endometrium im Menstruationszyklus

In der proliferativen Phase des Menstruationszyklus (Tag 4-14) baut sich das Endometrium unter Östrogeneinfluss auf. Der LH-Peak leitet die sekretorische Phase ein, die durch das Hormon Progesteron dominiert wird. Diese Phase beinhaltet den Prozess der Dezidualisierung. Wenn keine Schwangerschaft eintritt, kommt es zum Rückgang von Progesteron, zur Abstoßung des Endometriums während der Menstruation und der Zyklus beginnt von vorne. (Eigene Illustration in Anlehnung an Maybin und Critchley 2015; Farage et al. 2009; erstellt mit BioRender.com)

Der Menstruationszyklus ist somit ein Vorgang, bei dem es zu einem zyklischen Aufbau sowie der folgenden Abstoßung des endometrialen Gewebes kommt und der durch eine Balance von Proliferation und Dezidualisierung gekennzeichnet ist (Jain et al. 2022). Störungen in diesem Zusammenspiel von hormonellen und zellulären Veränderungen können nicht nur einer Schwangerschaft hinderlich sein, sondern auch gynäkologische Krankheiten wie beispielsweise die Endometriose begünstigen.

1.2. Endometriose

1.2.1. Epidemiologie und Pathogenese

Weltweit leiden 5-10 % der Frauen im reproduktiven Alter an Endometriose (Zondervan et al. 2018; Zondervan et al. 2020; Giudice 2010; Bulun 2009; Greene et al. 2016; Donnez und Dolmans 2021), was etwa 176-190 Millionen Frauen umfasst (Zondervan et al. 2018; Becker et al. 2022; Zondervan et al. 2020; Gemmell et al. 2017). In Deutschland wurden im Jahr 2017 28.000 Frauen aufgrund der Diagnose Endometriose klinisch behandelt (www.endometriose-vereinigung.de), mit jährlich ca. 40.000 Neuerkrankungen (www.endometriose-vereinigung.de; www.endometriose-sef.de). Damit stellt die Endometriose die zweithäufigste benignen proliferative gynäkologische Erkrankung nach den Myomen dar (www.endometriose-vereinigung.de; www.endometriose-sef.de). Endometriose wird durch das Auftreten von endometrialem Gewebe außerhalb des *Cavum uteri* charakterisiert, wobei sich diese Endometrioseherde/-läsionen vor allem im Beckenbereich, an der Außenseite des Uterus, den Ovarien sowie der peritonealen Oberfläche der Bauchwand und des Darms und der Blase ansiedeln (Zondervan et al. 2018; Zondervan et al. 2020; Giudice 2010; Bulun 2009; Greene et al. 2016; Donnez und Dolmans 2021; Becker et al. 2022; Gemmell et al. 2017). Dort führen sie unter anderem zu chronischen Unterbauchschmerzen sowie Subfertilität (Zondervan et al. 2020; Giudice 2010). Die schematische Darstellung in Abbildung 2 verdeutlicht die möglichen Lokalisationen für Endometrioseherde und zeigt ein Beispiel eines peritonealen Endometrioseherdes.

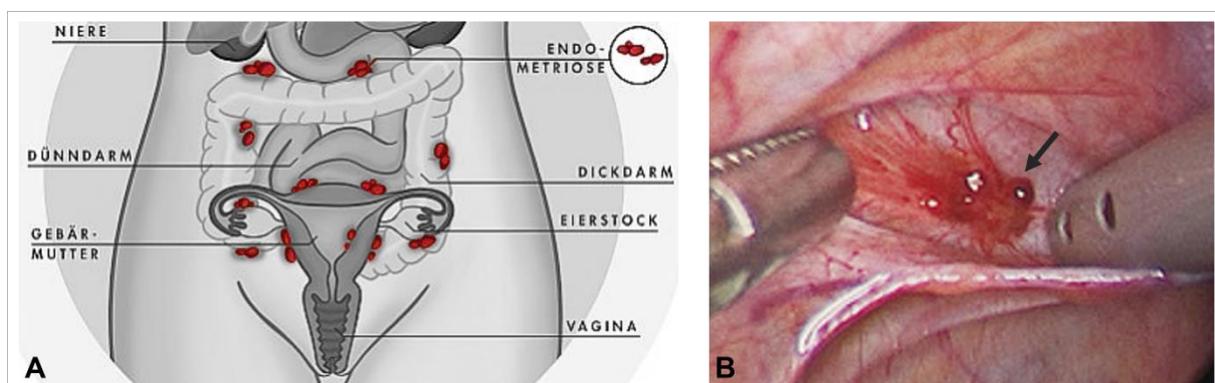


Abbildung 2: Schematische Darstellung von möglichen Lokalisationen von Endometrioseläsionen (A) und laparoskopischer Befund eines peritonealen Endometrioseherdes (B; Pfeil)

A: modifiziert nach www.endometriose-vereinigung.de, B: Zondervan et al. 2020

Die Endometrioseläsionen werden, basierend auf ihrer Lokalisation, in drei Typen unterschieden: peritoneal, ovarial und tief infiltrierend. Zusätzlich wird auch nach den Richtlinien der *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) klassifiziert (American Society for Reproductive Medicine 1997). Diese Klassifizierung unterteilt die Erkrankung in vier Stadien (I $\hat{=}$ minimal, II $\hat{=}$ gering, III $\hat{=}$ moderat, IV $\hat{=}$ schwer) und umfasst dabei die Anzahl, Typen sowie die Größe der Läsionen (Zondervan et al. 2018; American Society for Reproductive Medicine 1997). Darüber hinaus kann auch die Aktivität der Läsionen mit einbezogen werden. Aktive Läsionen, auch rote Läsionen genannt, zeichnen sich durch ihre Gefäßbildung sowie mitotische Aktivität aus, während weiße Läsionen geringe Mitoseraten aufweisen und schwarze Läsionen von fibrotischem Gewebe umgeben sind (Zondervan et al. 2020; Fraser 2008; Nisolle und Donnez 1997).

Bis heute ist die Pathogenese der Erkrankung Endometriose nicht vollends geklärt. Mögliche Ursprünge der Endometriose werden mit der Metaplasietheorie, der lymphatischen und vaskulären Metastasierung und/oder der Implantationstheorie erklärt (Zondervan et al. 2020). Entsprechend der Metaplasietheorie differenzieren sich mesotheliale Zellen innerhalb der Peritonealhöhle unter dem Einfluss von verschiedenen hormonellen und parakrinen Stimuli (Ahn et al. 2015) in Endometrium-ähnliches Gewebe (Bulun 2009; Matsuura et al. 1999). Hierbei könnten auch von den durch die retrograde Menstruation in die Bauchhöhle gelangten endometrialen Stromazellen sezernierte Wachstumsfaktoren und Zytokine beitragen (Matsuura et al. 1999). Darüber hinaus werden Müllergangsdefekte diskutiert (Zondervan et al. 2020; Nisolle und Donnez 1997), wobei Läsionen aus Zellen entstehen, die im Zuge der embryonalen Entwicklung zurückbleiben und beispielsweise auf einen Östrogenstimulus reagieren (Ahn et al. 2015). Die Metaplasietheorie unterstützt zudem das seltene Auftreten von Endometrioseherden nach Verabreichen von Östrogen beim Mann (Pinkert et al. 1979). Eine Erklärung für das Auftreten von endometrialem Gewebe außerhalb der Peritonealhöhle an weiter entfernten Orten, liefert die lymphogene und hämatogene Metastasierung. Dabei können endometriale Zellen über die Lymph- sowie die Blutgefäße transportiert werden und sich an entfernter gelegenen Lokalisationen ansiedeln (Zondervan et al. 2020; Ahn et al. 2015; Macer und Taylor 2012; Bulun 2009). Die bekannteste und akzeptierteste Theorie für die Entstehung der Endometriose geht auf die Implantationstheorie von Sampson zurück (Sampson 1927). Diese besagt, dass es während der Menstruation zu einem

Rückfluss von menstruellem Endometriumgewebe und endometrialen Zellen über die Eileiter in die Peritonealhöhle kommen kann (Zondervan et al. 2020; Kapoor et al. 2021; Macer und Taylor 2012; Bulun 2009). Die uterinen Zellen können sich dann an das Peritoneum anheften, eine Angiogenese induzieren und proliferieren (Macer und Taylor 2012). Unterstützt wird diese Theorie zum einen durch das Vorkommen von gleichen somatischen genetischen Mutationen in den Läsionen wie in dem eutopen Endometrium (Zondervan et al. 2020; Suda et al. 2018). Zum anderen wird diese Theorie durch Studien untermauert, die zeigen, dass ein blockierter Menstruationsabfluss ein gesteigertes Risiko zur Entwicklung einer Endometriose bildet. Diese Beobachtungen wurden in einem Pavian Endometriose Modell bestätigt (Zondervan et al. 2020; Ahn et al. 2015). Endometriose kann sich außer beim Menschen auch spontan in nicht humanen Primaten wie Rhesusaffen und Pavianen entwickeln (Malvezzi et al. 2020; D'Hooghe und Debrock 2002). In weiblichen Pavianen traten bei Tieren mit Endometriose häufiger retrograde Menstruationen (83 %) im Vergleich zu den Tieren ohne Endometriose (51 %) auf (Zondervan et al. 2018). Zudem konnte bei diesen Tieren eine gesteigerte Prävalenz zur Entwicklung einer spontanen Endometriose nach zervikaler Obstruktion gezeigt werden (D'Hooghe und Debrock 2002). Dies unterstützt die Theorie der retrograden Menstruation. Jedoch zeigen 90 % der Frauen im reproduktiven Alter eine retrograde Menstruation in die Peritonealhöhle, während nur ca. 10 % eine Endometriose entwickeln (Zondervan et al. 2018; Fraser 2008; Malvezzi et al. 2020; Smolarz et al. 2021). Das lässt vermuten, dass weitere assoziierte Faktoren an der Entstehung der Endometriose beteiligt sind und es sich somit um eine multifaktorielle Pathogenese handelt (Kapoor et al. 2021; Macer und Taylor 2012).

In der Literatur gibt es darüber hinaus Hinweise darauf, dass endometriale Stamm- und Vorläuferzellen, welche im eutopen Endometrium vorkommen, nach retrograder Menstruation eine Rolle bei der Entwicklung von endometrialen Läsionen spielen können (Zondervan et al. 2020). Zudem gibt es Studien, die eine Möglichkeit der Differenzierung von Knochenmarks-abgeleiteten Stammzellen in endometriale Zellen diskutieren (Macer und Taylor 2012). Des Weiteren zeigen endometriale Stromazellen von Frauen mit Endometriose aufgrund geänderter Integrinprofile eine adhäsive Fähigkeit, wobei eine lokale Entzündungsreaktion bei einer Endometriose eine zelluläre Adhäsion begünstigt (Zondervan et al. 2020). Entzündungsreaktionen gehören zu den Merkmalen von endometriotischen Läsionen und können mit einer

gesteigerten Produktion von Prostaglandinen, Metalloproteinasen, Zytokinen und Chemokinen assoziiert sein (Zondervan et al. 2018; Zondervan et al. 2020; Kapoor et al. 2021; Bulun 2009). Gesteigerte Level von Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor (TNF) führen hierbei vermutlich zu einer gesteigerten Adhäsion von endometrialen Fragmenten im Peritonealraum (Bulun 2009).

Die lokale Aktivität und Effizienz natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) kann ebenfalls in Endometriosepatientinnen beeinträchtigt sein, was dazu führen kann, dass die NK-Zellen eine reduzierte Fähigkeit besitzen die Peritonealhöhle von endometrialen Zellen nach retrograder Menstruation zu befreien (Zondervan et al. 2020; Kapoor et al. 2021; Smolarz et al. 2021). Der Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) als Teil des angeborenen Immunsystems kontrolliert u. a. die Zytokinproduktion und das Zellüberleben (Kapoor et al. 2021; Smolarz et al. 2021). Expressionsänderungen dieses Transkriptionsfaktors tragen ebenfalls zur Pathogenese der Endometriose bei (Zondervan et al. 2018; Kapoor et al. 2021). Erhöhte Level des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose korrelieren mit der Bildung und dem Wachstum von neuen Gefäßen in den Läsionen und können damit einen kritischen Schritt in der Pathogenese der Endometriose darstellen (Smolarz et al. 2021; McLaren et al. 1996).

Östrogen und Progesteron gelten als Masterregulatoren des endometrialen Gewebes (Bulun et al. 2012). Physiologisch ausbalancierte Level dieser Hormone tragen zur korrekten Physiologie und Funktion des Endometriums bei (Kapoor et al. 2021). Fehlregulationen der Östrogen- und Progesteronwirkung resultieren in einem Östrogenüberschuss und/oder einer Progesteronresistenz und damit in einer fehlerhaften Differenzierung des Endometriums (Kapoor et al. 2021). Fehlregulationen der Progesteronrezeptoren können zu einer Störung im Progesteronsignalweg in eutopem und ektopem Endometrium führen (Zondervan et al. 2018), wodurch z. B. die Katalyse von Östradiol in eine weniger aktive Form durch das Progesteron-abhängige 17 β -hydroxysteroid Dehydrogenase 2 Enzym (HSD17B2) nicht gegeben ist (Bulun 2009). Das wiederum resultiert in einem gesteigerten Östrogenlevel (Donnez und Dolmans 2021). Zudem sorgt die Hochregulation des Steroidogenen Faktors 1 (SF1) für eine gesteigerte Transkription der Aromatase und somit für ein erhöhtes östrogenes Milieu in den endometrialen Stromazellen (Zondervan et al. 2018). Die erhöhte Östrogenkonzentration führt zum Überleben und zur Persistenz des ektopen

endometrialen Gewebes (Bulun 2009). Eine gesteigerte Östrogenrezeptor β - (Er β -) Expression, welche ebenfalls in den ektopen Läsionen beschrieben wurde (Kapoor et al. 2021; Smolarz et al. 2021), übt wiederum einen Einfluss auf die Prostaglandinsynthese aus (Kapoor et al. 2021). Prostaglandine und Zytokine rufen Schmerz- und Entzündungsreaktionen hervor (Bulun 2009) und beugen Apoptose vor (Kapoor et al. 2021). Darüber hinaus aktiviert der ER β die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), was die Entwicklung der endometrialen Zellen hin zu Läsionen fördert (Kapoor et al. 2021). Zusätzlich werden Hypermethylierungen der CpG-Inseln der E-Cadherin Promotorregion diskutiert, die ebenfalls eine EMT im endometrialen Epithel fördern (Zondervan et al. 2018). Im gesunden Endometrium steigt während der späten sekretorischen Phase des Zyklus die Menge apoptotischer Proteine an. Das eutope Endometrium von Endometriosepatientinnen zeigt hingegen keinen Anstieg apoptotischer Proteine, was vermuten lässt, dass hier die Apoptose inhibiert ist und das Zellüberleben der endometrialen Zellen an ektopen Stellen begünstigt wird (Kapoor et al. 2021). Kapoor et al. (Kapoor et al. 2021) fassten einige der oben beschriebenen Punkte schematisch zusammen (Abbildung 3).

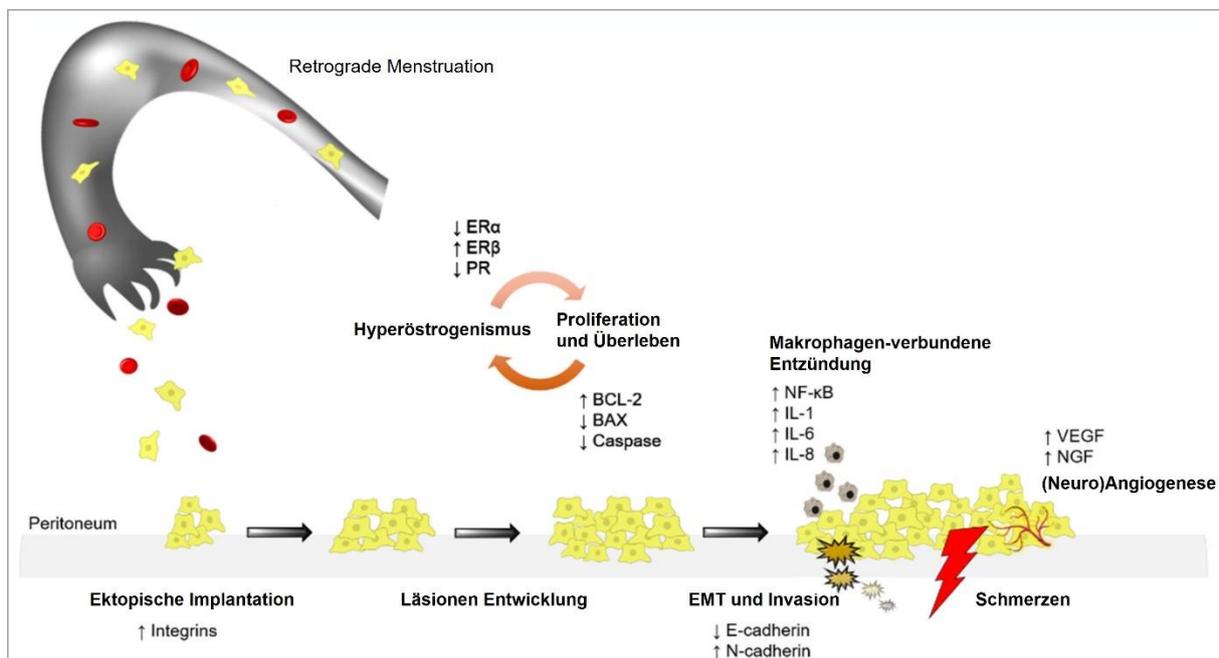


Abbildung 3: Zusammenfassung von möglichen Mechanismen der Initiation und Progression der Endometriose

Durch retrograde Menstruation gelangt endometriales Gewebe an ektipe Regionen wie dem Peritoneum, wobei die gesteigerte Expression von Integrinen eine Implantation begünstigen kann. Der in einigen Endometriosepatientinnen beobachtete hyper-östrogene Zustand fördert das Überleben und die Proliferation der Zellen, was wiederum zur Entstehung und zum Fortschreiten von Läsionen führt. Die steigende Anzahl von

Makrophagen-assoziierten Entzündungsfaktoren kann eine EMT triggern, die Invasion sowie die Angiogenese und das damit verbundene Wachstum der Läsionen fördern. Abbildung verändert nach Kapoor et al. 2021.

Zudem werden genetische Faktoren in Bezug auf die Entwicklung der Endometriose diskutiert (Zondervan et al. 2020; Smolarz et al. 2021). In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass eine erbliche Komponente in fast 50 % der Fälle vorliegt (Saha et al. 2015; Zondervan et al. 2020; Smolarz et al. 2021). Außerdem wurden in genomweiten Studien Polymorphismen analysiert, die in Bezug zur Endometriose und den damit verbundenen Schmerzen stehen (Zondervan et al. 2020; Smolarz et al. 2021). In Studien mit Patientinnen mit tief infiltrierenden Läsionen konnten zudem Mutationen beschrieben werden, die im Zusammenhang mit einer Gruppe von Proto-Onkogenen stehen (Smolarz et al. 2021). Somit lassen sich auch mögliche höhere Risiken einer malignen Entartungen der ektopen Zellen nicht ausschließen (Zondervan et al. 2020; Smolarz et al. 2021).

1.2.2. Klinische Symptome und Diagnose

Der Großteil der Endometriosed Diagnosen werden bei Frauen zwischen Menarche und Menopause gestellt, wobei jedoch auch Fälle nach der Menopause bekannt sind (Smolarz et al. 2021). Bei 66 % der Frauen mit Endometriose treten die ersten Symptome noch vor dem zwanzigsten Lebensjahr auf (Smolarz et al. 2021). Das Auftreten endometrialen Gewebes außerhalb des Uterus kann zu vielfältigen Symptomen führen und der Krankheitsverlauf muss nicht bei allen betroffenen Frauen gleich ablaufen. Oftmals korreliert die Intensität der Symptome nicht mit dem Grad der Krankheitsausprägung, da einige Patientinnen mit diagnostiziertem Stadium I auch schwere Schmerzsymptome sowie Infertilität und umgekehrt Frauen mit höheren Stadien leichte Schmerzsymptome aufweisen können (Zondervan et al. 2018; Giudice 2010; Greene et al. 2016). Neben einem unregelmäßigen Zyklus (10-20 %), Dyschezie, Diarrhoe und Dysuria (1-2 %), leiden viele betroffene Frauen an Schmerzsymptomen, welche Dysmenorrhoe (60-80 %), chronische Unterbauschmerzen (40-50 %) und Dyspareunie (40-50 %) umfassen (Fraser 2008; Bulletti et al. 2010). Darüber hinaus gibt es eine 6-8-mal höhere Wahrscheinlichkeit eine Endometriose in infertilen Frauen vorzufinden als in fertilen Frauen (Bulletti et al. 2010), wobei bei an Endometriose erkrankten Frauen unter 35 Jahren eine Infertilität in 30-50 % der Fälle auftritt (Zondervan et al. 2018; Smolarz et al. 2021; Bulletti et al.

2010). Hierbei können Adhäsionen und vernarbte Eileiter, Entzündungsreaktionen im Beckenbereich, geänderte Immunfunktionen sowie eine Beeinträchtigung der Embryoimplantation und der Oozytenqualität eine Rolle spielen (Smolarz et al. 2021). Jedoch kann die Ursache der Infertilität nicht immer vollends geklärt und damit auf das Vorhandensein einer Endometriose zurückgeführt werden (Zondervan et al. 2018; Smolarz et al. 2021).

Die Endometriose ist nach wie vor schwierig zu diagnostizieren, da bisher keine eindeutigen Biomarker bekannt sind (Smolarz et al. 2021) und es sich vorherrschend um intraabdominale Lokalisationen der Läsionen, oftmals von geringer Größe, handelt (Zondervan et al. 2020). Dabei kann es zu einer verspäteten Diagnose von 8-10 Jahren nach Auftreten der Symptome kommen (Gemmell et al. 2017; Ahn et al. 2017). Aktuell gehört eine ausführliche gynäkologische Untersuchung sowie das Abklären der medizinischen Historie und Ultraschalluntersuchungen zum diagnostischen Vorgehen bei einem Verdacht auf Endometriose (Smolarz et al. 2021). Zusätzlich können auch Magnetresonanztomographien durchgeführt werden (Giudice et al. 2012; Smolarz et al. 2021), jedoch wird die Diagnose der Endometriose durch die Visualisierung der Läsionen in einer laparoskopischen Untersuchung und einer histopathologischen Analyse von Gewebeproben als Goldstandard angesehen (Giudice 2010; Smolarz et al. 2021; Fraser 2008; Zondervan et al. 2018) .

Die ausgeprägten Schmerzsymptome sowie eine möglicherweise verbundene Infertilität und die verspätete Diagnose der Erkrankung führen nicht nur zu gesteigerten ökonomischen Kosten, sondern auch zu einer reduzierten Lebensqualität der betroffenen Frauen mit physischem, psychischem sowie sozialem Leid (Simoens et al. 2007; Simoens et al. 2012; Nnoaham et al. 2011).

1.2.3. Therapien und Forschungsansätze

Die Behandlung der Endometriose stellt aufgrund ihres chronisch verlaufenden Charakters eine medizinische Herausforderung dar. Betroffene Frauen werden chirurgisch, pharmakologisch oder mit einer Kombination aus beidem behandelt (Smolarz et al. 2021). Die chirurgische Entfernung der Läsionen zielt dabei vor allem auf die Reduktion des Endometriose-assoziierten Schmerzes ab (Giudice 2010), wobei im ersten Jahr eine Schmerzlinderung in 50-95 % der Nachbeobachtungen

beschrieben wurde (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2014). Hierbei wird einer Laparoskopie vor einer Laparotomie der Vorzug gegeben, um zusätzlichen operativen Schmerzen sowie einer verlängerten Hospitalisierung und langsameren Erholung entgegenzuwirken (Kalaitzopoulos et al. 2021). Häufig wiederkehrende operative Eingriffe sollten allerdings vermieden werden, da sich hierdurch das Risiko für Vernarbungen erhöht und die ovarielle Funktion eingeschränkt werden kann (Kalaitzopoulos et al. 2021; Zondervan et al. 2018). Eine Hysterektomie mit bilateraler Salpingektomie wird als letzte Behandlungsoption bei Frauen mit anhaltenden Symptomen und vollendeter Familienplanung in Betracht gezogen, wenn alle anderen Therapien gescheitert sind (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2014).

Es bleibt jedoch anzumerken, dass der operative Eingriff zur Entfernung der endometrialen Läsionen nicht zu einer Heilung der Erkrankung führt, da ein erneutes spontanes Auftreten einer Endometriose nach chirurgischen Behandlungen bei 40-50 % der Patientinnen innerhalb von 5 Jahren beobachtet wird (Guo 2009; Zakhari et al. 2021). Da eine Operation den Schmerz nicht in allen Frauen reduziert (Zondervan et al. 2020) und es bisher keine ursächliche Behandlungsmöglichkeit gibt, werden betroffene Frauen zusätzlich medikamentös zur Reduktion der Schmerzsymptomatik (Smolarz et al. 2021; Falcone und Flyckt 2018) sowie der endometrialen Läsionen behandelt (Zondervan et al. 2020; Giudice 2010; Bulun 2009; Greene et al. 2016). Hierfür werden orale Kontrazeptiva, Progesteron, Danazol, GnRH-Agonisten/Antagonisten, NSAIDs oder Aromatase-Hemmer eingesetzt (Zondervan et al. 2020; Giudice 2010; Bulun 2009; Greene et al. 2016; Fraser 2008; Kalaitzopoulos et al. 2021; The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2014).

Da es sich bei der Endometriose um eine Östrogen-abhängige Erkrankung handelt (Zondervan et al. 2018; Mehedintu et al. 2014) und oftmals ein Östrogenüberschuss in ektopen Läsionen vorherrscht (Kapoor et al. 2021), fokussieren sich die meisten medikamentösen Behandlungen auf die Induktion eines hypo-östrogenen oder hyperprogesteronen Zustands (Zondervan et al. 2018). Die Verwendung von Progestinen wird in vielen Fällen als *first-line* Therapie zur Behandlung von Schmerzen angesehen (Kalaitzopoulos et al. 2021). Progestine, wie Dienogest oder Medroxyprogesteronacetat können durch Bindung an den Progesteronrezeptor an der Reduktion des Östrogenlevels mitwirken (Kalaitzopoulos et al. 2021) und zudem die Dezidualisierung

oder die Atrophie der ektopen Läsionen auslösen (Falcone und Flyckt 2018). Hierunter fällt auch die Behandlung mit Kontrazeptiva, welche Östrogen-Gestagen basiert sind und den FSH-Spiegel reduzieren (Greene et al. 2016; Falcone und Flyckt 2018). Sie reduzieren die Stärke der Menstruationsblutung (Mehedintu et al. 2014) und führen ebenfalls zu einem Rückgang der Dysmenorrhoe und der Endometriose-assoziierten Schmerzen (Zondervan et al. 2020; Bulun 2009; Greene et al. 2016; Kalaitzopoulos et al. 2021; Falcone und Flyckt 2018), sind jedoch ungeeignet für Frauen mit Kinderwunsch (Zondervan et al. 2020). Zudem kann es nach Absetzen der Kontrazeptiva zu einer erneuten Progression der Erkrankung kommen (Simoens et al. 2007). Darüber hinaus schlägt diese Behandlungsoption in 33 % der Patientinnen nicht an (Donnez und Dolmans 2021).

Neben der Behandlung mit Östrogen und Progestinen werden auch Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)-Agonisten in Patientinnen mit anhaltenden Symptomen nach einer fehlgeschlagenen *first-line* Therapie angewendet (Kalaitzopoulos et al. 2021). GnRH-Agonisten sind in der Lage Endometriose-assoziierte Schmerzen zu reduzieren (Kalaitzopoulos et al. 2021), indem sie die Synthese von hypophysärem endogenen Gonadotropin inhibieren, somit zu einem hypo-östrogenen Zustand führen und für die Unterbrechung des Menstruationszyklus sorgen (Zondervan et al. 2020; Giudice 2010). Die GnRH-Therapie weist jedoch erhebliche Nebenwirkungen auf, da sie zu post-menopausalen Serum-Östrogenkonzentrationen sowie auch zu fortschreitender Osteoporose in 13 % der Patientinnen über einen Zeitraum von 6 Monaten führt (Giudice 2010; Brichant et al. 2021). Aus diesem Grund wird zusätzlich zu dieser Therapieoption eine *Add-back* Therapie mit Östrogen-Progestin-Gabe empfohlen (Giudice 2010; Greene et al. 2016; Brichant et al. 2021). Der Einsatz von GnRH-Antagonisten steht zudem im Fokus der Therapieansätze. Der Wirkstoff Elagolix sorgt beispielsweise innerhalb von 24 h für eine schnelle Inhibition der Gonadotropine (Donnez und Dolmans 2021; Brichant et al. 2021). Des Weiteren bewirkt Elagolix eine dosis-abhängige Reduktion des Östrogenlevels und ist gegen moderate sowie schwere Schmerzsymptome (Dysmenorrhoe, Dyspareunie) bei Endometriose effektiv (Smolarz et al. 2021). Jedoch waren auch hier innerhalb von 12 Monaten Osteoporosesymptome zu verzeichnen (Smolarz et al. 2021; Brichant et al. 2021).

Das synthetische Androgen Danazol wurde über mehrere Jahre als Behandlung bei Endometriose-assoziiertem Schmerz eingesetzt (Giudice 2010; Kalaitzopoulos et al.

2021; Smolarz et al. 2021). Es inhibiert den Anstieg des luteinisierenden Hormons, ist jedoch mit einer androgenen Partialwirkung verbunden und wird somit von einigen Organisationen (z. B. WES, ESHRE, SOGC) nicht über einen längeren Zeitraum empfohlen (Giudice 2010; Kalaitzopoulos et al. 2021; Smolarz et al. 2021).

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug) wie COX-Inhibitoren (Brown et al. 2017) werden vorwiegend zur Behandlung von Dysmenorrhoe eingesetzt (Giudice 2010; Bulun 2009). Diese Inhibitoren hemmen die Zyklooxygenasen (COX), welche an der Prostaglandinsynthese beteiligt sind (Bulun 2009) und gesteigert in Läsionen vorkommen können (Chishima et al. 2002). Somit führen diese Inhibitoren zu einer Reduktion der Prostaglandinsynthese. Prostaglandine sind klinisch relevant, da sie in Entzündungs- und Schmerzprozessen involviert sind und zur Pathogenese der Endometriose aufgrund einer lokal induzierten Östrogenbiosynthese beitragen können (Bulun 2009). NSAIDs können hierbei auch eine kombinierte Verwendung mit oralen Kontrazeptiva finden, führen jedoch in 20-25 % zu einem Misserfolg in der Schmerzreduktion (Giudice 2010). Aufgrund der Nebenwirkungen der COX-Inhibitoren, zu denen eine Steigerung kardiovaskulärer Erkrankungen gehören, wird die Therapie routinemäßig nicht empfohlen (Bulun 2009; Kalaitzopoulos et al. 2021).

Da in endometrialen Läsionen eine gesteigerte Aromataseexpression gefunden wurde (Giudice 2010), die zu einem hyper-östrogenen Status in den ektopen Läsionen führen kann (Zondervan et al. 2018; Bulun et al. 2012), wird in der Literatur ebenfalls der Einsatz von Aromataseinhibitoren für Patientinnen mit anhaltenden Schmerzen und fehlgeschlagener Hormontherapie diskutiert (Zondervan et al. 2020). Dies führt jedoch zu einem deutlich erniedrigten Serum-Östrogenlevel und damit zu starken Nebenwirkungen hinsichtlich der Knochendichte (Zondervan et al. 2020; Giudice 2010; Smolarz et al. 2021).

Die meisten Behandlungen zielen auf das Erreichen eines hypo-östrogenen Zustands ab und greifen somit gravierend in den Hormonhaushalt ein, was wiederum im Widerspruch zu einem Kinderwunsch steht (Simoens et al. 2007; Brichant et al. 2021). Darüber hinaus kann sich eine Wirkung der eingenommenen Medikamente erst mit einer Verzögerung von 6 Monaten einstellen (Simoens et al. 2007). Zudem zeigt sich in Langzeitbehandlungen von Endometriosepatientinnen mit chronischen Schmerzen, dass eine fortwährende medikamentöse Therapie durchgeführt werden muss, wobei wiederkehrende Schmerzen in den meisten Fällen nach 6 bis 12 Monaten zu

verzeichnet sind (Giudice 2010; Simoens et al. 2007). Ebenso zeigt sich in 50 % der Frauen ein erneutes Erscheinen ektopischer Läsionen nach chirurgischer und hormoneller Behandlung innerhalb von zwei Jahren (D'Hooghe et al. 2004). Somit ist es außerordentlich wünschenswert, alternative Therapiestrategien zu entwickeln. Da die Angiogenese einen wichtigen Prozess in der Versorgung der ektopen Läsionen darstellt (Greene et al. 2016; Brichant et al. 2021), wird der Einsatz von VEGF- bzw. Angiogeneseinhibitoren (z. B. Bevacizumab, Endostatin) (Brichant et al. 2021; Mehedintu et al. 2014) diskutiert. Da VEGFs jedoch eine wichtige Rolle im Endometrium sowie während der Embryonalentwicklung spielen (Brichant et al. 2021; Wheeler et al. 2018), ist der Einsatz solcher Substanzen mit hohen Risiken behaftet. Andere Therapieansätze adressieren das Immunsystem, das bei der Entwicklung der Endometriose ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt, da die endometrialen Läsionen inflammatorische Reaktionen hervorrufen können (Zondervan et al. 2020; Kapoor et al. 2021; Smolarz et al. 2021; Brichant et al. 2021; Koch et al. 2018). Somit liegt es nahe, dass in der Literatur auch pharmakologische NF- κ B-Inhibitoren sowie Inhibitoren von weiteren inflammatorischen Molekülen wie Zytokine behandelt werden (Kapoor et al. 2021). Des Weiteren werden Möglichkeiten der Gentherapie erforscht (Mehedintu et al. 2014; Hassan et al. 2009).

Eine entscheidende Rolle bei der Manifestierung ektoper Läsionen spielt das endometriale Stroma (Nisolle et al. 2000). Aufgrund einer möglichen Progesteronresistenz kann in Endometriosepatientinnen eine gestörte Differenzierung der endometrialen Stromazellen vorliegen (Attia 2000; Klemmt et al. 2006), die zu einem verstärkten Überleben und Proliferationspotential der Zellen führen kann (Koch et al. 2018). Die Dezidualisierung wird auch im Zusammenhang mit einer Induktion der Atrophie ektoper Läsionen beschrieben (Koch et al. 2018; Mahmood und Templeton 1990), sodass dieser Differenzierungsprozess eine maßgebliche Rolle in der Entstehung von ektopen Läsionen spielen und als ein weiterer Therapieansatz in Betrachtung gezogen werden kann. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Regulation dieses Differenzierungsprozesses als möglichen Therapieansatz befasst, wird der Prozess der Dezidualisierung im Folgenden näher erläutert.

1.3. Dezidualisierung

1.3.1. Funktion sowie morphologische und biochemische Veränderungen

Der Prozess der Dezidualisierung kennzeichnet die sekretorische zweite Hälfte des Menstruationszyklus (Maybin und Critchley 2015; Hawkins und Matzuk 2008), in der das Endometrium eine dynamische Umgestaltung erfährt, um eine adäquate Umgebung für eine Schwangerschaft zu schaffen (Okada et al. 2018). Die Dezidualisierung des Endometriums ist dabei nur in Spezies zu finden, bei denen die Plazentation ein Durchbrechen des luminalen Epithels sowie eine Invasion des Trophoblasten in das maternale Gewebe erfordert (Gellersen und Brosens 2014). Im Gegensatz zu vielen anderen Spezies erfolgt die Dezidualisierung beim Menschen auch ohne Gegenwart eines Embryos (Gellersen und Brosens 2014; Jain et al. 2022). Eine solche embryo-unabhängige Dezidualisierung findet sich nur in höheren Primaten (Mensch, Menschenaffen, Meerkatzenverwandte), einigen Fledermausarten sowie dem Rüsselspringer (Gellersen und Brosens 2014).

Die Dezidualisierung hat mannigfaltige Funktionen. Sie schützt den Embryo vor dem maternalen Immunsystem und bewirkt die Versorgung des Embryos vor der Entwicklung der Plazenta (Okada et al. 2018). Darüber hinaus reguliert sie die Trophoblastinvasion und stellt die Blutversorgung der Plazenta sicher (Gellersen et al. 2007). Der Anstieg von Progesteron (siehe Abbildung 1), gebildet vom *Corpus Luteum* nach der Ovulation, markiert das Eintreten des Endometriums in den Dezidualisierungsprozess (Jain et al. 2022). Progesteron inhibiert hierbei die proliferative Kapazität des durch das Östrogen-vorbereiteten Endometriums (Gellersen et al. 2007) und die langgestreckten Fibroblasten-ähnlichen Stromazellen der Proliferationsphase differenzieren zu abgerundeten Epithel-ähnlichen Zellen in der Sekretionsphase (Okada et al. 2018) (Abbildung 4).

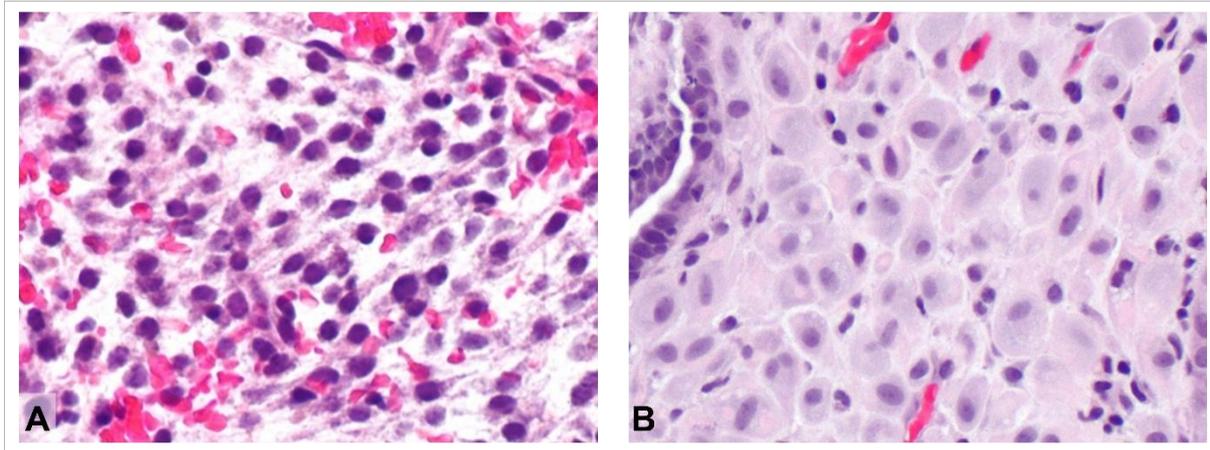


Abbildung 4: Histologie des Endometriums während proliferativer und sekretorischer Phase des Menstruationszyklus

(A) Das proliferative Endometrium ist durch seine spindelförmige Morphologie sowie einem im Verhältnis zum Zytoplasmavolumen relativ großen Zellkern gekennzeichnet. (B) Das sekretorische Endometrium weist große dicht gelagerte rundliche Zellen auf, mit einer epitheloiden Morphologie.

A; B <https://librepathology.org/wiki/Endometrium>

Der Dezidualisierungsprozess beginnt in der Regel in den um die Spiralarterien gelegenen Stromazellen, setzt sich dann im gesamten Endometrium fort und wird bei eintretender Schwangerschaft weitergeführt (Okada et al. 2018; Dunn et al. 2003; Gellersen et al. 2007). Ferner findet ein Einwandern von verschiedenen Immunzellen wie uterinen NK (uNK)-Zellen, Makrophagen sowie T-Lymphozyten statt (Maybin und Critchley 2015; Okada et al. 2018; Gellersen und Brosens 2003). Hierbei exprimieren die uNK-Zellen (CD56^{bright}/CD16⁻) zahlreiche Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine sowie Angiogenesefaktoren (Gellersen und Brosens 2003; Plaisier 2011) und sind mit ca. 70 % die vorherrschenden Leukozyten im Endometrium während der sekretorischen Phase sowie auch in der Dezidua in der frühen Schwangerschaft (Okada et al. 2018). Sie sind an der Gewebestrukturierung, Angiogenese und Trophoblastinvasion beteiligt (Okada et al. 2018). Darüber hinaus werden während der Dezidualisierung auch die Hauptsekretionsprodukte Prolaktin und Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 (IGFBP-1) gebildet, welche als typische Markerproteine dieses Prozesses angesehen werden (Okada et al. 2018; Gellersen et al. 2007). IGFBP-1 spielt eine Rolle bei der Regulation von IGFs, beeinflusst die Ovulation, das Follikelwachstum und die Steroidgenese. Des Weiteren ist es wichtig für die Differenzierung, Proliferation und Dezidualisierung des Endometriums sowie für die Trophoblastinvasion und Implantation (Larsson et al. 2013; Fowler et al. 2000). Prolaktin wird nicht nur in dezidualisierten Stromazellen, sondern auch in der Hypophyse exprimiert. Das deziduale sowie hypophysäre Prolaktin sind jedoch

identisch und unterscheiden sich lediglich durch eine 5'-untranslatierte Region (Telgmann und Gellersen 1998). Hierbei erfüllt dieses Protein die Aufgabe des laktotropen Hormons und hat Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Brustdrüsen sowie der Laktogenese und Aufrechterhaltung der Milchproduktion (Freeman et al. 2000). *In vitro* lässt sich die Expression beider Proteine, IGFBP-1 und Prolaktin, durch die Behandlung von primären Zellkulturen mittels Progesterons innerhalb von 12 Tagen auslösen (Okada et al. 2018). Eine Behandlung mit zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt jedoch bereits in wenigen Stunden zu einem dezidualisierten Phänotyp von primären endometrialen Stromazellen, sodass der Prozess nicht nur über ein Progesteron-gesteuertes Signal, sondern auch über ein cAMP-vermitteltes Signal induziert werden kann (Gellersen et al. 2007; Telgmann und Gellersen 1998).

1.3.2. Die Rolle des cAMP- und Progesteron-Signalwegs für die Dezidualisierung

Progesteron ist ein Schlüsselfaktor für die weibliche Reproduktionsfunktion (Gellersen und Brosens 2003). Dabei entfaltet Progesteron seine Wirkung über den nukleären Progesteronrezeptor (PR), der in seinen Isoformen PRA und PRB vorliegen kann (Okada et al. 2018; Gellersen und Brosens 2014; Gellersen und Brosens 2003; Marquardt et al. 2019), wobei PRA die dominante Form im endometrialen Stroma ist (Gellersen und Brosens 2014). Die Signalgebung über den PR gilt als essentiell für die Dezidualisierung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft (Okada et al. 2018). Wie bereits erwähnt, kann mittels Progesterons die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen *in vitro* ausgelöst werden, wobei es zu einem Anstieg des intrazellulären cAMPs kommt (Okada et al. 2018; Gellersen und Brosens 2003). Neben Progesteron kann auch die Bindung von Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren einen solchen Anstieg des intrazellulären cAMPs bewirken (Okada et al. 2018; Gellersen und Brosens 2014). cAMP spielt als *second messenger* bei vielen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle, wobei es u. a. an der intrazellulären Übermittlung extrazellulärer Signale beteiligt ist (Yan et al. 2016). Die durch G-Proteine angesteuerte Adenylatcyclase konvertiert Adenosintriphosphat (ATP) in cAMP, was wiederum zu einer Stimulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) führen kann (Yan et al. 2016). Für Stromazellen ist bekannt, dass der cAMP-Anstieg zu einer

weiteren Progesteronsensibilisierung der Zellen führt und es somit einen „cross-talk“ zwischen dem cAMP- und dem Progesteron-Signalweg gibt (Logan et al. 2012) (Abbildung 5). Die Aufrechterhaltung des intrazellulären cAMP-Signals wird dabei durch die Aktivität von Phosphodiesterasen kontrolliert (Gellersen und Brosens 2003).

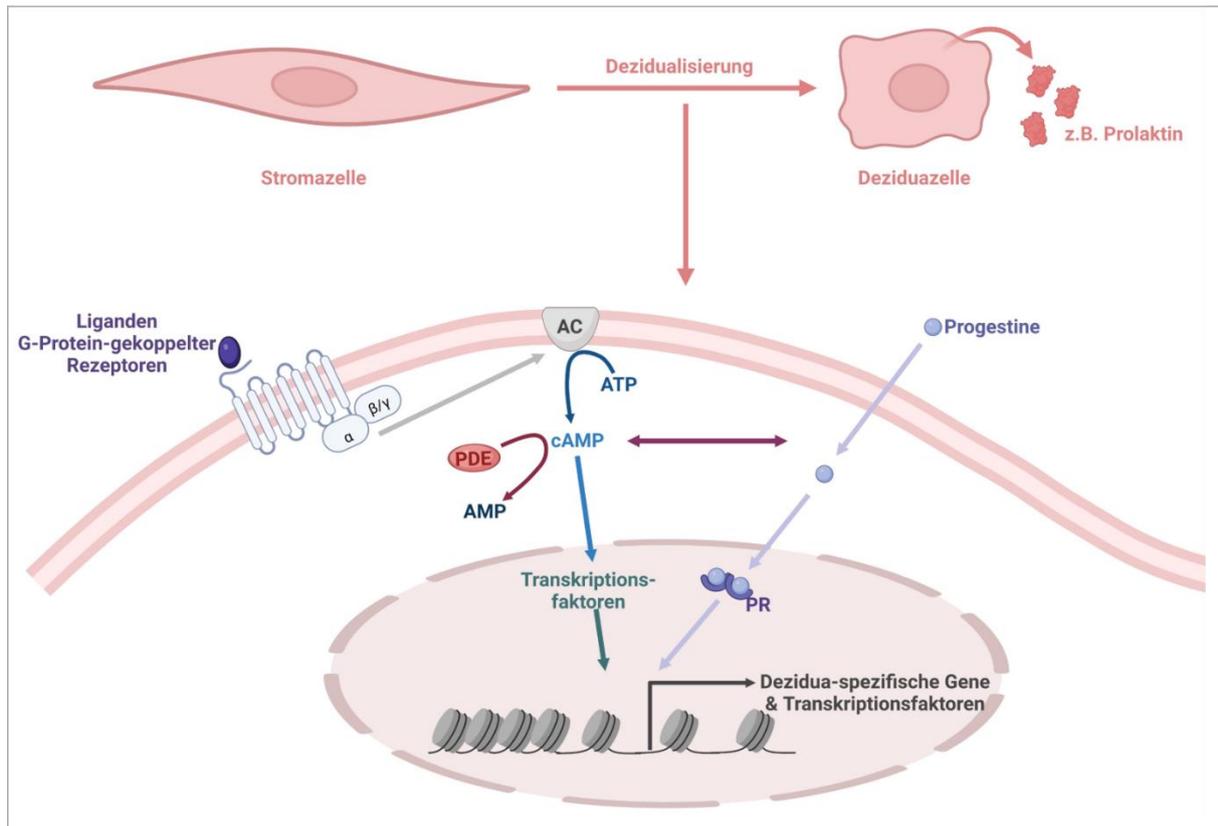


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Beteiligung des Progesteronrezeptor- und cAMP-vermittelten Signalweges an der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen

Die Aktivierung der Adenylatcyclase führt zur Bildung von cAMP, was zur Beeinflussung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und zur Transkription weiterer Faktoren führt. Diese Transkription kann ebenfalls durch die Bindung von Progestinen an den Progesteronrezeptor (PR) beeinflusst werden. Hierbei kann ein „cross-talk“ des cAMP- und Progesteron-Signalwegs stattfinden. $\alpha\beta\gamma \triangleq$ G-Protein; AC \triangleq Adenylatcyclase; c/AMP \triangleq zyklisches/ Adenosinmonophosphat; ATP \triangleq Adenosintri-phosphat; PDE \triangleq Phosphodiesterasen (Eigene Illustration in Anlehnung an Gellersen und Brosens 2003; erstellt mit BioRender.com)

Im Zuge der Aktivierung des cAMP- sowie Progesteron-Signals in den Zellen kommt es zur Aktivierung einer Vielzahl molekularer Mechanismen, die vor allem den Zellzyklusarrest ansteuern (Logan et al. 2012), aber auch Transkriptionsfaktoren betreffen, die den Dezidualisierungsprozess beeinflussen (Okada et al. 2018; Gellersen und Brosens 2014; Gellersen und Brosens 2003; Logan et al. 2012). Zu diesen Transkriptionsfaktoren zählen u. a. die frühen Dezidualisierungsmarker CCAAT Enhancer Binding Protein beta (CEBP β) und Forkhead Box O1 (FOXO1) (Gellersen

und Brosens 2003; Joshi et al. 2020). Diese Faktoren können sowohl miteinander als auch mit dem PR interagieren und die Transkription von Prolaktin über die Bindung in dessen Promotorregion aktivieren (Gellersen und Brosens 2003; Brosens und Gellersen 2006). Darüber hinaus ist auch der Transkriptionsfaktor Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) an der gesteigerten Aktivität des Prolaktinpromotors in differenzierenden endometrialen Stromazellen beteiligt, wobei er auch mit dem PR interagieren kann (Gellersen und Brosens 2003; Mak et al. 2002). Das cAMP Responsive Element Binding Protein 1 (CREB1) wird ebenfalls im Zusammenhang mit einem cAMP-Signal moduliert und kann auf die Aktivität von Histonacetyltransferasen wirken, um somit die Chromatinkonformation zu beeinflussen (Gellersen und Brosens 2003). Im Rahmen des Dezidualisierungsprozesses wird außerdem der Progesteron-induzierte Faktor Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2 (HAND2) induziert (Okada et al. 2018), welcher an der Rezeptivität des Uterus und der Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen beteiligt ist (Okada et al. 2018; Marquardt et al. 2019; Murata et al. 2019).

Die Induktion der Dezidualisierung über den cAMP- und Progesteron-Signalweg umfasst somit multiple molekulare Mechanismen, an denen eine komplexe Interaktion von Faktoren beteiligt ist, welche zum dezidualen Phänotypen und zur Sekretion von Prolaktin und IGFBP-1 führen. Hierbei handelt es sich um einen terminalen Differenzierungsprozess, welcher zur Befristung der Lebensspanne der Zellen führt (Andrews et al. 1959; Olive und Haney 1986). Da dieser Prozess auch das Überleben sowie die Proliferations- und Invasionskapazität von durch retrograder Menstruation in die Bauchhöhle gelangter endometrialer Stromazellen determinieren kann und bekannt ist, dass dieser in Endometriosepatientinnen aufgrund einer Progesteronresistenz gestört sein kann (Attia 2000; Klemmt et al. 2006), stellt die Induktion der Dezidualisierung eine mögliche Behandlungsoption für die Endometriose dar.

1.4. *In vitro* und *in vivo* Modelle zur Untersuchung von Behandlungsoptionen für die Endometriose

In vitro Systeme ermöglichen die Analyse von molekularen Mechanismen von Signalkaskaden und bieten somit eine Grundlage zum Verständnis von komplexen zellulären Vorgängen auch in endometrialen Zellen (Grümmer 2012; Fan 2020). Dabei

können sowohl humane endometriale Stroma- als auch endometriotische Zelllinien als gut geeignetes kostengünstiges Modell Verwendung finden (Fan 2020; Tang et al. 2021). Jedoch weisen solche etablierten Zelllinien oftmals höhere Potentiale im Hinblick auf Zellmigration, Invasion und Expression von Steroidmetabolismusvermittelten Genen auf, was in die Analysen mit einbezogen werden muss (Fan 2020). Zudem stammen immortalisierte Zelllinien lediglich von einer einzelnen Probe ab, was eine Interpretation der Experimente einschränkt (Tang et al. 2021). Verglichen mit Zelllinien ist die Verwendung von humanen primären Zellen das bessere Model zur Analyse verschiedener Prozesse mit einer größeren Homologie zu der *in vivo* Situation (Fan 2020). Die meisten Versuche zur *in vitro* Dezidualisierung wurden an primären endometrialen Stromazellen durchgeführt, welche aus humanem Endometrium isoliert wurden (Tang et al. 2021). Der Vorteil hierbei ist, dass die Aufrechterhaltung der individuell phänotypischen und funktionellen Marker gegeben ist (Fan 2020). Zudem lässt sich histologisch die Zyklusphase zum Entnahmezeitpunkt bestimmen sowie eine allgemeine Anamnese der Spenderfrauen erheben (Tang et al. 2021). Darüber hinaus lassen sich sowohl Zellen vom eutopen Endometrium von Frauen ohne und mit Endometriose sowie von endometriotischen Läsionen analysieren und miteinander vergleichen (Grümmer 2012; Zondervan et al. 2018). Durch die Inkubation von endometrialen Stromazellen mit konditioniertem Medium kann in wenigen Tagen die Induktion der Dezidualisierung auch in einer größeren Anzahl von untersuchten Proben validiert werden (Tang et al. 2021; Fan 2020).

Zur Validierung von *in vitro* erzielten Ergebnissen bieten sich etablierte *in vivo* Modelle an. In der Literatur sind verschiedene Tierversuchsmodelle zur Analyse unterschiedlicher Aspekte der Endometriose beschrieben (Zondervan et al. 2018; Greene et al. 2016; Grümmer 2012). Das sogenannte *Chicken chorioallantoic membrane model* (CAM-Modell) wird hierbei zur Untersuchung von Angiogenese- und Invasionsprozessen verwendet. Die Ermittlung potentieller Effekte systemischer Behandlungen lässt sich mit diesem Modell jedoch nicht durchführen (Greene et al. 2016; Grümmer 2012). Die Verwendung des nicht humanen Primatenmodells (Paviane und Rhesusaffen) schließt hingegen die systemische Analyse mit ein. Da Affen mit geringer Frequenz eine spontane Endometriose entwickeln können (Zondervan et al. 2018; Greene et al. 2016; Grümmer 2012) und zudem eine einer Frau ähnliche reproduktive Endokrinologie und Immunologie aufweisen, entspricht dieses Modell am ehesten den humanen Gegebenheiten (Grümmer 2012). Allerdings

limitieren die hohen Kosten, die Notwendigkeit spezialisierter Einrichtungen und ethische Überlegungen die Verwendung dieses Modells (Zondervan et al. 2018; Grümmer 2012). Deshalb wurden experimentelle induzierte Endometriose Modelle, welche die Verwendung von Nagetieren wie Mäusen beinhalten, etabliert (Grümmer 2012). Durch ihre schnelle Generierungszeit, Möglichkeiten zur genetischen Anpassung und geringen Kosten sind Mäuse im Vergleich zum nicht humanen Primatenmodell von Vorteil (Greene et al. 2016). Da Nagetiere nicht menstruieren und somit keine spontane Endometriose ausbilden können, wurden Systeme zur Induktion einer Endometriose entwickelt (Grümmer 2012). Bei diesen Systemen lassen sich autologe sowie heterologe Modelle voneinander unterscheiden, wobei beiden die Transplantation von endometrialem Gewebe zugrunde liegt (Zondervan et al. 2018; Greene et al. 2016; Grümmer 2012). Das transplantierte Gewebe im autologen Modell entstammt dem selben oder einem syngenem Tier (Greene et al. 2016) und ermöglicht aufgrund eines intakten Immunsystems des Empfängertieres u. a. die Studie von immunmodulierenden Substanzen auf die Läsionen ektopen Endometriums (Grümmer 2012). Da sich das humane Endometrium jedoch physiologisch von dem von Nagetieren unterscheidet (Grümmer 2012), wird beim heterologen Modell humanes endometriales Gewebe in immundefiziente Tiere transplantiert (Greene et al. 2016). Somit wird die Analyse der zellbiologischen Mechanismen humaner Gewebe als Antwort auf eine systemische Behandlung und darüber hinaus die vergleichende Untersuchung von verschiedenen Endometrien von Patientinnen mit und ohne Endometriose ermöglicht (Grümmer 2012).

Das heterologe Modell wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe etabliert und für verschiedene Fragestellungen im Hinblick auf die Persistenz und Therapie der Endometriose verwendet (Fechner et al. 2007; Mönckedieck et al. 2009; Koch et al. 2018). Deshalb wurde dieses Modell in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Substanzen und Substanzkombinationen, die sich *in vitro* als effektiv zur Induktion der Dezidualisierung erwiesen hatten, *in vivo* zu validieren.

1.5. Zielsetzung

Die Endometriose ist eine vielseitige Erkrankung, wobei bis heute hohe Rezidivraten nach operativen Eingriffen und medikamentösen Behandlungen auftreten (Bulun 2009; Giudice 2010; Greene et al. 2016; Kapoor et al. 2021; Smolarz et al. 2021; Zondervan et al. 2020). Da das Stroma möglicherweise zu einer Manifestierung ektooper Läsionen aufgrund einer durch eine Progesteronresistenz reduzierten Differenzierung beiträgt, bildet die Induktion der Dezidualisierung einen möglichen therapeutischen Ansatz zu Behandlung einer Endometriose (Nisolle und Donnez 1997; Attia 2000; Klemmt et al. 2006; Koch et al. 2018). Der Progesteronrezeptor- sowie der cAMP-vermittelte-Signalweg liegen dem Prozess der Dezidualisierung zu Grunde (Gellersen und Brosens 2003; Gellersen und Brosens 2014; Okada et al. 2018). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher potentielle Induktoren der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen von Frauen mit und ohne Endometriose *in vitro* zu ermitteln und miteinander zu vergleichen. Darüber hinaus soll anhand morphologischer und molekularer Parameter diese Dezidualisierung charakterisiert werden. Die sich im Hinblick auf die Induktion der Dezidualisierung *in vitro* als effektiv erwiesenen Substanzen und Substanzkombinationen sollen zudem *in vivo* in einem humanisierten Endometriose Mausmodell analysiert werden. Diese Arbeit soll somit Kenntnisse zur Verwendung potenzieller Induktoren der Dezidualisierung endometrialer Zellen von Endometriosepatientinnen liefern, sodass diese für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in Erwägung gezogen werden könnten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Alle nicht aufgeführten Materialien, wie Glaswaren, Plastikgefäße, Kryotanks sowie Kühl- und Gefrierkombinationen entsprachen dem gängigen Laborstandard.

2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Binokular, SMZ1270	Nikon Europe B.V., Amsterdam, NL
Bio Photometer, 6131 Spectrometer	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
Blotkammer „Mini Trans-Blot® Cell“ <i>ChemiDoc™ Imaging System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Dispenser, Multipette®	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
Durchflusszytometer, <i>FACSCalibur™</i>	Oehmen Labortechnik, Essen, DE
Einbettautomat mit Kühlung HistoCentre 2	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Electrophoresis <i>PowerPac™ Basic</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Gelelektrophorese-Kammer „Sub-cell® GT“	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Heizblock „ThermoStat plus“	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Homogenisator Ultra TurraxT10 basic	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
IKA-VIBRAX-VXR	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Inkubator HERAcell 150i	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Kryo 1 °C Freezing container	Heraeus, Hanau, DE
Lichtmikroskop Eclipse Ts2	Nalgene™, Thermo Fisher Scientific, DE
Magnetrührer COMBIMAG RET	Nikon Europe B.V., Amsterdam, NL
Mehrkanalpipette 5-50 µl Finnpipette	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Mikrotiterplatten Spektrometer, SUNRISE™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Mikrotom Leica RM 2235	TECAN, Männedorf, CHE
Multipette Plus	Leica, Wetzlar, DE
PCR-Cycler „C1000 Touch“	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
pH-Messgerät SevenCompact™	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Pipettierhilfe pipetus®	Mettler Toledo, Zürich, CHE
Pipetten (1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE

Real-Time PCR Detektionssystem „qTower3G“	Analytik Jena, Jena, DE
Rollmischer	Oehmen Labortechnik, Essen, DE
Sterilbank BioVanguard Greenline	CleanAir by Baker, Utrecht, NL
UV-Dokumentation „Chemidoc Imaging System“	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
SDS-PAGE-/Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Sterilbank Biosafe 2	Ehret, Emmerdingen, DE
Vakuum Absaugsystem HLC	Oehmen Labortechnik, Essen, DE
Vortexer VortexGenie 2	Scientific Industries™, Bohemia, US
Waagen:	
- Analysewaage, ABJ 120-4NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
- Tischwaage Galaxy 400	OHAUS® Göntgen Wägetechnik, Nänikon, CHE
Wärme-/Trockenschrank Hereaus B6030	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Wasserbad GFL	Oehmen Labortechnik, Essen, DE
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Zentrifugen:	
- Heraeus MEGAFUGE 1.0 (Kühlung)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
- Eppendorf centrifuge 5415D (ohne Kühlung)	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
- Eppendorf centrifuge 5415R (mit Kühlung)	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
- Sprout® Mini-Zentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Material

Abdecktuch Raucodrape, 2-lagig, 75 x 90 cm

BD Eclipse™ needle 0.4 mm x 19 mm

BD Eclipse™ needle 0.9 mm x 40 mm

BD Plastipak 1 ml Luer

Deckgläschen (verschiedene Größen)

Dispenser Tips, 5 ml *Combitips advanced*®

Einfrierröhrchen Cryo.s™ 2 ml™

Einwegskalpelle 21 mediware

Entsorgungsbeutel 3 L, 6 L

FACS-Röhrchen, 5 ml *polystyrene round-bottom tube*

Mikrotiterplatten, *Cliniplate*™ 96-Well

Bezugsquelle

Hausinternes Lager, Universitätsmedizin Essen, DE

BD, Heidelberg, DE

BD, Heidelberg, DE

BD, Heidelberg, DE

Engelbrecht, Edermünde, DE

Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE

Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AUT

Hausinternes Lager, Universitätsmedizin Essen, DE

Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE

Becton Dickinson, Heidelberg, DE

Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

Nahtmaterial

- Ethicon Vicryl 6-0 (0.7 Ph. Eur.) TF-1 10 mm	Agntho's AB, Lidingö, SWE
- Ethicon Vicryl Plus 5.0 (1 Ph. Eur.) RB-1 Plus	Agntho's AB, Lidingö, SWE
Nitrozellulose Membran, 0,45 µm Porengröße	GE-Healthcare, Chicago (IL), US
Objektträger, <i>SuperFrost Plus</i> TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
PCR 8er-SoftStrips, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
Spritzenvorsatzfilter (Steril Filter) 0,22 µm	Sartorius AG, Göttingen, DE
Petrischale, 35/10 mm	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AUT
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE
Reaktionsgefäße 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AUT
Whatman TM Filterpapier	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Wundklammern Michel 75x1,75 mm	Hausinternes Lager, Universitätsmedizin Essen, DE
Zellschaber, „Cell scraper“, small, 2-POS Blade	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Zellsieb 40 µm Fisherbrand TM Nylon	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Zellsieb 70 µm „Falcon Cell Strainer“ Nylon	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Zellkulturplatten, 6-Well	VWR TM , Radnor (PA), US
Zellkulturflaschen Cellstar® (T25; T75; T175)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AUT

2.1.3. Chemikalien**Substanz**

Acrylamid (30 %) / Bisacrylamidlösung (37, 5:1)
 Agarose (Biozym LE)
 Ammoniumpersulfat (APS)
 Annexin-V FITC-conjugated
 Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5 g
 β-Mercaptoethanol
 Borsäure ≥99,8 %
 Bromphenolblau
 Bovines Serumalbumin (BSA)
 Chloroform
 Dimethylsulfoxid (>99,9 %; DMSO)

Bezugsquelle

AppliChem, Darmstadt, DE
 Biozym Scientific GmbH
 Merck KGaA, Darmstadt, DE
 ImmunoTools GmbH, Deutschland
 Hausinterne Apotheke, Universitätsmedizin Essen, DE
 AppliChem, Darmstadt, DE
 Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
 Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
 Pan-Biotech, Aidenbach, DE
 Merck KGaA, Darmstadt, DE
 Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
dNTPs	Genecraft GmbH, Lüdinghausen, DE
Eosin Y Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg, DE
Essigsäure	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol 96 %	Apotheke Universitätsklinikum Essen, DE
Fluoromount-G® Mounting Medium	Southern Biotech, Birmingham (AL), US
Formaldehyd 37 %	AppliChem, Darmstadt, DE
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Fremont, US
Glycerin	AppliChem, Darmstadt, DE
Glycin for molecular biology	AppliChem, Darmstadt, DE
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Isotonische Kochsalzlösung 10 ml Injektionslösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid ≥99 % (KCl)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Milchpulver, fettarm	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
my-Budget RNAmagic	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Orange G	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Paraplast Tissue Embedding Medium	Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
PCR-Wasser (Wasser Rotipuran Low Organic)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Ponceau S Solution	PanReac AppliChem, Darmstadt, DE
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
Raffiniertes Rizinusöl	Hausinterne Apotheke, Universitätsmedizin Essen, DE
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Salzsäure (HCL)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
SDS Pellets ≥99 %	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Shandon™ Xylene Substitute	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Shandon™ Xylene Substitute Mountant	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Stickstoff flüssig	Hauseigene Anlage, Universitätsmedizin Essen, DE

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Tricin BioChemica	AppliChem, Darmstadt, DE
TRIS-hydrochlorid (HCL) PUFFERAN® ≥99 %	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Tris for molecular biology	AppliChem, Darmstadt, DE
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt, DE
Tween20	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Wasserstoffperoxid 30 % (w/w)	AppliChem, Darmstadt, DE

2.1.4. Allgemeine Puffer und Lösungen

Bouin-Fixierlösung	15 ml Pikrinsäure 5 ml Formaldehyd (37 %) 1 ml Essigsäure
DEPC-behandeltes Wasser	1 ml DEPC (0,1 %) 1000 ml VE-Wasser 12 h bei 37 °C inkubieren, autoklavieren
Trypsin-EDTA (1x; 0,05 %)	Trypsin/EDTA (0,5 %) 1:10 in sterilem 1x DPBS verdünnen

2.1.5. Puffer für molekularbiologische Methoden

Agarosegel (1 %)	1 g Agarose 100 ml 1x TBE-Puffer aufkochen & lösen 5 µl (1:20.000) GelRed
Orange G-Ladepuffer (DNA/RNA-Ladepuffer)	10 mM TRIS-HCL 60 %, w/v Glycerol 60 mM EDTA 0,15 %, w/v Orange G 100 ml VE-Wasser pH 7,6
Ethanol 70 % für RNA	70 ml Ethanol absolut 30 ml DEPC-behandeltes Wasser
Taq-Puffer 'Waldschütz'	zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Ralph Waldschütz, ZTL Universitätsmedizin Essen
TBE-Puffer (5x)	450 mM Tris for molecular biology 450 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8

2.1.6. Primer

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Primer wurden mit dem *Primer designing tool* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) designt. Anschließend wurden alle Primer mit dem zugehörigen *Primer-BLAST* von NCBI hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft. Um Kontaminationen durch genomische DNA ausschließen zu können, wurden Intron-umspannende Primer erstellt. Für das Gen STAT5 wurden die Transkriptvarianten A und B mit Hilfe des *Multi sequence alignment* Programms von CLUSTALW abgeglichen und Primer ausgewählt, die beide Varianten abdecken. Alle aufgeführten Primer (Tabelle 1) wurden bei Eurofins Genomics Germany GmbH bestellt.

Tabelle 1: Primersequenzen für die *Realtime-PCR*

Name	Accession number	Sequenz 5'-3'	Tm [°C]	CG-Gehalt [%]	Fragmentgröße [bp]
AKT1 FW1	NM_001014431.2	CACCACCTGACCAAGATGACA	59,8	52,4	163
AKT1 Rv2		TACAGATCATGGCAGAGGC	59,4	55	
CEBPβ FW3	NM_001285878.1	GTTTCATGCAACGCCTGGTG	58,8	57,9	111
CEBPβ Rv3		AAGCAGTCCGCCTCGTAGTA	59,4	55	
CEBPβ FW4		GCACAGCGACGAGTACAAGA	59,4	55	192
CEBPβ FW4		TGCTTGAACAAGTTCCGCAG	57,3	50	
CREB1 FW1	NM_001371426.1	GGAGGCCTTCTACAGGAAAAT	60,3	50	194
CREB1 Rv2		AGCCAGCTGTATTGCTCCTC	59,4	55	
FOXO1 FW	NM_002015.4	GACAGCCCTGGATCACAGTT	59,4	55	198
FOXO1 Rv		AGATGGCGGGTACACCATAG	59,4	55	
GAPDH FW1	NM_001256799.2	TGGAGAAGGCTGGGGCTCAT	61,4	60	176
GAPDH Rv1		GACCTTGGCCAGGGGTGCTA	53,5	65	
HAND2 FW2	NM_021973.2	GAGTGCATCCCCAACGTACC	61,4	60	243
HAND2 Rv 4		CGTCCGGCCTTTGGTTTT	56	55,6	
HPRT1 FW1	NM_000194.3	GCATACCTAATCATTATGCTGAGG	59,3	41,7	87
HPRT1 Rv1		GACTGAACGTCTTGCTCGAG	59,4	55	
PDE3A FW2	NM_000921.5	CACCTTCCAGGCCATTACACA	59,4	55	132
PDE3A Rv2		AAACTCCTTCTCAGGCGCTTTG	60,3	50	
PDE3B FW1	NM_001363570.2	AGCTGAGGAGAAGCTCAGGA	59,4	55	272
PDE3B Rv2		GCCAGTAGACACTGGTCCAT	59,4	55	
PDE4A FW2	NM_001111307.2	AGGCCACGCTGTCAGAAGA	58,8	57,9	268
PDE4A Rv2		CGTTCCTTCATCGTGGGTGA	59,4	55	
PDE4B FW1	NM_001297442.2	GACATTGCAACAGAAGACAAGTCCCC	64,8	50	168
PDE4B Rv1		ACTCAAGTAACTGAAAGGCCAGGTGG	64,8	50	

PDE4D FW2	NM_001197218.2	TACACCTGCTTTGGAGGCTG	59,4	55	183
PDE4D Rv2		AAGCCCACAGCCAAATGATG	57,3	50	
Prolaktin FW	NM_000948.6	CATCAACAGCTGCCCACTT	57,3	50	213
Prolaktin Rv		CGTTTGGTTTGCTCCTCAAT	55,3	45	
STAT5 FW1	NM_001288718.1	GAAGCAGGTCTCTCTGGAGG	61,4	60	236
STAT5 Rv2		TCTCGGCCAACTTCTCACAC	59,4	55	

Tm \triangleq Schmelztemperatur; bp \triangleq Basenpaare

2.1.7. Puffer für SDS-PAGE und WB

Anionen-Puffer (1x)	0,2 M Tris for molecular biology pH 8,9
Ammoniumpersulfat Lösung (10 %) (APS)	10 g Ammoniumpersulfat 100 ml DMSO
Antikörperlösung 2,5 % Magermilchpulver/1x TBS	1,25 g Magermilchpulver (fettarm) 50 ml 1x TBS auf 1 ml Antikörperlösung 1 μ l/ 2 μ l (1:1000/ 1:500) Antikörper
Blockierungspuffer 5 % Milch	2,5 g Magermilchpulver (fettarm) 50 ml 1x TBS
Blotting-Puffer (1x)	133 mM Glycin 12 mM Tris for molecular biology pH 8,4
Entwicklerlösung	15 μ l Lösung A 1000 μ l Lösung B 3 μ l Lösung C
- Lösung A	6,8 mM p-Coumarsäure 100 ml VE-Wasser
- Lösung B	1,25 mM Luminol 0,1 M TRIS-HCl 100 ml VE-Wasser pH 8,5
- Lösung C	3 %, v/v Wasserstoffperoxid 30 % 90 μ l VE-Wasser (immer frisch ansetzen)
Gelpuffer (1x)	0,3 % SDS 3 M Tris for molecular biology 500 ml VE-Wasser pH 8,45
Kationen-Puffer (1x)	0,1 M Tricin 0,1 % SDS 0,1 M Tris for molecular biology pH 8,3

Lyse-Puffer	50 mM TRIS-HCL 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 pH 7,4 je 100 µl Puffer 1 µl (1:100) HALT™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail
Lämmli-Puffer (4x)	8 % SDS 20 % 2-mercaptoethanol 40 % Glycerol 0,008 % Bromphenolblau 0,25 mM TRIS-HCL pH 6,3
TBS (10x)	250 mM TRIS-HCL 1,5 M NaCl 27 mM KCl pH 7,4
TBS (1x) /TBS-T (1x)	100 ml (10x) TBS auf 1000 ml VE-Wasser für 1x TBS 1 ml 0,1 % (v/v) Tween20 hinzu für 1x TBS-T
Stripping Puffer	25 mM Glycin 1 % SDS 2,4 ml 37 % HCl für pH 2
Tricingele	

Tabelle 2: Trenn- und Sammelgelansatz (1x) für Tricingele der SDS-PAGE

	Trenngel 8,4 % 1 Gel	Sammelgel 4,48% 1 Gel
VE-Wasser	1,33 ml	0,9 ml
Gelpuffer	1,66 ml	0,3875 ml
30 % Acrylamid/Bis (37, 5:1)	1,5 ml	0,25 ml
Glycerin	0,5 ml	-
APS 10% (w/v)	25 µl	12,5 µl
TEMED	2,5 µl	1,25 µl

2.1.8. Längenstandard

Zur Analyse aufgetrennter Nukleinsäurefragmente in der Agarosegelelektrophorese wurde der Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder Längenstandard von Thermo Fisher Scientific (Abbildung 6 A) verwendet. Die Analyse der Molekulargewichte der untersuchten Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE wurde mit Hilfe des PageRuler™ Prestained Protein Ladder VI (10-245) von AppliChem (Abbildung 6 B) durchgeführt.

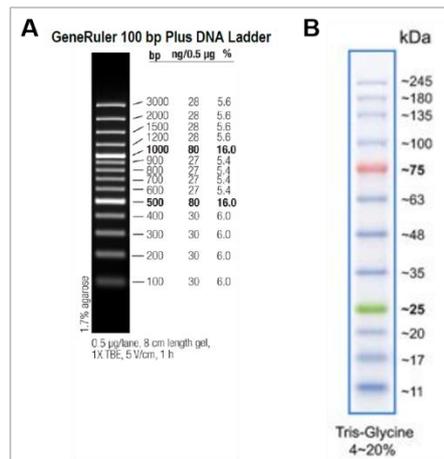


Abbildung 6: Längenstandard für die Agarosegelelektrophorese (A) und zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in einer SDS-PAGE (B)

2.1.9. Verwendete Enzyme und vorgefertigte Systeme/Kits

Enzyme/Kits

DNase I (amplification grade)

HALT™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Kollagenase IV

my Bio-budget 5x EvaGreen QPCR-Mix II (Rox)

Prolaktin ELISA Kit (RE52131)

Taq Polymerase `Waldschütz`

Bezugsquelle

Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE

Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, DE

IBL International GmbH von TECAN, Männedorf, CHE

zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Ralph Waldschütz, ZTL, Universitätsmedizin Essen

2.1.10. Zellkulturmedien und Puffer

Medium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Ham's F-12 Nutrient Mix

DMEM/F-12 Phenolrotfrei

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (1x)

Bezugsquelle

Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US

2.1.11. Zellkulturzusätze und Substanzlösungen

Zellkulturzusätze	Katalognummer und Bezugsquelle
8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (cAMP)	B-077-100, Biolog Life Science Institute, Bremen, DE
Amphotericin B (250 µg/ml, Fungizone™)	15290018, Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Fetal Bovine Serum (FBS)	FBS-12A, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, DE
Charcoal stripped FBS (biowest)	S181F, Th Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Forskolin	F6886, Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
L-Glutamine (200 mM)	25030081, Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Medroxyprogesterone 17-acetate (MPA)	M1629, Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
Milrinone	M4659, Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ovogest® 300 I.E./ml (hCG)	Intervet Deutschland GmbH, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, DE
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	15140, Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Progesteron	P0130-100G, Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, DE
Relaxin	3257-RN-025, R&D Systems, Inc. Minneapolis (MN), US
Rolipram	R0110, TCI Deutschland GmbH, Eschborn, DE
Sodium Pyruvate (100 mM)	11360, Life Technologies (Gibco) by Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), US
Substanzlösungen	
cAMP-Stocklösung (5 mM)	100 µmol cAMP + 20 ml FBS-freies Medium Effektive Endkonzentration: 0,5; 0,25; 0,1 und 0,05 mM
Forskolin-Stocklösung (0,25 mM)	10 mg (10,97 mg) in 10 ml DMSO + 90 ml FBS-freies Medium, steril filtriert Effektive Endkonzentration: 100; 25; 10 und 1 µM
MPA-Stocklösung (0,1 mM)	3,86 mg in 100 ml EtOH absolut Effektive Endkonzentration: 1 µM
Milrinone (5 mM)	10 mg (10,95 mg) Milrinone in 1 ml DMSO + 9 ml FBS-freies Medium, steril filtriert Effektive Endkonzentration: 50 µM

Ovogest (hCG) (1500 I.E.)	6,2-6,6 mg Ovogest + 5 ml NaCl Effektive Endkonzentration: 50 I.E
Progesteron (1 µM)	3,15 mg in FCS-freiem Medium, steril filtriert Effektive Endkonzentration: 100 nM
Relaxin (1 µg/µl)	25 µg in PBS Effektive Endkonzentration: 100 ng/ml
Rolipram (5 mM)	2,75 mg in 2 ml DMSO Effektive Endkonzentration: 50 µM

2.1.12. Zusammensetzung von Zellkulturmedien

Kulturmedium primärer endometrialer Stromazellen

43,9 %	DMEM
43,9 %	Ham's F-12
10 %	100 % Fetal Bovine Serum (FBS)
1 %	200 mM L-Glutamine
1 %	10.000 U/ml Penicillin-Streptomycin
0,11 %	100 mM Natrium Pyruvate
0,1 %	250 µg/ml Amphotericin B

Starvierungsmedium (FBS-freies Medium) primärer endometrialer Stromazellen

97,8 %	DMEM/Ham's F-12 (phenolrotfrei)
1 %	200 mM L-Glutamine
1 %	10.000 U/ml Penicillin-Streptomycin
0,11 %	100 mM Natrium Pyruvate
0,1 %	250 µg/ml Amphotericin B

Differenzierungsmedium primärer endometrialer Stromazellen

87,8 %	DMEM/Ham's F-12 (phenolrotfrei)
10 %	100 % Charcoal stripped FBS
1 %	200 mM L-Glutamine
1 %	10.000 U/ml Penicillin-Streptomycin
0,11 %	100 mM Natrium Pyruvate
0,1 %	250 µg/ml Amphotericin B

Kollagenase IV Medium zur Isolation endometrialer Stromazellen

20 ml	DMEM
20 ml	Ham's F-12
400 µl	200 mM L-Glutamine
400 µl	10.000 U/ml Penicillin-Streptomycin
40 µl	100 mM Natrium Pyruvate
40 µl	250 µg/ml Amphotericin B
9,35 mg	Kollagenase IV (Endkonzentration 100 U/ml)

die gesamte Mischung durch einen Sterilfilter filtrieren

Einfriermedium

64 %	DMEM
18 %	100 % DMSO
18 %	100 % FBS

2.1.13. Verwendetes humanes Endometriumgewebe

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete humane eutope Endometrium wurde im Rahmen von Kinderwunschbehandlungen im Kinderwunschzentrum des Universitätsklinikums Düsseldorf (UniKiD) durch Scratching im Monatszyklus vor dem Embryotransfer entnommen. Alle Patientinnen wurden informiert sowie eine schriftliche Genehmigung zur Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken eingeholt. Die Versuche wurden von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf unter der internen Studiennummer 5535 genehmigt. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme waren die Patientinnen ohne Endometriose durchschnittlich $37,2 \pm 3,8$ Jahre alt, die Patientinnen mit Endometriose $37,1 \pm 3,9$ Jahre alt. Es gab somit keinen signifikanten Altersunterschied zwischen diesen beiden Patientinnenkollektiven. Die unten aufgeführte Tabelle 3 zeigt eine detaillierte Auflistung der Daten der Patientinnen ohne und mit Endometriose sowie das Endometriosestadium soweit dieses bekannt war. Zur Ermittlung der Zyklusphase wurde ein Fragment des Gewebes für histologische Analysen entnommen und nach Noyes et. al beurteilt, wobei die sekretorische Phase durch ein stromales Ödem, Vakuolen in den Epithelzellen sowie geschlängelten Drüsenanschnitten mit Sekretionsprodukten im Lumen gekennzeichnet ist (Noyes et al. 1950).

Tabelle 3: Für die *in vitro* Versuche verwendetes Endometriumgewebe von Patientinnen ohne und mit Endometriose

Probennummer	Alter der Patientin bei Entnahme	Anamnestischer Zyklustag	Histologie der Zyklusphase	Endometriosestatus/ Stadium
128	39	26	SP	nein
133	40	22	SP	nein
136	35	21	SP	nein
138	35	24	SP	nein
142	37	22	SP	nein
144	31	* P + 5	SP	nein
146	37	23	Frühe SP	nein
147	34	22	SP	nein
158	40	19	SP	nein
161	44	* P + 5,5	Frühe SP	nein
163	33	26	SP	nein
166	39	20	SP	nein
167	39	24	SP	nein
168	41	20	Späte PP/ Frühe SP	nein
171	42	22	SP	nein
186	33	23	Späte PP/ Frühe SP	nein
191	35	unbekannt	SP	nein
192	40	unbekannt	SP	nein
200	30	16	SP	nein
90	32	22	SP	ja, ASRM IV
135	45	20	SP	ja
140	38	* P + 7	SP	ja
143	41	22	SP	ja, ASRM II
155	38	23	SP	ja, ASRM II
159	38	23	SP	ja, ASRM I
164	35	26	SP	ja, ASRM I
170	36	23	SP	ja, ASRM I
173	33	unbekannt	Späte PP/Frühe SP	ja, ASRM IV
174	40	21	* n.a.	ja, ASRM II
180	38	unbekannt	SP	ja, ASRM I
184	34	23	Frühe SP	ja, ASRM I
185	36	22	SP	ja, ASRM II
194	43	unbekannt	SP	ja
202	35	P + 5	SP	ja, ASRM III
203	40	22	SP	ja, ASRM I
204	31	20	SP	ja, ASRM I

ASRM \triangleq American Society for Reproductive Medicine; PP \triangleq Proliferationsphase; SP \triangleq Sekretionsphase; * n.a. \triangleq nicht analysiertes histologisches Gewebe; * P + Zahl \triangleq Progesterongabe + Tage bis zur Gewebeentnahme; hellgrau \triangleq ohne Endometriose; dunkelgrau \triangleq mit Endometriose

Das für den *in vivo* Versuch verwendete humane Endometriumgewebe stammte von vier verschiedenen Patientinnen ohne Endometriose (Tabelle 4). Die Patientinnen waren zum Entnahmezeitpunkt $37,8 \pm 1$ Jahre alt. Das Zyklusstadium wurde ebenfalls nach Noyes et al. histologisch beurteilt.

Tabelle 4: Für das *in vivo* Endometriose Mausmodell verwendetes Endometriumgewebe

Probennummer	Alter der Patientin bei Entnahme	Anamnestischer Zyklustag	Histologie der Zyklusphase	Endometriose-status/ Stadium
208	38	23	SP	nein
213	37	18	SP	nein
215	37	unbekannt	SP	nein
218	39	20	SP	nein

PP \triangleq Proliferationsphase; SP \triangleq Sekretionsphase; hellgrau \triangleq ohne Endometriose

2.1.14. Verwendete Software und Datenbanken

BD CellQuest Pro™ Software von Becton Dickinson, Franklin Lakes (NJ), US

GraphPad Prism 8 von GraphPad Software, San Diego (CA), US

GTEEx-Portal von Broad Institute of MIT and Harvard, US

Human Protein Atlas: <https://www.proteinatlas.org/>

IC Measure von The Imaging Source Europe GmbH, Bremen, DE

ImageScope von Leica, Wetzlar, DE

ImageJ von National Institute of Health, Washington DC, USA

Microsoft EXEL von Microsoft, Redmond (WA), US

Multi sequence alignment: <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>

NCBI von National Center of Biotechnology Information, Rockville (MD), US

Nukleotid Blast: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch

Primer Design: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

qPCRsoft von Analytik Jena, Jena, DE

SigmaPlot 12.5 von Systat Software GmbH, Palo Alto (CA), US

UCSC Genome Browser von der University of California, Santa Cruz, US

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung humaner endometrialer Stromazellen (hESCs)

Alle zellkulturspezifischen Arbeiten wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Sterilbank) durchgeführt. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in einem Zellinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

2.2.2. Isolation von hESCs

Alle Zellkulturexperimente wurden an hESCs, die aus eutopem endometrialen Gewebe verschiedener Patientinnen isoliert wurden (siehe Tabelle 3), durchgeführt. Zur Isolierung von hESCs wurde das entnommene Gewebe in FBS-freiem Medium bei 4 °C zum Institut für Anatomie am Uniklinikum Essen transportiert. Die Gewebeproben wurden unter sterilen Bedingungen aufbereitet. Zunächst wurde das Gewebe wiederholt mit 1x DPBS gewaschen, um mögliche Medium- sowie Schleimreste zu entfernen. Daraufhin wurden Teile der Gewebeproben für spätere RNA- sowie Proteinanalysen entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Zudem wurden Teilproben für histologische Untersuchungen in Bouin-Lösung fixiert. Im Anschluss wurde das restliche Gewebe durch eine enzymatisch-mechanische Restriktion aufgearbeitet. Mit Hilfe von sterilen Einmalskapellen wurde das Gewebe in einer Kollagenase IV-Lösung (insg. 5 ml mit 100 U/ml) in <1 mm kleine Fragmente geschnitten. Die zerkleinerten Fragmente wurden mehrfach in der Kollagenase IV-Lösung resuspendiert und 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Alle 15 min wurde erneut resuspendiert. Um Epithel- und Stromazellen voneinander zu trennen, wurde die inkubierte Zellsuspension durch einen Nylonfilter (40 µm Porengröße) in ein 50 ml Röhrchen filtriert und anschließend sedimentiert. Da sich die Epithelzellen aufgrund ihrer stärkeren Zell-Zell-Kontakte nicht so schnell voneinander lösten, sanken diese größeren Zellverbände schneller ab, sodass die obere Fraktion der Suspension vermehrt Stromazellen enthielt und entnommen werden konnte. Der Sedimentationsschritt wurde dreimal wiederholt indem das

Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert wurde. Anschließend wurde die Fraktion mit der Stromazellen bei 250 x g für 3 min zentrifugiert, der entstandene Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden auf 6-Well Platten als Passage 0 ausgesät und wie in den folgenden Kapiteln beschrieben kultiviert (siehe 2.2.3). Eventuell in der Stromazellfraktion zurückgebliebene Epithelzellen hefteten sich nach der ersten Passage der Zellen nicht mehr an und wurden so beim Mediumwechsel entfernt.

2.2.3. Kultivierung und Passagieren von hESCs

Die isolierten hESCs wurden in Kulturmedium (siehe 2.1.12) kultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert des Mediums nicht zu stark absank. Die Metabolisierung von Nährstoffen aus dem Medium kann zu einer Ansäuerung des Mediums führen, welche sich negativ auf die Zellen auswirken kann. Aus diesem Grund war dem Medium der pH-Indikatorfarbstoff Phenolrot zugesetzt, der bei Verringerung des pH-Wertes zu einem Farbumschlag von rot zu gelb führt. Um stets neue Nährstoffe bereitzustellen und Stoffwechselabfälle zu entfernen, wurde das Medium alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

Mit Erreichen eines konfluenten *Monolayers* wurden die hESCs 1:3 passagiert. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 1x DPBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mit einer 1x Trypsin-EDTA Lösung versetzt und bei 37 °C für 10 min inkubiert. Das Trypsin als Protease sorgt für die Spaltung der Adhäsionsproteine, wohingegen das EDTA zweifach geladene Ionen bindet und somit eine erneute Adhäsion der Zellen an die Oberfläche des Kulturgefäßes verhindert. Die abgelösten Zellen runden sich ab und können durch leichtes Klopfen des Kulturgefäßes gelöst werden. Im Folgenden wurde die enzymatische Reaktion mittels FBS-haltigem Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 250 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos entfernt, das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen auf neue Kulturgefäße verteilt. Die in dieser Arbeit verwendeten hESCs wurden bis zur Passage 4 kultiviert und vermehrt, bevor sie für den Versuch ausgesät wurden. Alle Versuchsansätze wurden mit Zellen in Passage 5 durchgeführt. Die eingesetzten Mengen von DPBS, Trypsin-EDTA sowie Kulturmedium variieren hierfür je nach Kultivierungsgefäß und sind der folgenden Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Lösungsmengen zum Passagieren von hESCs

Kulturgefäß	DPBS (1x)	Trypsin-EDTA (0,05 %)	Kulturmedium
6-Well-Platte	2 ml / Well	500 µl / Well	2 ml / Well
T25-Zellkulturflasche	7 ml	1 ml	5 ml
T75-Zellkulturflasche	15 ml	3 ml	10 ml
T175-Zellkulturflasche	20 ml	5 ml	20 ml

2.2.4. Kryokonservierung und in Kulturnahme von hESCs

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese in speziellem Einfriermedium (siehe 2.1.12) in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Das Einfriermedium enthält Dimethylsulfoxid (DMSO), welches der Eiskristallbildung und somit einem Zerstören der Zellmembran entgegenwirkt. Die Zellen wurden zum Einfrieren wie unter Punkt 2.2.3 abgelöst, pelletiert und in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein vorbereitetes Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C in einer Einfrierhilfe gelagert. Die Einfrierhilfe enthält Isopropanol und sorgt für ein langsames Herunterkühlen der Zellen um -1 °C/min . Somit bleibt die Vitalität der Zellen über den Einfrierprozess hinaus intakt. Eine kurzfristige Lagerung (max. 1 Monat) fand bei -80 °C statt. Um die Vitalität der Zellen über einen längeren Zeitraum hinaus zu erhalten, erfolgte die anschließende Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Kryokonservierte Zellen wurden erneut in Kultur aufgenommen, indem die Kryoröhrchen bei 37 °C erwärmt wurden. Da DMSO bei höheren Temperaturen eine zytotoxische Auswirkung auf die Zellen haben kann, wurde die aufgetaute Zellsuspension nach 10 min in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes Medium aufgenommen. Nach einem folgendem Zentrifugationsschritt bei $250 \times g$ für 3 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend entsprechend der Größe des Zellpellets auf Zellkulturgefäße passender Größe ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um nicht angeheftete Zellen und Zelldebris zu entfernen.

2.2.5. Zellzahlbestimmung

Alle für diese Arbeit durchgeführten Versuche wurden auf 6-Well Platten mit einer ausgesäten Zellzahl von 5×10^{10} Zellen / Well durchgeführt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese hat eine Grundplatte mit einem Raster aus 4 Großquadraten, welche jeweils aus 16 Kleinquadraten bestehen. Ein Großquadrat hat eine Kantenlänge von 1 mm x 1 mm. Durch die Auflage eines Deckglases ergibt sich eine Kammertiefe von 0,1 mm. Daraus folgt ein errechnetes Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ für ein Großquadrat. Da das Volumen von $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ }\mu\text{l}$ beträgt, errechnet sich ein Fassungsvermögen von $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ / Großquadrat. Für die Zählung wurden die Zellen wie unter Punkt 2.2.3 abgelöst, pelletiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden $10 \text{ }\mu\text{l}$ in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen in vier Großquadraten ausgezählt. Daraus wurde der Mittelwert errechnet, welcher durch die Multiplikation mit dem Kammerfaktor 10^4 die Zellzahl/ml ergab (Zellzahl / ml = Mittelwert 4 Großquadrate $\times 10^4$).

2.2.6. *In vitro* Induktion der Dezidualisierung von hESCs

Für die *in vitro* Induktion der Dezidualisierung von hESCs wurden 5×10^5 Zellen / Well ausgesät und 24 h mit Differenzierungsmedium (siehe 2.1.12) kultiviert. Diesem Medium ist anstelle des sonst verwendeten FBS ein mit Aktivkohle behandeltes (*charcoal stripped*) FBS zugesetzt, in dem der Hormongehalt ohne Verluste von anderen Serumkomponenten reduziert ist (Herstellerangabe). Zusätzlich fehlt dem Medium der pH-Indikator Phenolrot welcher eine schwache östrogene Aktivität aufweisen kann (Berthois et al. 1986; Houserman et al. 1989). Somit werden mögliche Effekte von Komponenten des zugesetzten FBS auf die Dezidualisierungsreaktion der Stromazellen reduziert, sodass eintretende Effekte auf die zu testenden Substanzen bezogen werden können.

Nach 24 h wurden die hESCs für 72 h (Tag -3) mit Starvierungsmedium (siehe 2.1.12) versetzt, um die Zellen in dieselbe Zellzyklusphase zu transferieren. Im Anschluss wurde die Behandlung der Zellen begonnen (Tag 0). Die hESCs wurden hierfür mit Differenzierungsmedium sowie den zu evaluierenden Substanzen über einen Zeitraum von 6 Tagen behandelt. Entsprechend der eingesetzten Substanzmenge wurde das Medium angepasst, sodass sich ein Gesamtvolumen von 1 ml/Well ergab. Nach 72 h

(Tag 3) wurde ein Mediumwechsel mit erneuter Zugabe der entsprechenden Substanzen durchgeführt. Der Versuch wurde nach weiteren 72 h (Tag 6) beendet, indem die Überstände für die ELISA-Analyse abgenommen und die Zellen für die durchflusszytometrische Messung sowie die RNA- und Proteinisolation geerntet wurden. Zudem wurden an Tag -3, Tag 0, Tag 3 sowie an Tag 6 der Behandlung Fotos der Zellen gemacht.

Die Konzentrationen der Substanzen sowie der Lösungsmittelkontrollen sind in der unten aufgeführten Tabelle 6 zu entnehmen. Die Zusammensetzung der Substanzstocklösungen sind unter Punkt 2.1.11 detailliert aufgelistet. Bei der Behandlung mit 8-Br-cAMP, Forskolin, MPA und Progesteron wurden unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrollbehandlung wurden die Zellen bei allen Versuchen zusätzlich mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Substanz behandelt.

Tabelle 6: Eingesetzte Substanzkonzentrationen/Well mit zugehörigen Lösungsmittelkontrollen

Substanz	Konzentration / Well	Lösungsmittelkontrolle
8-Br-cAMP (5 mM)	0,05 mM	unbehandeltes Medium
	0,1 mM	
	0,25 mM	
	0,5 mM	
Forskolin (0,25 mM)	1 µM	unbehandeltes Medium
	10 µM	4 µl DMSO
	25 µM	10 µl DMSO
	100 µM	40 µl DMSO
MPA (0,1 mM)	100 nM	1 µl EtOH
	1 µM	10 µl EtOH
Progesteron (1 µM)	100 nM	unbehandeltes Medium
	1 µM	
hCG (1500 I.E.)	50 I.E.	unbehandeltes Medium
Relaxin (1 µg/µl)	100 ng/ml	unbehandeltes Medium
Milrinone (5 mM)	50 µM	5 µl DMSO
Rolipram (5 mM)	50 µM	10 µl DMSO

2.2.7. Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.7.1. Versuchstiere

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) im Schreiben vom 18.09.2020 gemäß §8 Abs. 1 Tierschutzgesetz i. v. m. §31 Tierschutz-Versuchstierverordnung genehmigt (Aktenzeichen 81-02.04.2020.A043). Die Tierversuche wurden in den Räumlichkeiten des Zentralen Tierlabors (ZTL) des Universitätsklinikums Essen (Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Gero Hilken) mit der internen TSG-Nr. G1775/20 durchgeführt. Für die Versuche wurden weibliche Nacktmäuse (NMRI, nu/nu; Alter 4-12 Monate) aus der Zucht des ZTLs verwendet, welche unter kontrollierten Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (IVC-Käfige des Typs Blue-line) bei konstantem Raumklima ($22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) und Luftfeuchtigkeit ($55 \pm 10 \%$) sowie Pathogen-freien Bedingungen gehalten wurden. Die Versuchstiere hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* sowie einen 12 h / 12 h helldunkel Rhythmus. Zudem wurde den Mäusen Zellstoff und ein Häuschen zur Verfügung gestellt.

Im Versuch befindliche Tiere wurden einzeln unter den oben genannten Bedingungen gehalten und täglich hinsichtlich möglicher Abbruchkriterien begutachtet. Alle nicht im Versuch befindlichen Tiere wurden bei den täglichen Kontrollen von Tierpflegern des ZTLs erfasst.

2.2.7.2. Transplantation von humanem Endometriumgewebe

Von den Patientinnen entnommenen Endometriumgeweben wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben Proben für histologische, molekularbiologische und proteinbiochemische Analysen asserviert. Das restliche Gewebe wurde in gleichgroße Fragmente von ca. 2 mm Kantenlänge geschnitten. Die Fragmente wurden bis zur Transplantation, die spätestens 1 h nach Gewebeaufarbeitung stattfand, in Zellkulturmedium im Inkubator gelagert. Die Transplantation wurde in den Räumlichkeiten des ZTLs durchgeführt.

Diese Methode wurde in Anlehnung an die beschriebene Methode von Koch et al. 2018 durchgeführt. Die detaillierte Durchführung ist nachfolgend aufgeführt. Die verwendeten Nacktmäuse wurden vor dem Eingriff gewogen und entsprechend ihres

Gewichtes mit einer intraperitonealen Injektion aus 20 mg/kg Körpergewicht Xylazin + 100 mg/kg Ketamin in NaCl (0,25 ml + 1 ml in 5 ml NaCl) narkotisiert (29-30 g Maus / 240-250 μ l). Die Betäubungsmittel wurden vom ZTL zur Verfügung gestellt. Für jede Maus wurde ein Narkoseprotokoll angefertigt. Pro Versuchsansatz wurde 6 Mäusen das Gewebe einer Patientin transplantiert. Hierbei wurde mittels Laparotomie je Maus vier Gewebefragmente mit Hilfe einer Schlinge aus Nahtmaterial (Ethicon Vicryl 6-0) am Peritoneum parietale der Bauchwand angenäht. Anschließend wurde die Bauchwand mit Nahtmaterial (Ethicon Vicryl Plus 5.0) mit einer Einzelknopfnäht vernäht und der Hautschnitt mit Klammern (Wundklammern Michel 75x1,75 mm) verschlossen. Zur Schmerzlinderung nach der Laparotomie wurde den Mäusen entsprechend ihres Gewichtes (0,1 mg / 20 g Körpergewicht $\hat{=}$ 50 μ l; d. h. 75 μ l Schmerzmittel / 30 g Körpergewicht) das Schmerzmittel Caprofen (Stock 50 mg/ 1000 μ l) subkutan verabreicht. Die Mäuse erhielten dieses Schmerzmittel an den darauffolgenden zwei Tagen ebenfalls subkutan. Zudem wurden täglich das Gewicht, die Wunde sowie der Allgemeinzustand der Mäuse überprüft.

2.2.7.3. Substanzapplikationen

In jeder Versuchsdurchführung wurden die Substanzen täglich zum gleichen Zeitpunkt \pm 1,5 h verabreicht. Der Start der Substanzapplikation erfolgte einen Tag nach Laparotomie. Die Substanzen wurden hierbei intraperitoneal (i.p.) oder subkutan (s.c.) an 6 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Das Applikationsschema ist in Abbildung 7 dargestellt.

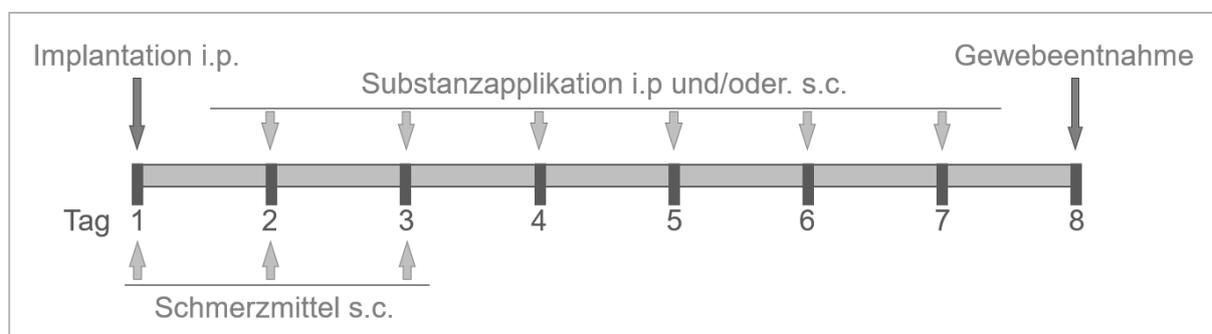


Abbildung 7: Zeitachse der Substanzapplikation in Nacktmäusen

i.p. $\hat{=}$ intraperitoneal; s.c. $\hat{=}$ subkutan

Je Versuch wurden parallel 6 mit dem Gewebe derselben Patientin transplantierte Mäuse mit unterschiedlichen Substanzen behandelt. Die genaue Zusammensetzung der Substanzinjektionen ist Tabelle 7 zu entnehmen. Nach 6 Tagen Behandlung wurde der Versuch beendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung und Verabreichungsform der Testsubstanzen für 6 parallel behandelte Nacktmäuse

Maus	Behandlung	Verabreichungsform	Zusammensetzung 100 µl / Injektion
1	Vehikel	i.p.	25 µl DMSO (100 %) + 75 µl NaCl (0,9 %)
		s.c.	25 µl EtOH (100 %) + 75 µl Rizinusöl
2	Forskolin	i.p.	100 µg Forskolin in 25 µl DMSO (100 %) + 75 µl NaCl (0,9 %)
3	Rolipram	i.p.	12,5 µg Rolipram in 25 µl DMSO (100 %) + 75 µl NaCl (0,9 %)
4	Rolipram + MPA	i.p.	12,5 µg Rolipram in 25 µl DMSO (100 %) + 75 µl NaCl (0,9 %)
		s.c.	50 µg MPA in 25 µl EtOH (100 %) + 75 µl Rizinusöl
5	Forskolin + Rolipram	i.p.	100 µg Forskolin & 12,5 µg Rolipram in 25 µl DMSO (100 %) + 75 µl NaCl (0,9 %)
6	Forskolin + Rolipram + MPA	i.p.	100 µg Forskolin & 12,5 µg Rolipram in 25 µl DMSO (100 %) + 75 µl NaCl (0,9 %)
		s.c.	50 µg MPA in 25 µl EtOH + 75 µl Rizinusöl

i.p. ≙ intraperitoneal; s.c. ≙ subkutan

2.2.7.4. Entnahme der transplantierten Gewebefragmente und Aufarbeitung

Am Ende des Versuches wurden die Mäuse erneut gewogen und durch zervikale Dislokation getötet. Die Haut am Bauch wurde mit 70 % EtOH sterilisiert, die Bauchhöhle mit einem Schnitt rostocaudal eröffnet und die vier angenähten Fragmente lokalisiert. Die Fragmente wurden entfernt, das verbleibende Nahtmaterial mit Hilfe eines Binokulars abgelöst und die Gewichte der Fragmente mit einer Feinwaage ermittelt. Je ein Fragment wurde für RNA- bzw. Proteinisolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Für histologische Analysen wurde ein Fragment in O.C.T. Fixiermittel schockgefroren sowie ein Fragment über Nacht in Bouin-Lösung fixiert. Die O.C.T. eingebetteten Fragmente wurden für zukünftige Analysen bei -20 °C luftdicht gelagert. Die Aufarbeitung der Fragmente für RNA- und Proteinisolation wurde auf Eis unter Verwendung eines Homogenisators durchgeführt. Zur RNA-Isolation wurde jedes Fragment mit 500 µl

my-budget RNAmagic versetzt und in dreimal 10 s Schritten homogenisiert. Hierbei handelt es sich um ein Phenol/Guanidinisothiocyanat-Gemisch, welches die Zellen aufschließen und RNasen inaktivieren kann. Anschließend wurden weitere 500 µl my-budget RNAmagic hinzugefügt, resuspendiert und wie ab Punkt 2.2.9 beschrieben aufgearbeitet. Zur Proteinisolation wurden die entnommenen Gewebefragmente in 250 µl kaltem Lyse-Puffer für dreimal 10 s homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat wie unter Punkt 2.2.10.2 auf Eis weiterverarbeitet.

2.2.8. Histologische Methoden und Auswertung

Für die histologischen Analysen wurde das über Nacht in Bouin-Lösung fixierte native Endometriumgewebe sowie die aus den Mäusen entnommenen Endometriumfragmente über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, über Xylol entfettet und dann in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit einer Dicke von 5 µm Schnitte der eingebetteten Gewebe mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgetragen. Daraufhin wurden die Schnitte über Nacht bei 50 °C getrocknet und am darauffolgenden Tag in einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gefärbt (Tabelle 8).

Tabelle 8: HE-Färbung von Gewebeschnitten

Lösung	Inkubationszeit
Xylol	zweimal je 5 min
Isopropanol	kurz
96 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
VE-Wasser	3 min
Hämatoxylin	2-3 min
VE-Wasser	überschüssiges Hämatoxylin abwaschen
HCl-Alkohol	20 s
fließendes Leitungswasser	10 min
VE-Wasser	kurz spülen
Eosin	1-2 min
96% Ethanol	dreimal kurz
Isopropanol	kurz
Isopropanol	1 min
Xylol	zweimal je 5 min

eindecken in Xylene Substitute Mountant

Die HE-gefärbten Schnitte wurden in der Westdeutschen Biobank Essen (WBE) bei einer 400-fachen Vergrößerung mittels *Aperio ScanScope Slide Scanner* (Leica) digitalisiert. Die Dateien wurden als *ScanScope Virtual Slide (.svs)* gespeichert und mittels der *ImageScope* Software von Leica ausgewertet. Das Programm ermöglicht die Betrachtung der gescannten Schnitte bis zu einer 400-fachen Vergrößerung sowie die Darstellung eines Längenmaßstabes. Mit Hilfe des Programmes wurden Bildausschnitte als TIFF-Datei extrahiert.

Eine immunhistochemische Ki-67-Färbung wurde im histologischen Labor des Institutes für Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen (Leitung: Prof. Dr. Kathy Keyvani) nach Standardbedingungen durchgeführt. Die Ki-67-gefärbten Schnitte wurden ebenfalls in der WBE eingescannt.

2.2.9. Molekularbiologische Methoden

2.2.9.1. Isolation von RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA basierte auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation und erfolgte aus den hESCs nach 6 Tagen Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen (siehe 2.2.6) bzw. aus den aus den Nacktmäusen entnommenen Gewebefragmenten nach 6 Tagen Behandlung der Mäuse (siehe 2.2.7). Zur RNA-Isolation aus den hESCs wurde das Zellkulturmedium verworfen, die Zellen einmal mit 1x DPBS gewaschen und mit 1 ml my-budget *RNAmagic* von Bio-Budget versetzt. Die entstandene lysierte Zellsuspension wurde mehrfach resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Sowohl die lysierte Zellsuspension als auch das entstandene Homogenisat der Gewebefragmente des *in vivo* Versuchs (siehe 2.2.7.4) wurden mit je 200 µl Chloroform pro Reaktionsansatz versetzt, für 15 s kräftig geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Der Suspensionsansatz wurde daraufhin 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zur Phasentrennung zentrifugiert. Die RNA befand sich in der oberen wässrigen Phase, während die Inter- und Phenolphase die DNA sowie Proteine enthielt. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen 100 % Isopropanol versetzt. Im Folgenden wurden die Reaktionsansätze 10 s gevortext und für mindestens 20 min bei -20 °C inkubiert. Das sorgt für die bessere Präzipitation der RNA. Anschließend wurden die Ansätze 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand

verworfen, das entstandene RNA-Pellet zweimal mit 300 µl 70 % Ethanol (verdünnt in RNase freiem DEPC-behandeltem Wasser) versetzt und wie zuvor zentrifugiert. Daraufhin wurde das RNA-Pellet bei Raumtemperatur 5-10 min getrocknet und 20-30 µl DEPC-behandeltes Wasser hinzugegeben. Die RNA wurde über Nacht bei -20 °C gelagert, am Folgetag bei 55-60 °C 6-8 min im Wasserbad gelöst und ihre Konzentration sowie Reinheit (siehe 2.2.9.3) bestimmt. Zusätzlich wurde die RNA in einer 1-%-igen Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.9.2) überprüft. Hierbei ließ sich die Qualität der RNA anhand des für eine biologisch intakte RNA charakteristischen Bandenmusters der ribosomalen Untereinheiten feststellen. Die kurzfristige Lagerung der RNA erfolgte bei -20 °C, längerfristig wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Analyse von Produkten der Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie von Nukleinsäuren und basiert auf der gezielten Auftrennung der Moleküle im Agarosegel nach Anlegen eines elektrischen Feldes. Das Agarosegel fungiert hierbei als Sieb und trennt die Nukleinsäurefragmente der Größe nach auf, wobei die Konzentration des Agarosegels von der Größe der aufzutrennenden Produkte abhängt.

Die isolierte RNA wurde zur Überprüfung in einem 1-%-igem Agarosegel aufgetragen. Hierfür wurde 1 g Agarose abgewogen, mit 100 ml 1x TBE-Puffer erhitzt und anschließend mit GelRed (1/10.000) versetzt. Die flüssige Agarose/GelRed-Mischung wurde auf einen Gelträger mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Die RNA-Proben wurden in die Probentaschen des auspolymerisierten Gels geladen. Die RNA-Proben wurden zuvor 1x mit einem Orange G/Saccharose-Ladepuffer versetzt, wobei die Saccharose eine Erhöhung der Dichte und das Absinken der Probe ermöglicht, während Orange G als Farbstoff zur Erkennung der Lauffront dient. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V für 1,5 h und die anschließende Geldokumentation am *Chemidoc*[™] von Bio-Rad. Abbildung 8 zeigt exemplarisch die aufgetrennte intakte RNA mit ihren ribosomalen Untereinheiten 28S rRNA und 18S rRNA (Martins et al. 2013) im Agarosegel. Die für die Reverse Transkription eingesetzte RNA aller Versuche der vorliegenden Arbeit wies das gezeigte Muster auf.

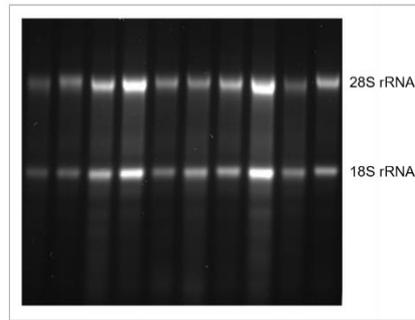


Abbildung 8: Exemplarische Elektrophorese von isolierter Gesamt-RNA in einem 1%-igem Agarosegel

Es wurde 1 μ l isolierte RNA mit 1x Orange G/Saccharose-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung zeigt die ribosomalen Untereinheiten 28S rRNA und 18S rRNA (Martins et al. 2013). Die RNA war intakt und es zeigten sich keine degradierten Fragmente der Proben in der gesamten Laufbahn.

2.2.9.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die fotometrische Messung der optische Dichte im Absorptionsbereich von 260 nm und 280 nm mit Hilfe des BioPhotometers von Eppendorf. Aus den gemessenen Werten errechnet das Gerät die Konzentration der Probe sowie deren Reinheit anhand der Quotientenverhältnisse der optischen Dichten. Zu jeder Messung wurde zunächst der Nullabgleich (Blank) mit dem verwendeten Lösungsmittel durchgeführt. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm mit einer optischen Dichte von 1,0. Für doppelsträngige DNA-Moleküle ergibt sich eine Konzentration von 50 μ g/ml. RNA-Moleküle weisen dabei eine Konzentration von 40 μ g/ml auf. Im Gegensatz dazu liegt das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm. Das daraus zu ermittelnde Verhältnis von OD_{260} und OD_{280} lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe zu. Ein errechneter Quotient von 1,8 weist auf reine DNA hin, während ein Wert von 2,0 für reine RNA steht.

Mit Hilfe der Konzentrationsmessung lässt sich genau ermitteln, wie viel μ l der Nukleinsäuren für eine folgende Reverse Transkription (siehe 2.2.9.4) eingesetzt werden können. Einige der RNA-Proben der vorliegenden Arbeit wiesen einen Quotienten von 1,8 (OD_{260}/OD_{280}) auf und waren somit mit DNA kontaminiert. Vor der Umschreibung wurde daher zum Spalten der enthaltenen DNA ein *DNase I* Schritt eingefügt (siehe 2.2.9.4).

2.2.9.4. Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkription wurde die in der isolierten Gesamt-RNA vorkommende *messenger* RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ermöglicht hierbei anhand eines RNA-Stranges die reverse Transkription zu einer cDNA. Ausgehend von den eingesetzten *Random* Primern (Primer mit zufälligen Nukleotiden), welche an den RNA-Strang hybridisieren, wurde so durch die Polymerase die cDNA synthetisiert.

Von der aus den Zellen oder dem Gewebe isolierten RNA wurde hierzu 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde zunächst mit *DNase I* von Invitrogen™ behandelt um mögliche Kontaminationen mit DNA zu eliminieren. Hierfür wurden je Probe 1 µl 10x *DNase I* Puffer und 1 µl *DNase I* (1 U/µl) verwendet und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt. Das Enzym schneidet doppelsträngige sowie einzelsträngige DNA-Moleküle und benötigt dabei die im Puffer vorhandenen zweifach geladenen Kationen. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Inaktivierung der Reaktion durch die Zugabe von 2 µl EDTA (25 mM) und eine Inkubation für 10 min bei 65 °C. Das EDTA bildet hierbei Komplexe mit den zweifach geladenen Kationen, sodass diese nicht mehr für die *DNase I* zur Verfügung stehen. Darauffolgend wurde die *DNase I*-behandelte RNA für die Reverse Transkription eingesetzt. Die jeweiligen Proben wurden wie in Tabelle 9 aufgelistet angesetzt, auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt und im Thermocycler wie in Tabelle 10 angegeben inkubiert. Die resultierende cDNA wurde im Folgenden als Matrize zur Amplifikation spezifischer Genabschnitte in der Polymerasekettenreaktion (PCR) und *Realtime*-PCR (siehe 2.2.9.5) genutzt. Hierzu wurde die cDNA zuvor im Verhältnis 1:5 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt.

Tabelle 9: Ansatz (1x) für die Reverse Transkription

Substanz	Menge [µl]
RT Puffer (10x)	2
RT Random primer (10x)	2
NTP Mix (25x, 100 mM)	0,8
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1
<i>DNase I</i> behandelte RNA (1 µg)	12

Mit DEPC-behandeltem Wasser auf Endvolumen von 20 µl auffüllen

Tabelle 10: Thermocyclerbedingungen für die Reverse Transkription

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
37 °C	2 h
85 °C	5 min

2.2.9.5. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR/*Realtime*-PCR)

Die quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR/qPCR) oder auch *Realtime*-PCR ist eine sensitivere Methode zur Detektion der Amplifikation spezifischer Genabschnitte. Sie basiert auf dem Grundprinzip einer Polymerasekettenreaktion (PCR – *polymerase chain reaction*). Der sich wiederholenden Zyklus von Denaturierung der DNA, der Hybridisierung spezifischer Primer an die DNA und der Elongation des Bereichs bildet die Basis jeder PCR. Durch die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C entstehen Einzelstränge, die als Matrize dienen. An die einzelsträngigen Moleküle lagern sich komplementär zur Nukleotidsequenz die spezifischen Primer an, wobei die Hybridisierungstemperatur abhängig von den eingesetzten Primern variieren kann. Ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers wird die DNA-Sequenz mittels einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase bei 72 °C verlängert. Die Elongationszeit ist dabei abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Bereichs. Bei einer RT-PCR handelt es sich um eine Endpunkt-PCR, während die qRT-PCR/qPCR/*Realtime*-PCR eine Amplifikation der Moleküle in Echtzeit (*Realtime*) mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes ermöglicht, welcher doppelsträngige DNA bindet und in gebundenem Zustand ein messbares Fluoreszenzsignal emittiert. Hierdurch kann nach jedem Amplifikationsschritt die Menge der amplifizierten DNA ermittelt werden. Die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte wird mittels einer Schmelzkurvenanalyse untersucht. Nach Beendigung jedes Zyklus erfolgt schrittweise die Erhöhung der Temperatur von 55 °C auf 95 °C, was zur Denaturierung der doppelsträngigen Moleküle führt. Da der Fluoreszenzfarbstoff keine Einzelstränge bindet, nimmt die Fluoreszenz kontinuierlich ab. Eine Schmelzkurve wird als negative Ableitung von Fluoreszenz und Temperatur dargestellt, sodass sich ein deutlicher Schmelzpeak für die amplifizierten Produkte ergibt. Abweichungen von diesem Schmelzprofil deuten auf unspezifische Nebenprodukte oder bei Doppelppeak auf ähnliche Varianten des erwarteten PCR-Produktes hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen verwendet. Er ist Bestandteil des verwendeten my-budget EvaGreen® QPCR-Mix II von Bio-Budget. Der 5x Mix beinhaltet eine *Hot-Start Taq* Polymerase, 5x Reaktionspuffer, 12,5 mM MgCl₂, dNTPs und den EvaGreen Farbstoff sowie den Farbstoff ROX als passive interne Referenz. ROX wird zur Normalisierung der Fluoreszenz, die quer von *Well* zu *Well* entstehen kann, verwendet. In dieser Arbeit wurde der qTOWER³G von Analytik Jena zur Durchführung der *Realtime*-PCR verwendet. Bei diesem Gerät ist die Nutzung der passiven Referenz aufgrund der Einzelanregung/Messung jedes *Wells* nicht notwendig. In Tabelle 11 ist der Pipettieransatz pro Probe dargestellt. Es wurde steril-filtriertes Exonuklease- und Nukleinsäure-freies PCR-Wasser zum Auffüllen auf das Endvolumen verwendet. Die Primermixe der untersuchten Gene sind Tabelle 12 zu entnehmen und die Bedingungen zur Durchführung der *Realtime*-PCR, entsprechend der Herstellerangaben, in Tabelle 13 aufgeführt. Für alle Primer wurde in der *Realtime* eine Hybridisierungstemperatur von 60 °C gewählt. Die Messung jeder untersuchten Probe erfolgte in Triplikaten in jeder durchgeführten *Realtime*-PCR.

Tabelle 11: 1x Ansatz für die *Realtime*-PCR im qTOWER³G

Substanz	Menge [µl]
EvaGreen® QPCR-Mix II (5x)	4
Primermix (10 µM)	2
cDNA	1

Mit PCR-Wasser auf Endvolumen von 20 µl auffüllen

Tabelle 12: Verwendete Primermixe für die *Realtime*-PCR

Gene	Primermix (10 µM)
AKT1	AKT1 FW1 & Rv2
CEBPβ	CEBPbeta FW4 & Rv4
CREB1	CREB1 FW1 & Rv2
FOXO1	FOXO1 FW & Rv
GAPDH	GAPDH FW1 & Rv1
HAND2	HAND2 FW2 & Rv4
HPRT1	HPRT1 FW & Rv
PDE3A	PDE3A FW2 & Rv2
PDE3B	PDE3B FW1 & Rv2
PDE4A	PDE4A FW2 & Rv2
PDE4B	PDE4B FW1 & Rv1
PDE4D	PDE4D FW2 & Rv2

Prolaktin	Prolaktin FW & Rv
STAT5	STAT5 FW1 & Rv1

Tabelle 13: Bedingung der *Realtime*-PCR im qTOWER³G

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1. Initiale Denaturierung/Aktivierung <i>Taq</i> -Polymerase	95	15 min
2. Denaturierung	95	15 s
3. Hybridisierung	60	30 s
4. Elongation	72	30 s
5. Schmelzkurve 55 °C bis 95 °C; 15 sec mit ΔT 1 °C		
6. Zyklische Wiederholung 35x von Schritt 2-5		

Die Quantifizierung der Messergebnisse basiert auf der Bestimmung des C_T -Wertes (*threshold cycle*). Der C_T -Wert ist der Wert, bei dem die Akkumulation der PCR-Produkte einen Schwellenwert überschreitet und in die exponentielle Phase übergeht. Je niedriger dieser Wert, desto früher konnten Fluoreszenzen detektiert werden und desto mehr Ausgangsmaterial zur Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes war vorhanden. Das transkriptionelle Verhalten des untersuchten Genabschnitts wurde unter Verwendung einer internen Kontrolle normiert. Als interne Kontrolle (*Housekeeping*-Gen) diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Zusätzlich wurde für die *in vivo* Versuche die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) als *Housekeeping*-Kontrolle genutzt. Die C_T -Werte beider Gene wurden miteinander verrechnet und daraufhin in der unten aufgeführten Gleichung eingesetzt.

Aufgrund des Fehlens einer absoluten Menge an Transkripten wurde in der vorliegenden Arbeit die Amplifizierung des Zielgens in einer Probe relativ zum *Housekeeping*-Gen dieser Probe quantifiziert und auf die jeweilige Behandlungskontrolle bezogen.

Die relative Expression errechnete sich wie bei (Pfaffl 2001) beschrieben durch die Verwendung folgender Gleichungen:

Differenz zwischen Zielgen und Housekeeping-Gen derselben Probe (ΔC_T):

$$\Delta C_T = \text{Mittelwert } C_T(\text{Zielgen}) - \text{Mittelwert } C_T(\text{Housekeeping-Gen})$$

Differenz zwischen zwei Proben ($\Delta\Delta C_T$):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Behandlung}) - \Delta C_T(\text{jeweilige Kontrolle})$$

Relative Expression (fold change):

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(\Delta\Delta C_T)}$$

Nach diesem Prinzip wurden alle in dieser Arbeit durchgeführten *Realtime*-PCRs ausgewertet. Es wurden stets alle für den Versuch relevanten Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Die Proben jedes Behandlungsansatzes wurden zunächst auf das interne GAPDH-Signal bezogen und dann auf ihre jeweilige Lösungsmittelkontrolle normiert. Die Kontrollen sind graphisch auf Höhe einer relativen Expressionsänderung von 1 als horizontale Linie dargestellt (Linie = 1).

2.2.9.6. RT-PCR zur Etablierung der Primer für die *in vivo* Analysen

Zur Verwendung der in Tabelle 1 aufgelisteten Primer für die *in vivo* Versuche, wurde zunächst die Spezies-Spezifität in einer RT-PCR mittels des Thermocyclers von Bio-Rad überprüft. In Tabelle 14 ist der PCR-Pipettieransatz (1x) sowie in Tabelle 15 die Bedingungen zur Durchführung der RT-PCR dargestellt. Die verwendeten Primermixe sind Tabelle 12 zu entnehmen. Der Pipettieransatz wurde mit PCR-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt. Die für die RT-PCRs verwendete *Taq*-Polymerase mit zugehörigem Puffer wurden von Dr. rer. nat. Ralph Waldschütz bereitgestellt. Zur Analyse der RT-PCR wurden die Produkte in einer 2-%-igen Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.9.2) aufgetragen. Entsprechend wurden hierfür 2 g Agarose eingewogen.

Tabelle 14: Ansatz (1x) für RT-PCR mittels Bio-Rad Thermocycler

Substanz	Menge [μ l]
Taq Puffer 'Waldschütz' (10x)	2
dNTP Mix (2,5 mM)	1
Primermix (10 μM)	1
Taq Polymerase 'Waldschütz'	0,5
cDNA	1

Mit PCR-Wasser auf Endvolumen von 20 μ l auffüllen

Tabelle 15: Bedingung zur Durchführung einer RT-PCR im Bio-Rad Thermocycler

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit
1. Hold	105	
2. Initiale Denaturierung	95	1 min
3. Denaturierung	95	20 s
4. Hybridisierung	60	20 s
5. Elongation	72	20 s
6. Zyklische Wiederholung 30x von Schritt 3-5		
7. Finale Elongation	72	4 min

2.2.10. Proteinbiochemische Methoden

2.2.10.1. Prolaktinbestimmung mittels ELISA

Die hESCs sezernieren bei erfolgreicher Dezidualisierung das Protein Prolaktin in den Zellüberstand (Gellersen et al. 2007), das in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines *Enzyme-linked Immunosorbant Assay* (ELISA; IBL International GmbH) nachgewiesen wurde. Grundlage für diesen Sandwich-ELISA bildet eine mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte. Die Antikörper binden dabei an eine definierte Bindungsstelle von in der Probe vorhandenem Prolaktin. Im Anschluss wird ein Enzymkonjugat, welches einen Meerrettichperoxidase konjugierten anti-Prolaktin Antikörper enthält, hinzugegeben. Nach der Inkubation wird nicht gebundenes Konjugat durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Darauffolgend wird eine Substratlösung zugegeben. Das Substrat wird umgesetzt und führt zu einer Farbentwicklung bei Prolaktin-positiven Proben. Durch Zugabe einer Stopplösung wird die Umsetzung des Substrates nach einer definierten Zeit gestoppt und die Absorption

der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm im Spektrometer (SUNRISE™ von TECAN) gemessen.

Nach sechstägiger *in vitro* Induktion der Dezidualisierung von hESCs (siehe 2.2.6) wurde der Zellüberstand der Zellen gesammelt und bis zur Verwendung für die ELISA-Analyse bei -20 °C gelagert. 25 µl/Probe wurde unverdünnt in Triplikaten eingesetzt und der ELISA nach Herstellerinformation durchgeführt. Alle eingesetzten Substanzen sowie deren verwendete Mengen sind der *Instructions for Use (Prolactin ELISA RE52131)* zu entnehmen. Für jeden durchgeführten ELISA wurde ein im Kit enthaltener Standard von 0-100 ng Prolaktin mitgeführt, der zur Erstellung einer Standardkurve diente, anhand welcher sich die absolute Prolaktinkonzentration je analysierter Probe ableiten ließ. Zudem wurde immer eine Prolaktin-positive Probe einer vorangegangenen Platte zur zusätzlichen Kontrolle des ELISAs mitgeführt. Die Messung der Optischen Dichte jeder Mikrotiterplatte wurde ebenfalls in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert dieser Messungen zur Berechnung der Prolaktinkonzentration verwendet.

In allen Versuchsdurchführungen dieser Arbeit wurden die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Diese wurden stets mit ausgewertet und zeigten wie auch die unbehandelte Kontrolle keine Effekte, weshalb sie in der grafischen Darstellung nicht mit aufgeführt wurden.

2.2.10.2. Proteinextraktion

Grundlagen dieser Methode wurden in Anlehnung an Laemmli 1970 durchgeführt, zudem sind Details zur Durchführung dieser Methoden von Rehm und Letzel 2016 entnommen und werden im Einzelnen wie folgt ausgeführt. Die Isolation des Gesamt-Proteins aus den Zellen wurde nach Versuchsende (siehe 2.2.6) auf Eis durchgeführt, um vorhandene Proteasen zu inhibieren. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem 1x DPBS gewaschen und der Überstand restlos entfernt. Je Well wurden 250 µl kalter Lyse-Puffer zugesetzt, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Sowohl die Zellen als auch die homogenisierten Gewebefragmente des *in vivo* Versuchs wurden 30 min auf Eis inkubiert. Alle 5-8 min wurden die Proben für 5 s gevortext. Nach der Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g und 4 °C für 10 min um Zelldebris aus dem

Proteinlysate zu entfernen. Der Überstand wurde entnommen, 100 µl des Zelllysates mit Lämmli-Puffer versetzt und bei 99 °C für 5 min aufgeköcht. Das im Lämmli-Puffer enthaltene β-Mercaptoethanol sorgt für das Aufbrechen der Disulfidbrücken und reduziert diese zu freien Thiolen, wobei das Aufköchen für eine vollständige Denaturierung der Tertiärstrukturen sorgt. Im Anschluss wurden die aufgeköchten Proben sowie das restliche Zelllysate bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung in einer SDS-PAGE aufbewahrt.

2.2.10.3. SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Tricin *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) genutzt. Klassischerweise wird Glycin in einer SDS-PAGE verwendet, welches jedoch im Gegensatz zu Tricin einen höheren pK-Wert aufweist. Die Verwendung von Tricin hingegen eignet sich besser, um Proteine im Größenbereich von 1-100 kDa aufzutrennen. Zudem wird die Diffusion kleinerer Proteine reduziert und somit die Bandenschärfe erhöht (Schägger 2006). Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Tricin-Gele ist unter Punkt 2.1.7 aufgeführt. Die Polymerisation der Gele wurde durch die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) sowie Tetramethylethylendiamin (TEMED) ermöglicht. APS verknüpft die Acrylamid Monomere unter Hilfe des Reaktionskatalysators TEMED miteinander, sodass ein molekulares Sieb entsteht. Durch die Eigenschaft des SDS als nicht-ionisches Detergens wird eine übergeordnete negative Ladung erzeugt und die Proteine wandern nach Anlegen einer elektrischen Spannung unabhängig ihrer Eigenladung zum positiven Pol. Ein Zwei-Puffer-System aus einem im inneren Tank befindlichen Kationen- und einem außerhalb befindlichen Anionen-Puffer, ermöglichte die Aufrechterhaltung eines Ionengradienten und somit eine konstante Spannung von 100 V.

In der vorliegenden Arbeit wurden 8,4-%ige Trenn- sowie 4-%ige Sammelgele mit einer Dicke von 1 mm sowie einem Probenkamm mit 15 Taschen verwendet. Je Gel wurden 3 µl eines Proteingrößenstandard (siehe Abbildung 6 B) mitgeführt. Die bereits zuvor mit Lämmli-Puffer versetzten Proteinlysate (siehe 2.2.10.2) wurden erneut bei 99 °C für 3 min aufgeköcht und anschließend je 20 µl/Probe direkt in die Probentaschen geladen. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V für 10-15 min angelegt, sodass sich die Proben gleichmäßig am Übergang von Sammel- zu Trenngel

lagern konnten, bevor die Spannung auf 100 V erhöht wurde. Der Gellauf wurde nach 2-2,5 h gestoppt. Das Gel wurde aus der Apparatur entnommen und in gekühltem 1x Blotting-Puffer für 15-20 min äquilibriert, bevor der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran im Western blot durchgeführt wurde.

Für den Western blot wurde das äquilibrierte Gel, die Nitrozellulosemembran sowie Filterpapiere in eine dafür vorgesehene Klammer nach Herstellerangaben gespannt und mit gekühltem 1x Blotting-Puffer versetzt. Die Klammer wurde in die vorgesehene Blotting-Kammer gesetzt, mit einem Kühlakku versehen und das Blotting auf Eis durchgeführt. Die angelegte Spannung von 100 V für 1 h sorgte für den Transfer der Proteine. Hierbei liegt das elektrische Feld senkrecht zum Gel, die SDS-beladenen negativ geladenen Proteine wandern in Richtung des positiven Pols auf die Membran und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Der erfolgreiche Transfer wurde mit Hilfe einer reversiblen Ponceau S-Färbung überprüft. Die Nitrozellulosemembran wurde dafür 10 min mit Ponceau S inkubiert und anschließend kurz in VE-Wasser geschwenkt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Der Farbstoff bindet unspezifisch und reversibel alle transferierten Proteine und wurde danach mit Hilfe des *ChemiDoc*TM von Bio-rad dokumentiert. Ein exemplarisches Beispiel einer Ponceau S-Färbung ist in Abbildung 9 dargestellt.

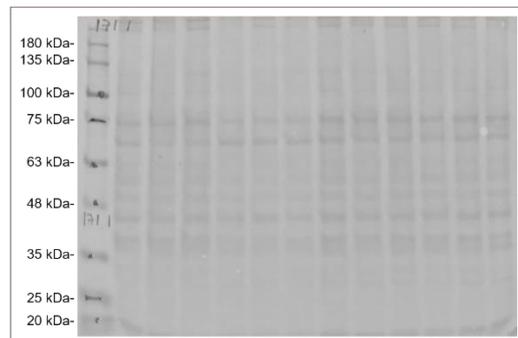


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung einer Ponceau S-Färbung von Gesamtprotein auf einer Nitrozellulosemembran nach einem Western blot mit aufgetragenem Längenstandard (links)

An den Transfer der Proteine auf die Membran schloss sich die Immundetektion der *Proteins Of Interest* an. Hierfür wurde die Membran zunächst 45 min bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulver/1x TBS zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen schüttelnd inkubiert und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper in 2,5 % Magermilchpulver/1x TBS bei 4 °C über Nacht auf dem

Rollmischer inkubiert. Die verschiedenen eingesetzten Primärantikörper sowie ihre Konzentrationen sind Tabelle 16 zu entnehmen. Aufgrund der bekannten Proteingrößen konnten die Membranen entsprechend des zu analysierenden Proteins geschnitten und mit dem zugehörigen Primärantikörper inkubiert werden.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dreimal 10 min schüttelnd mit 1x TBS gewaschen und mit dem mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper (polyklonale Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antikörper; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde hierfür 1:10.000 in 2,5 % Magermilchpulver/1x TBS verdünnt. Nach der Inkubation erfolgten zweimal 10 min Waschschriffe mit 1x TBST und einmal 10 min mit 1x TBS. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das *Imaging System* des *ChemiDoc™* von Bio-Rad verwendet sowie eine frisch angesetzte Entwicklerlösung.

Da die zu analysierenden Proteine oftmals gleiche Molekülmassen aufwiesen und somit auf der Membran auf derselben Höhe lagen, wurden die entsprechenden Membranabschnitte gestrippt. Das Strippen der Membran ermöglicht die Entfernung des Primär- und Sekundärantikörpers und die erneute Inkubation der Membran mit anderen Antikörpern. Die Membranen wurden hierfür nach der ersten Entwicklung einmal in 1x TBS gewaschen und mit Stripping Puffer für 30 min stark schüttelnd inkubiert. Daran anschließend wurden die Membranen unter fließendem VE-Wasser für 5 min gespült und 45 min bei RT in 5 % Milch/1x TBS schüttelnd inkubiert. Die gestrippten Membranen wurden daraufhin 30 min mit dem bereits oben verwendeten Sekundärantikörper (1:10.000 in 2,5 % Milch/ 1x TBS) versetzt und 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS erfolgte die erneute Entwicklung der Membranen. Dieser Schritt diente als Stripping-Kontrolle, ob alle zuvor detektierten Signale durch das Strippen erfolgreich entfernt wurden. Anschließend wurden die Membranen einmal mit 1x TBS gewaschen und erneut über Nacht in dem gewünschten Primärantikörper bei 4 °C inkubiert. Am Tag darauf wurden, wie bereits weiter oben beschrieben, die Membranen mit dem Sekundärantikörper inkubiert und entwickelt.

Bei allen durchgeführten Western blots wurden stets alle für den Versuch relevanten Lösungsmittelkontrollen mit analysiert. Die Western blots wurden densitometrisch mittels *ImageJ* ausgewertet, wobei das Signal der zu analysierenden Proteine

zunächst auf ihr internes GAPDH-Signal und schließlich auf ihre jeweilige Lösungsmittelkontrolle normiert wurden.

Tabelle 16: Verwendete Primärantikörper für den Western blot

Spezifität (Primärantikörper)	Host species	Klon	Typ	Größe [kDa]	Verdünnung in 2,5 % Magermilch pulver/ 1xTBS	Hersteller (Katalog-Nr.)
Anti-AKT1	Rabbit IgG		polyklonal	60	1:1000	Cell signaling technology #9272
Anti-Phospho-AKT1 (Ser473)	Rabbit IgG	(D9E) XP®	monoklonal	60	1:500	Cell signaling technology #4060
Anti-FOXO1	Rabbit IgG	EP927Y	monoklonal	70	1:1000	abcam ab52857
Anti-Phospho-FOXO1 (Thr24)	Rabbit IgG		polyklonal	78-82	1:500	Cell signaling technology #9464
Anti-GAPDH	Rabbit IgG	EPR16891	monoklonal	36	1:1000	abcam ab181602
Anti-Glukokortikoid Rezeptor	Rabbit IgG	(D8H2) XP®	monoklonal	90, 91, 94	1:1000	Cell signaling technology #3660
Anti-HAND2	Rabbit IgG	EPR19451	monoklonal	24	1:500	abcam ab200040
Anti-Progesteron Rezeptor	Rabbit IgG	(D8Q2J) XP®	monoklonal	PRA 90 PRB 118	1:1000	Cell signaling technology #8757

2.2.11. Durchflusszytometrische Analyse

Bei dieser Einzelzell-basierten Messung werden aus der Zellsuspension die Zellen durch Überdruck in eine Messkapillare angezogen und mit zufließendem Puffer versetzt. Im Folgenden passieren die Zellen einzeln einen Laser, wobei von jeder Zelle ein Streulicht erzeugt wird. Dabei bildet der *Forward scatter* (Vorwärtsstreulicht) ein Maß für die relative Größe (FSC) jeder einzelnen Zelle und der *Sideward scatter* (Seitwärtsstreulicht) ein Maß für die Granularität (SSC). Die erzeugten Informationen

werden mit der Programmsoftware (BD CellQuest Pro™) in einem *Dotplot* (Punktwolke) dargestellt. Mit Hilfe des sogenannten *Gatings* kann dann die Hauptpopulation (rechts; R1) von den Zelltrümmern (unten links; R2) getrennt werden, sodass lediglich die Daten der vitalen Zellen mit einfließen. Dieses *Gating* ist exemplarisch in Abbildung 10 dargestellt.

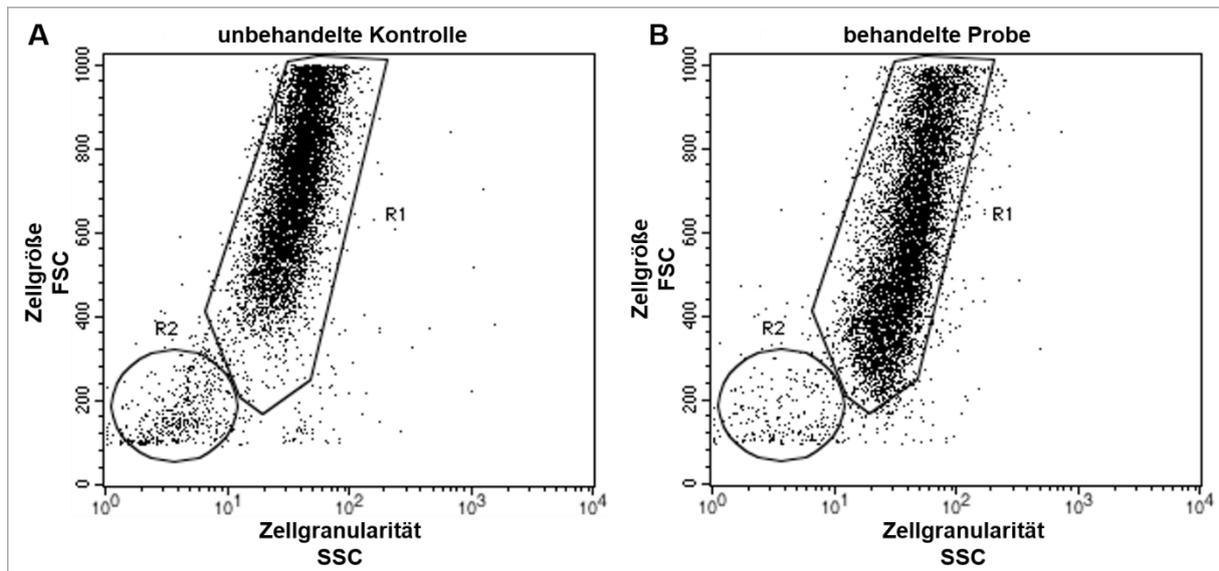


Abbildung 10: Exemplarischer Dotplot nach Durchflusszytometrie

Für die unbehandelte Kontrolle (A) sowie für die behandelte Probe (B) wurde das Gate für die Hauptpopulation (R1) genommen. Die Zelltrümmer (R2) wurden von R1 getrennt und fließen nicht in die ausgewerteten Daten mit ein.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen nach Versuchsende (siehe 2.2.6) mit 1x Trypsin-EDTA abgelöst (siehe 2.2.3), in FBS-haltigem Medium aufgenommen und bei 250 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 200 µl DMEM verdünnt mit DPBS (1:3) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (*FACSCalibur™* Becton Dickinson).

2.2.12. Statistische Auswertung

Die Erstellung der Graphen erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 8. Die statistische Auswertung wurde mit SigmaPlot 12.5 durchgeführt.

Für alle *in vitro* Versuche mit einem $n=3$ wurde eine Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichung vorgenommen. Bei einer Versuchsanzahl von mindestens $n=4$ wurde der Median der analysierten *in vitro* und *in vivo* Daten ermittelt. Der Median gilt im Vergleich zum Mittelwert als robuster gegenüber möglichen Ausreißern. Alle Datensätze wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung überprüft. Alle normalverteilten Daten wurden statistisch mit einem gepaarten t-Test für zwei gepaarte Stichproben analysiert. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde auf 5 % festgelegt, sodass die errechneten p-Werte $<0,05$ der gemessenen Unterschiede der Daten als statistisch signifikant angesehen wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Progesteron- und Glukokortikoid Rezeptorexpression im eutopen Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer medikamentöser Therapien wurde in dieser Arbeit das Zusammenspiel der Progestine Progesteron und Medroxyprogesteronacetat (MPA) mit verschiedenen *Enhancern* des intrazellulären cAMP-Signals untersucht. Sowohl Progesteron als auch MPA wirken über die Bindung an den Progesteronrezeptor (PR) (Moore et al. 2012; Bamberger et al. 2001; Gellersen und Brosens 2014), wobei für MPA auch eine Bindungsaffinität zum Glukokortikoidrezeptor (GR) bekannt ist (Bamberger et al. 2001; Schindler et al. 2008). Sowohl der PR mit seinen Isoformen PRA und PRB als auch der GR wurden im humanen Endometrium beschrieben (Bamberger et al. 2001; Gellersen und Brosens 2003; Gellersen und Brosens 2014). Vor Durchführung der Versuche wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression dieser Steroidhormonrezeptoren in den verwendeten Endometrien zu untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde Endometriumgewebe von 19 Frauen ohne sowie von 17 Frauen mit Endometriose verwendet. Aufgrund der begrenzten Menge an entnommenem Endometrium konnte aus den Geweben von 17 Frauen ohne und von 12 Frauen mit Endometriose Protein für die Western blot-Analyse des PRA und PRB sowie des GR gewonnen werden. In Abbildung 11 sind die zugehörigen Western blots für das Gewebe jeder einzelnen Patientin sowie die densitometrische Auswertung gezeigt. Beide Isoformen des PR, PRA und PRB (Abbildung 11 A, B) sowie der GR (Abbildung 11 C, D) wurden in allen verwendeten Endometriumgeweben exprimiert. Es zeigten sich deutliche inter-individuelle Unterschiede im Expressionslevel der verschiedenen Rezeptoren. Um die Expressionen der Steroidhormonrezeptoren zu quantifizieren, wurden die Western blots densitometrisch ausgewertet. Es waren deutliche Schwankungen in der endogenen Expression der PRs zwischen den Geweben der einzelnen Patientinnen zu erkennen. Die Gewebe der Patientinnen 133, 166, 200 und 184 wiesen eine deutlich stärkere PRB-Expression gegenüber der PRA-Expression auf. Die Isoform PRA wurde hingegen im Endometriumgewebe von sieben anderen Patientinnen (136, 146, 158, 163, 142, 144, 174) deutlich stärker als PRB exprimiert. Alle anderen Endometriumgewebe wiesen geringe Unterschiede zwischen

den Expressionslevel der Isoformen auf (Abbildung 11 B). Die densitometrische Auswertung des GRs zeigte ebenfalls eine inter-individuelle differenzielle Ausprägung der Rezeptorexpression. So wiesen z. B. die Gewebe der Patientinnen 128, 138 und 166 höhere Werte für die GR-Expression auf als die der übrigen Patientinnen (Abbildung 11 D), während das Endometriumgewebe der Patientin 147 eine vergleichsweise deutlich niedrigere GR-Expression aufwies.

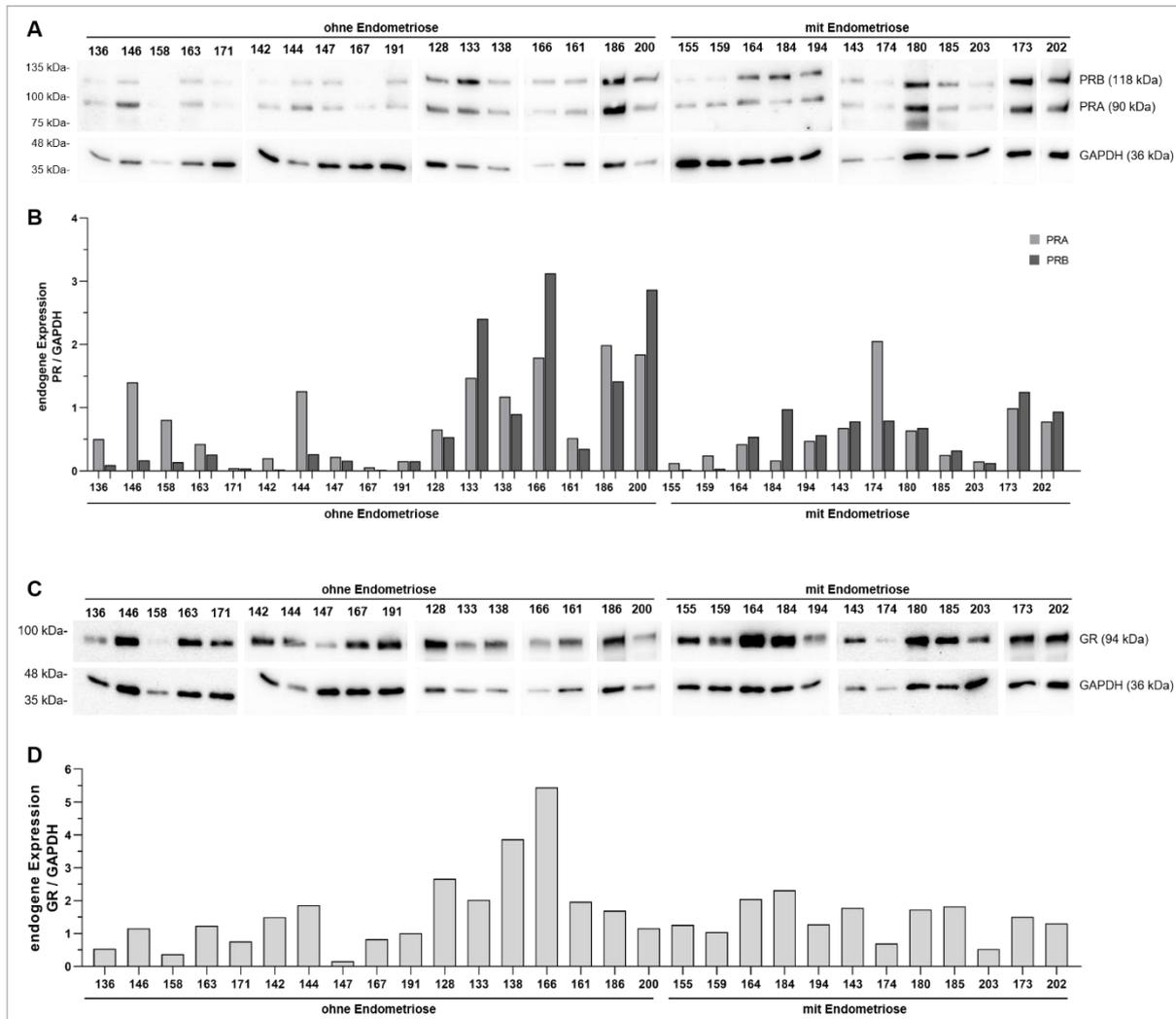


Abbildung 11: Western blot-Analyse der Proteinexpression der Progesteronrezeptoren PRA und PRB sowie des Glukokortikoidrezeptors (GR) im nativem eutopem Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose

(A, C) Proteine aus nativem eutopem Endometrien von 17 Patientinnen ohne und 12 Patientinnen mit Endometriose wurden im Western blot analysiert. (B, D) Die densitometrische Auswertung zeigt die *Ratio* für jede Probe, bei der auf die *Housekeeping*-Kontrolle GAPDH normiert wurde. Es ist erkennbar, dass alle analysierten Patientinnen alle drei untersuchten Rezeptoren exprimierten (PRA und PRB; A, B) und (GR; C, D), wobei individuelle Unterschiede in der Expressionsstärke der Rezeptoren zu verzeichnen sind.

Die Einzelauswertungen des Rezeptorstatus von PR und GR zeigte eine Expression in den Geweben aller Patientinnen. Um die Expression zwischen den Geweben der Patientinnen mit und ohne Endometriose zu vergleichen, wurden die Werte der densitometrischen Auswertung aus Abbildung 11 vergleichend für beide Patientinnenkollektive grafisch zusammengefasst. Tendenziell zeigte sich bei den Geweben der Patientinnen ohne Endometriose ein etwas höheres Expressionslevel an PRA als PRB, während die Gewebe der Patientinnen mit Endometriose eine tendenziell höhere Expression von PRB im Gegensatz zu PRA aufwiesen. Insgesamt war die Expression von PRA in den Geweben der Patientinnen mit Endometriose geringer als in der Kontrollkohorte ohne Endometriose (Abbildung 12 A).

Die Menge an GR war in beiden Patientinnenkollektiven vergleichbar. Es war eine leicht geringere Expression des GRs in Patientinnen mit Endometriose gegenüber denen ohne Endometriose zu erkennen. Bei den Geweben der Patientinnen ohne Endometriose zeigte sich jedoch eine größere Streuung der Einzelwerte (Abbildung 12 B).

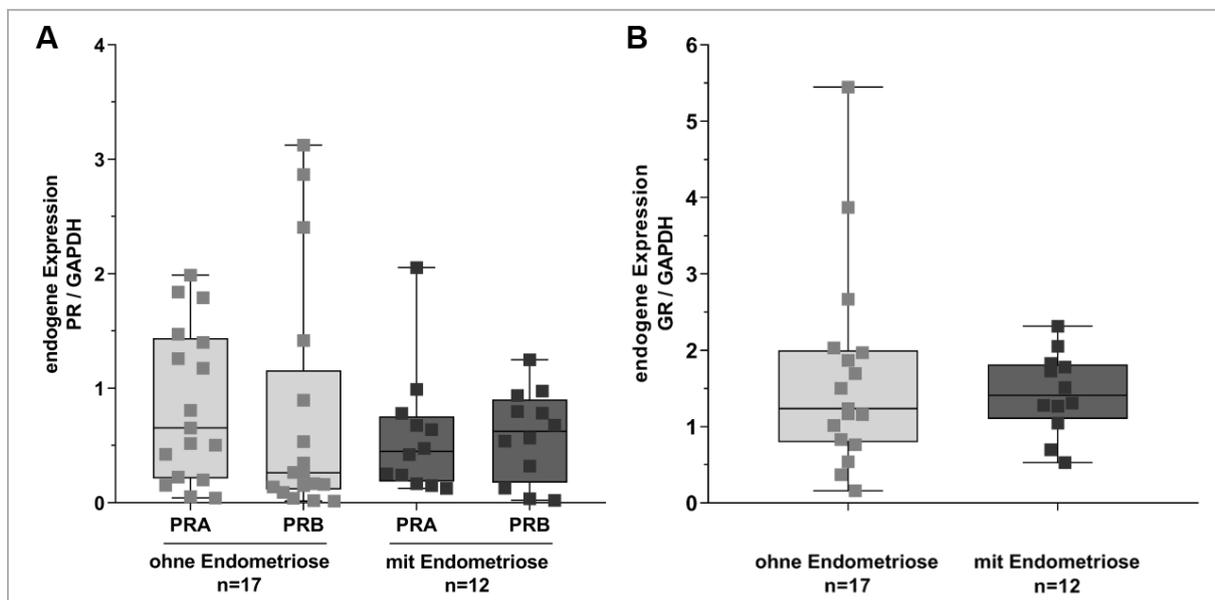


Abbildung 12: Vergleich der Progesteron- (PRA und PRB) sowie Glukokortikoid- (GR) Rezeptormenge im nativem eutopen Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose

Die densitometrische Auswertung für PRA, PRB und GR der einzelnen untersuchten Endometrien aus Abbildung 11 wurden vergleichend für die beiden Patientinnengruppen (n=17 ohne / n=12 mit Endometriose) in einem Boxplot mit Median grafisch zusammengefasst. Der PRA, PRB sowie der GR wurden in beiden Kollektiven exprimiert. (A) Hierbei zeigte sich eine tendenziell höhere Expression der PRA-Isoform gegenüber der PRB-Isoform in den Geweben der Patientinnen ohne Endometriose, während die Gewebe der Endometriosepatientinnen tendenziell eine höhere Expression von PRB auswiesen. Der GR wurde in den Geweben beider Kollektive etwa gleichermaßen exprimiert mit einer leicht erhöhten Expression in den Geweben der Patientinnen mit Endometriose. (B) Es zeigte sich eine etwas größere Streuung der Einzelwerte bei den Geweben der Patientinnen ohne Endometriose.

Somit konnte durch diese Untersuchungen belegt werden, dass die Steroidhormonrezeptoren PRA, PRB und GR in allen eutopen Endometrien der verwendeten Gewebe von Patientinnen mit und ohne Endometriose vorhanden waren, wobei sich in den Geweben der beiden Patientinnenkollektive keine signifikanten Unterschiede zeigten.

3.2. Effekt verschiedener cAMP- und Forskolin-Konzentrationen auf die morphologische und funktionelle Dezidualisierung von hESCs

Es ist bekannt, dass sich der Prozess der *in vitro* Dezidualisierung in hESCs durch cAMP induzieren lässt, wobei dieser Effekt durch die Zugabe von MPA noch gesteigert werden kann (Brosens et al. 1999; Tang et al. 1993; Gellersen und Brosens 2003). Darüber hinaus kann die Dezidualisierung durch den Adenylatcyclaseaktivator Forskolin ausgelöst werden (Tang et al. 1993; Tamura et al. 2007), der zum Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels führt (Houseman et al. 1989). Im Hinblick auf spätere klinische Anwendungen und Medikamentenentwicklung fehlen jedoch bisher sowohl Analysen zur Konzentrationsabhängigkeit von cAMP und Forskolin auf die Dezidualisierungsreaktion als auch zu einem möglichen unterschiedlichen Effekt auf die hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose.

3.2.1. Morphologische Dezidualisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Effekt verschiedener Konzentrationen von 8-Br-cAMP und Forskolin alleine sowie jeweils mit zusätzlicher Gabe von MPA auf hESCs von Frauen ohne Endometriose analysiert. Dafür wurden die konfluenten hESCs über einen Zeitraum von 6 Tagen behandelt und deren Morphologie im Anschluss mikroskopisch überprüft. Es wurden je Behandlung pro Versuchsansatz technische Triplikate durchgeführt. Abbildung 13 zeigt exemplarisch die morphologischen Veränderungen der hESCs an Tag 6. Da die Testsubstanzen in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst wurden, wurden neben einer unbehandelten Kontrolle jeweils auch Lösungsmittelkontrollen mit EtOH und DMSO mitgeführt (siehe Tabelle 6). Die Zellen der unbehandelten Kontrolle, der Lösungsmittelkontrollen sowie der alleinigen MPA-Behandlung wiesen die typische fibroblasten-ähnliche

spindelförmige langgestreckte Zellmorphologie von undifferenzierten Zellen auf (Abbildung 13 A-E). Lediglich Zellen, die mit 40 µl DMSO über den Zeitraum von 6 Tagen inkubiert wurden wiesen hingegen einen ausgedünnten Zellrasen mit nicht adhären Zellen und Zelldebris im Medium auf (Abbildung 13 F).

Alle hESCs, die mit 0,1 mM, 0,25 mM oder 0,5 mM 8-Br-cAMP ohne (Abbildung 13 H-J) oder mit Zusatz von MPA (Abbildung 13 L-N) behandelt wurden sowie die mit 10 µM oder 25 µM Forskolin alleine (Abbildung 13 P, Q) oder in Kombination mit MPA-behandelten (Abbildung 13 T, U) Zellen wiesen die für dezidualisierte Zellen typische morphologische Veränderungen zu einem epitheloiden, rundlichen Phänotypen auf. Dieser Effekt war bei den mit 0,05 mM 8-Br-cAMP oder 1 µM Forskolin alleine (Abbildung 13 G, O) oder in Kombination mit MPA-behandelten (Abbildung 13 K, S) Zellen geringer. Hier waren vermehrt noch langgestreckte Zellen erkennbar. Entsprechend der Morphologie nach Inkubation mit 40 µl des Lösungsmittels DMSO erschien auch der Zellrasen in den mit 100 µl Forskolin ± MPA-behandelten Zellen ausgedünnt (Abbildung 13 R, V), jedoch waren hier noch mehr langgestreckte, nicht abgelöste Zellen zu beobachten als bei der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle.

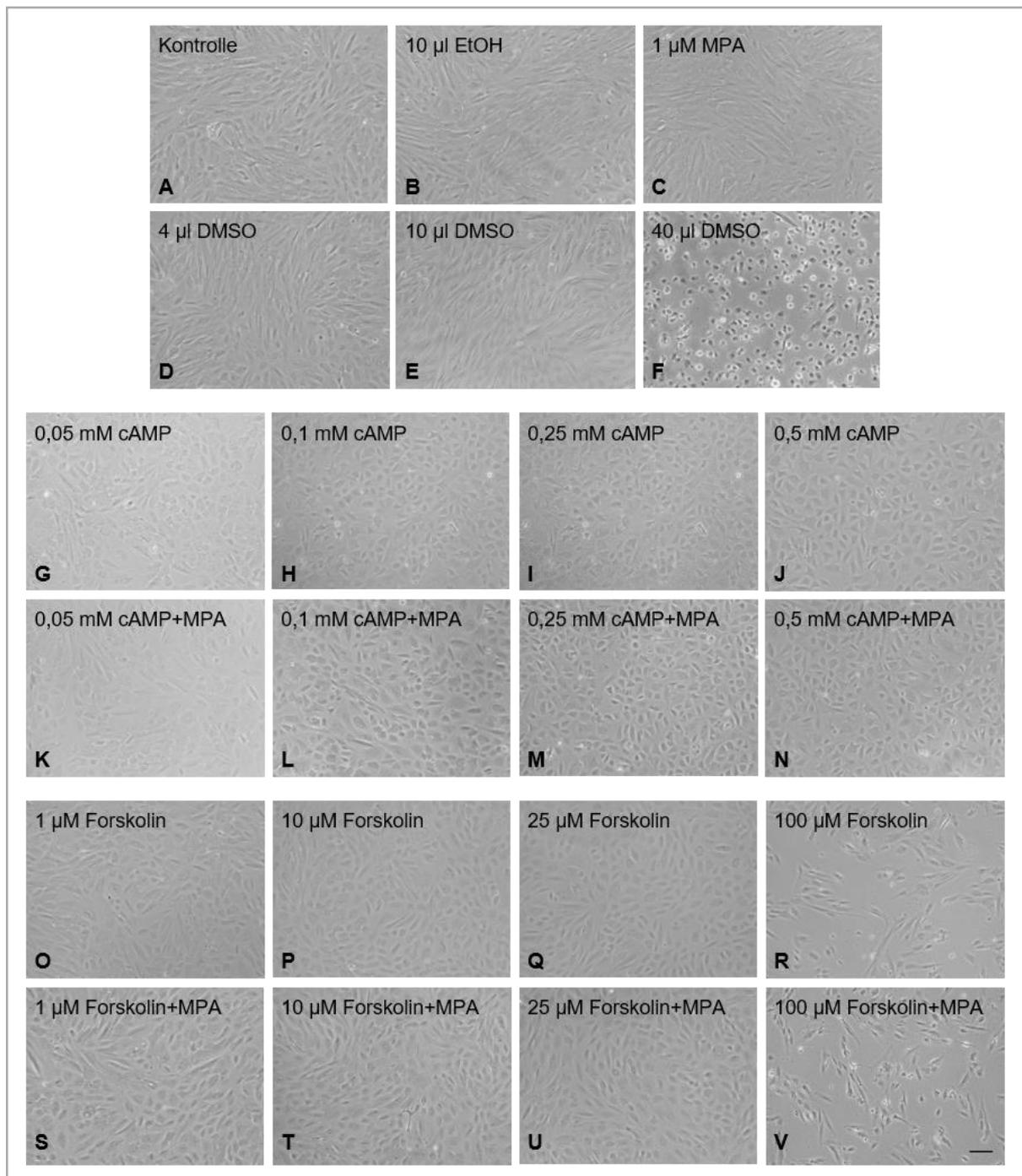


Abbildung 13: Morphologische Dezidualisierung von hESCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von 8-Br-cAMP (cAMP) oder Forskolin alleine und in Kombination mit MPA

hESCs *Monolayer* wurden 6 Tage mit verschiedenen Konzentrationen 8-Br-cAMP (0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM) alleine (**G-J**) oder in Kombination mit 1 µM MPA (**K-N**) sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen Forskolin (1 µM, 10 µM, 25 µM, 100 µM) alleine (**O-R**) oder in Kombination mit 1 µM MPA (**S-V**) oder 1 µM MPA alleine (**C**) behandelt. Parallel wurden unbehandelte hESCs (**A**) sowie Lösungsmittelkontrollen für EtOH (**B**) und DMSO (**D-F**) mitgeführt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit hESCs verschiedener Patientinnen ohne Endometriose in technischen Triplikaten durchgeführt. Exemplarisch sind die hESCs einer Patientin dargestellt. Morphologisch sind undifferenzierte Zellen durch eine fibroblasten-ähnliche Morphologie charakterisiert, während dezidualisierte Zellen eine epitheloide Morphologie aufweisen. hESCs, die mit 0,1 mM, 0,25 mM oder 0,5 mM 8-Br-cAMP oder mit 10 µM oder 25 µM Forskolin alleine sowie in Kombination mit MPA behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (**A**) und im Vergleich zu MPA alleine (**C**) sowie der Lösungsmittelkontrollen (**B, D-F**) morphologisch dezidualisierte Zellen auf. Maßstab \cong 100 µm.

3.2.2. Zellgröße und Granularität

Die morphologische Dezidualisierung von hESCs lässt sich über das veränderte Erscheinungsbild der Zellen mikroskopisch erkennen. Zur Beurteilung der morphologischen Umbildung von fibroblasten-ähnlichen zu epitheloiden Zellen aufgrund der Dezidualisierungsinduktion wurde auch die Zellgröße mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Um zu überprüfen, ob die Dezidualisierungsreaktion auch zu Änderungen der Zytoplasmastruktur der Zellen führt, wurde zudem die Granularität der Zellen ermittelt. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der in 3.2.1 beschriebenen hESCs dargestellt. Hierbei wurde mittels *Forward scatter* die Zellgröße sowie mittels *Sideward scatter* die Zellgranularität ermittelt. In jeder Versuchsdurchführung wurden eine unbehandelte Kontrolle sowie die Lösungsmittelkontrollen EtOH und DMSO (nicht graphisch dargestellt) mitgeführt. Die Ergebnisse jeder Probe wurden auf ihre jeweilige Kontrolle bezogen (Linie = 1) und als *fold change* der relativen Einheit (RU) der gemessenen Zellgröße (Abbildung 14 A, B) sowie -granularität (Abbildung 14 C, D) angegeben. Die Graphen zeigen die Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung sowie die Einzelwerte jeder Behandlung.

Eine Behandlung der Zellen mit 0,1 mM, 0,25 mM und 0,5 mM 8-Br-cAMP jeweils \pm MPA führte zu einer durchschnittlichen Verringerung der Zellgröße. Diese konzentrationsabhängige Verringerung war bei den mit 0,25 mM und 0,5 mM 8-Br-cAMP \pm MPA-behandelten Zellen im Vergleich zu den mit 0,1 μ M 8-Br-cAMP-behandelten Zellen deutlicher und für 0,5 mM 8-Br-cAMP signifikant (Abbildung 14 A). Auch die Behandlung mit 1 μ M, 10 μ M und 25 μ M Forskolin führte zu einer tendenziellen Abnahme der Zellgröße im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, wobei diese für 10 μ M und 25 μ M Forskolin signifikant war. Diese Reduktion der Zellgröße fiel in Kombination mit MPA geringer aus (Abbildung 14 B).

Die Zellen, die mit 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM sowie 0,5 mM 8-Br-cAMP jeweils \pm MPA inkubiert wurden, wiesen eine signifikant erhöhte Granularität im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle auf. Die alleinige Behandlung mit MPA sowie die Kombinationen mit 8-Br-cAMP zeigten geringfügig höhere Werte als die Behandlungen ohne MPA (Abbildung 14 C). Im Vergleich zu den 8-Br-cAMP-behandelten Zellen wiesen die Forskolin behandelten Zellen eine verringerte Granularität auf. Lediglich die

mit MPA sowie mit 1 μ M Forskolin + MPA-behandelten Zellen wiesen eine leichte Erhöhung der Granularität auf (Abbildung 14 D).

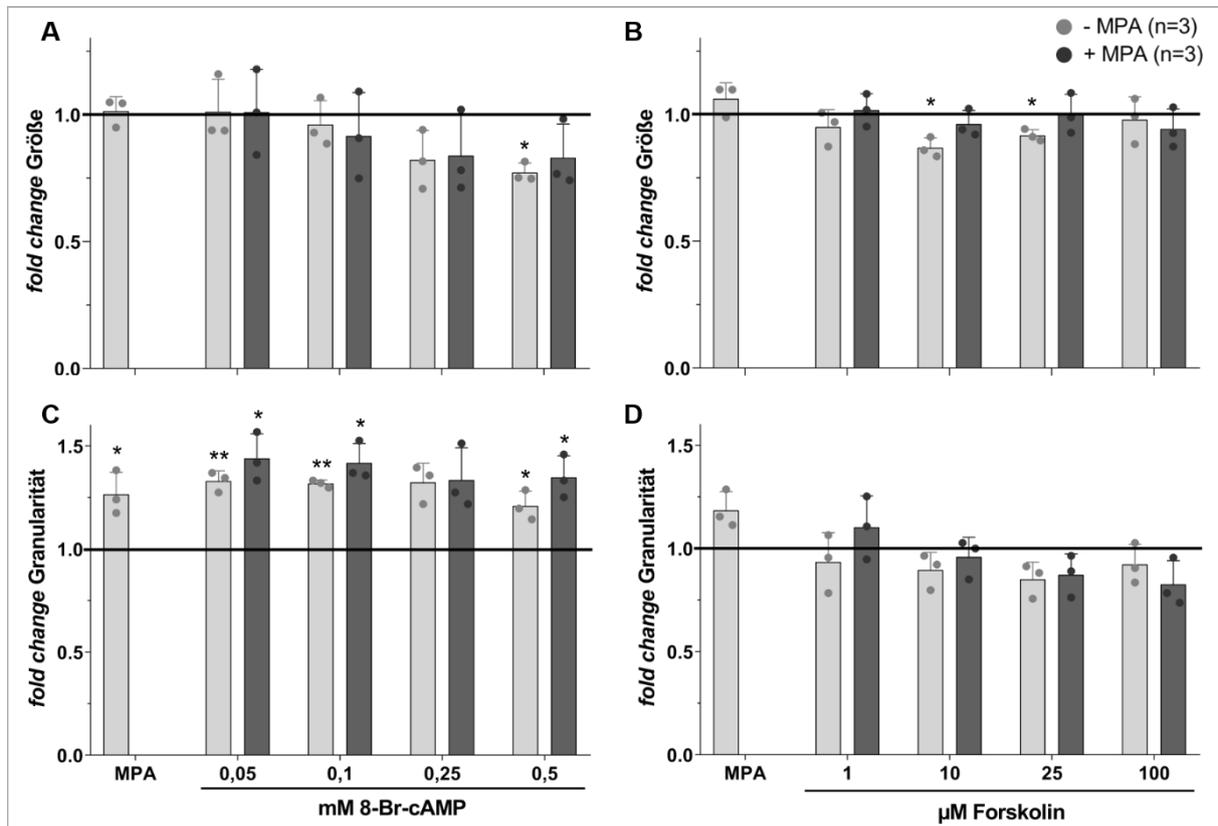


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Messung der Zellgröße sowie -granularität nach Behandlung von hESCs mit verschiedenen Konzentrationen von 8-Br-cAMP und Forskolin alleine oder in Kombination mit MPA

Die hESCs wurden 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM) oder Forskolin (1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 100 μ M) alleine (hellgrau) und in Kombination mit 1 μ M MPA (dunkelgrau) behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in einer durchflusszytometrischen Analyse die Zellgröße (*Forward scatter*; **A, B**) und -granularität (*Sideward scatter*; **C, D**) jeder Probe bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert (Linie = 1) und der *fold change* ermittelt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung sowie die Einzelwerte von drei Patientinnen ohne Endometriose. (**A, C**) Unter Behandlung von 8-Br-cAMP (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM) alleine und mit MPA verringert sich die Zellgröße bei gleichzeitigem signifikantem Anstieg der Zellgranularität. (**B, D**) Forskolin-behandelte (10 μ M, 25 μ M) Zellen zeigen eine Verringerung der Zellgröße sowie der -granularität. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ zur unbehandelten Kontrolle / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle.

3.2.3. Funktionelle Dezidualisierung

Die morphologische Dezidualisierung lässt sich mittels Mikroskopie qualitativ erkennen. Jedoch lässt sich hierdurch keine Aussage über eine funktionelle Dezidualisierung machen. Diese kann überprüft werden, indem das für die Dezidualisierung charakteristische Markerprotein Prolaktin, welches von Deziduazellen sezerniert wird, quantifiziert wird. Im Folgenden wurde daher die Konzentration von Prolaktin im Zellüberstand der hESCs an Tag 6 mittels ELISA bestimmt und die Mittelwerte aus den Werten von drei Patientinnen sowie ihre Einzelwerte graphisch dargestellt (Abbildung 15). Die unbehandelte Kontrolle sowie auch die Lösungsmittelkontrollen EtOH und DMSO (nicht dargestellt) und die alleinige Behandlung mit MPA zeigten keine Prolaktinproduktion.

Nach Zugabe von 8-Br-cAMP in einer Konzentration ab 0,1 mM stieg die Konzentration von Prolaktin im Zellüberstand deutlich an, wobei die Behandlung mit 0,25 mM cAMP zur höchsten Prolaktinkonzentration führt. Bei allen verwendeten 8-Br-cAMP Konzentrationen wurde die Prolaktinsekretion in der Kombination mit dem Progestin MPA gesteigert. Auffällig war hier, dass die Patientinnen stärkere inter-individuelle Streuungen bei den Kombinationen mit MPA im Vergleich zu den alleinig mit 8-Br-cAMP-behandelten Zellen aufwiesen. Die alleinige Behandlung der hESCs mit Forskolin führte nur mit einer Konzentration von 10 μ M und 25 μ M zu einer geringen Steigerung der Prolaktinkonzentration. Bei der Inkubation der hESCs mit 1 μ M, 10 μ M und 25 μ M Forskolin konnte die Prolaktinsekretion durch die Zugabe von MPA jedoch deutlich gesteigert werden (Abbildung 15 B). Bei den mit 100 μ M Forskolin \pm MPA-behandelten Zellen konnte keine Prolaktinsekretion nachgewiesen werden. Diese Zellen wiesen bereits mikroskopisch einen sichtbar dünnen Zellrasen mit zahlreichen abgelösten Zellen auf, ebenso wie die nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel (40 μ l DMSO) behandelten Zellen (Abbildung 13 F, R, V), sodass sich die fehlende Prolaktinproduktion wahrscheinlich auf ein durch die hohe Konzentration des Lösungsmittels bedingtes Absterben der Zellen zurückführen lässt.

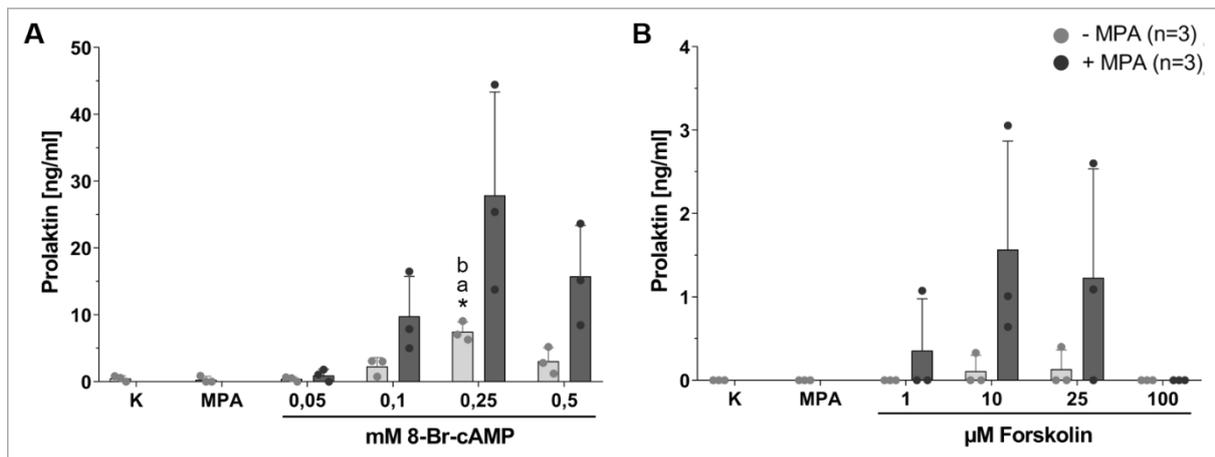


Abbildung 15: Prolaktinkonzentration im Mediumüberstand nach Induktion der Dezidualisierung von hESCs durch verschiedene Konzentrationen von 8-Br-cAMP und Forskolin alleine oder in Kombination mit MPA

Konfluente hESCs *Monolayer* wurden mit cAMP und Forskolin (0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM 8-Br-cAMP oder 1 µM, 10 µM, 25 µM, 100 µM Forskolin) jeweils alleine (hellgrau) oder in Kombination mit 1 µM MPA (dunkelgrau) behandelt. Die funktionelle Dezidualisierung wurde durch den Prolaktinnachweis im Zellüberstand mittels ELISAs an Tag 6 gemessen. Je Versuchsdurchführung wurden die Lösungsmittelkontrollen EtOH und DMSO sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) mitgeführt. Die Lösungsmittelkontrollen (nicht gezeigt) zeigten wie auch die unbehandelte Kontrolle keine Prolaktinkonzentration. Die Daten zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung des Prolaktinergehalts in ng/ml sowie die Einzelwerte von drei Patientinnen ohne Endometriose. (A) Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich eine deutliche Prolaktinsekretion nach Behandlung mit 0,1 mM, 0,25 mM und 0,5 mM 8-Br-cAMP gemessen werden. Diese wurde in Kombination mit MPA gesteigert. (B) Während die Prolaktinkonzentration durch 10 µM und 25 µM Forskolin nur leicht anstieg, wurde sie bei 1 µM, 10 µM und 25 µM Forskolin durch die Zugabe von MPA deutlich erhöht. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$ zur unbehandelten Kontrolle / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,05$ a) zu 0,1 mM 8-Br-cAMP b) zu 0,5 mM 8-Br-cAMP.

Die hier dargestellten Versuche zeigen somit, dass eine Inkubation der hESCs mit Induktoren des cAMP-Signalweges zu einer morphologischen Differenzierung hin zu Deziduazellen führt. Die Bestimmung des Markerproteins Prolaktin, welches ein Charakteristikum für die terminale Differenzierung der hESCs ist, zeigte, dass bereits geringere Konzentrationen von 8-Br-cAMP (0,1 mM, 0,25 mM) oder Forskolin (10 µM) in Kombination mit MPA eine funktionelle Dezidualisierung der Zellen bewirken. Dabei ist jedoch erkennbar, dass im Gegensatz zu den cAMP-Behandlungen die Forskolin-behandelten hESCs eine deutlich geringere Prolaktinsekretion und somit eine insgesamt geringere Differenzierung aufwiesen. Bei beiden Versuchsgruppen, 8-Br-cAMP und Forskolin, konnte die Prolaktinsekretion durch die gleichzeitige Gabe von MPA gesteigert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde daher im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen an 8-Br-cAMP (0,25 µM) und Forskolin (10 µM) eingesetzt, bei denen die Dezidualisierungsreaktion am höchsten ausfiel.

3.3. Vergleich des Effekts von MPA und Progesteron auf die Dezidualisierungsinduktion über den cAMP-vermittelten Signalweg

3.3.1. Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von MPA und Progesteron auf die 8-Br-cAMP-induzierte Dezidualisierung

Die Progesteron-abhängige Umbildung endometrialer Stroma- in Dezidualzellen ist ein kritischer Schritt des Endometriums zur Vorbereitung auf eine Schwangerschaft (Brosens und Gellersen 2006). *In vitro* Studien zeigten, dass dieser Prozess durch Progesteron oder auch durch das synthetische Progestin MPA ausgelöst und über cAMP weitervermittelt werden kann (Brar et al. 1997; Gellersen und Brosens 2003), wobei die kombinierte Behandlung von cAMP und einem Progestin einen stärkeren Effekt zu zeigen scheint (Brosens et al. 1999). In bisherigen Studien wurden die beiden Progestine einzeln in Konzentrationen eingesetzt. MPA wies hierbei mit 1 μM eine 10-fach höhere Konzentration auf als Progesteron mit 100 nM (Brar et al. 1997; Matsuoka et al. 2010; Houserman et al. 1989). In der vorliegenden Arbeit sollten daher vergleichbare Bedingungen durch den Einsatz gleicher Progestinmengen im Hinblick auf ihren steigernden Effekt auf die cAMP-vermittelte Induktion der Dezidualisierung von hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose untersucht werden.

Humane ESCs von je drei Patientinnen mit und ohne Endometriose wurden mit 1 μM und 100 nM MPA oder Progesteron in Kombination mit 8-Br-cAMP (0,25 mM) behandelt und der Zellüberstand an Tag 6 auf den Gehalt von Prolaktin als Marker für die funktionelle Dezidualisierung analysiert. Abbildung 16 stellt die Ergebnisse der Prolaktin-ELISA-Messung der einzelnen Behandlungen als Mittelwert mit Standardabweichung sowie die Einzelwerte der Patientinnen graphisch dar. Es ist erkennbar, dass die alleinige Behandlung mit den Progestinen MPA und Progesteron in beiden Konzentrationen nicht zu einer Induktion der Sekretion von Prolaktin führten. Eine alleinige Behandlung mit 8-Br-cAMP erzielte einen Anstieg der Prolaktinsekretion, welcher in Kombination mit Progesteron ähnlich ausfiel, jedoch durch eine Kombination mit dem Progestin MPA deutlich gesteigert wurde. Beide eingesetzten Konzentrationen von MPA verstärkten die 8-Br-cAMP Wirkung, was nicht durch die äquivalenten Konzentrationen von Progesteron erreicht werden konnte. Dieser Effekt war in beiden Patientinnenkohorten zu beobachten, wobei er in der Kohorte ohne

Endometriose signifikant war. Es ist erkennbar, dass der Einsatz einer 10-fach höheren Menge an Progesteron (1 μM) keinen stärkeren Effekt hatte, wie die geringeren Konzentrationen von Progesteron und der Effekt beider Konzentrationen deutlich geringer war als der entsprechenden MPA-Konzentration. Da der Unterschied im Effekt von MPA und Progesteron auf die cAMP-vermittelte Induktion der Dezidualisierung somit offensichtlich nicht von der verwendeten Progestin-Konzentration abhängig ist, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die aus der Literatur bekannten Konzentrationen für MPA (1 μM) und Progesteron (100 nM) eingesetzt.

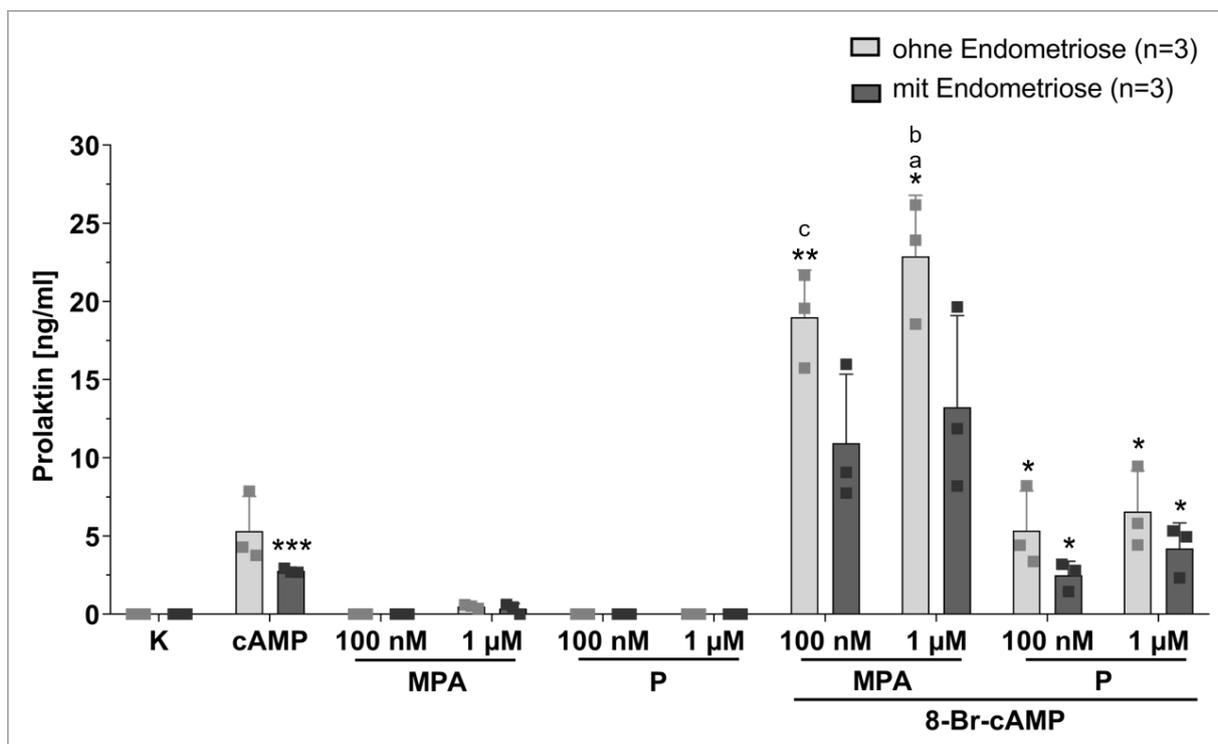


Abbildung 16: Vergleich der Prolaktinsekretion von hESCs nach Induktion der Dezidualisierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von MPA und Progesteron

Monolayer von hESCs von Patientinnen ohne (hellgrau; n=3) und mit (dunkelgrau; n=3) Endometriose wurden mit je 1 μM und 100 nM MPA oder Progesteron (P) alleine sowie in Kombination mit 8-Br-cAMP (0,25 mM) behandelt. Die Prolaktinsekretion im Zellüberstand wurde an Tag 6 im ELISA überprüft. Es wurde der Mittelwert des Prolaktinergehalts in ng/ml mit Standardabweichung sowie die Einzelwerte der Patientinnen angegeben. Alle cAMP behandelten Zellen zeigten im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle (K) und zu den alleinigen Progestin Behandlungen eine gesteigerte Prolaktinsekretion. Zudem wiesen alle cAMP-Behandlungen in Kombination mit MPA eine höhere Prolaktinsekretion als die vergleichbaren Behandlungen mit Progesteron auf, wobei 1 μM MPA den stärksten Effekt zeigte. Der gemessene Prolaktinergehalt im Mediumüberstand war für die hESCs der Patientinnen ohne Endometriose für alle Behandlungen höher als der der hESCs von Endometriosepatientinnen. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ zur unbehandelten Kontrolle / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,05$ a) zu 8-Br-cAMP+100 nM MPA; b) zu 8-Br-cAMP+1 μM P; c) zu 8-Br-cAMP+100 nM P.

3.3.2. Vergleich des Progestineffekts auf die cAMP- und Forskolin-induzierte Dezidualisierung

Der Effekt der beiden Progestine Progesteron und MPA wurde im Folgenden auf die durch das membrangängige Molekül 8-Br-cAMP bzw. durch den Adenylatcyclaseaktivator Forskolin-induzierte Dezidualisierung analysiert.

Hierzu wurden hESCs von je fünf Patientinnen mit und ohne Endometriose mit 8-Br-cAMP (0,25 mM) oder Forskolin (10 μ M) sowie den Progestinen MPA (1 μ M) und Progesteron (100 nM) behandelt. An Tag 6 der Behandlung wurde der Prolaktin Gehalt in den Zellüberständen analysiert. Abbildung 17 stellt den Median im Boxplot sowie die Einzelwerte für die Ergebnisse der Prolaktin-ELISA-Messung der einzelnen Behandlungen grafisch dar. Die alleinige 8-Br-cAMP-Behandlung zeigte eine Induktion der Prolaktinsekretion, was sich durch die zusätzliche Gabe von MPA steigern ließ, wie auch in Abbildung 16 gezeigt, steigern ließ. Die gleichzeitige Gabe von Progesteron zeigte diesen Effekt jedoch nicht. Hierbei wiesen die Endometriosepatientinnen tendenziell einen geringeren Prolaktin Gehalt auf (Abbildung 17). Auch bei der Forskolin-induzierten Dezidualisierung führte die Kombination mit Progesteron nicht zu einem weiteren Anstieg der Prolaktinsekretion, jedoch konnte durch die Kombination von Forskolin und MPA eine Erhöhung verzeichnet werden, welche für die hESCs der Endometriosepatientinnen signifikant ($p < 0,01$) war. Forskolin wies somit in der Kombination mit MPA die gleiche Tendenz wie die Behandlung mit 8-Br-cAMP in der Kombination mit MPA auf, jedoch war der Effekt des Forskolins insgesamt geringer. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Forskolin im Gegensatz zum 8-Br-cAMP die gleichzeitige Gabe von MPA benötigt, um einen deutlichen Effekt auf die Prolaktinsekretion in den hESCs hervorzurufen.

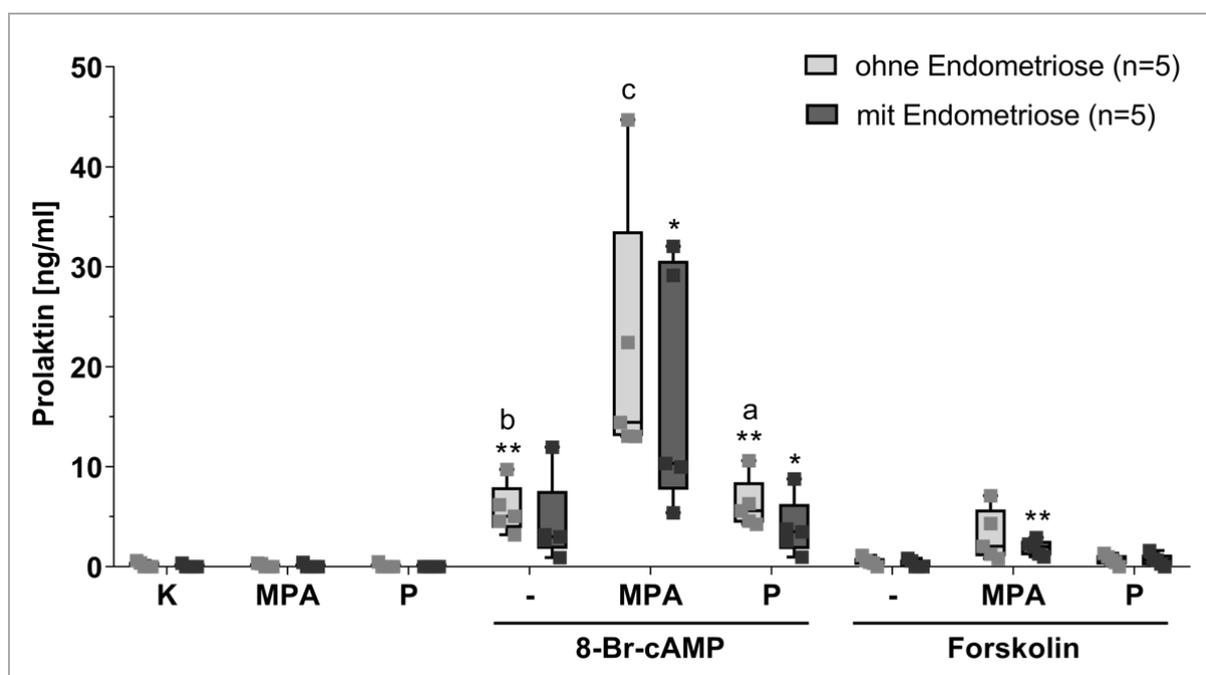


Abbildung 17: Behandlungen mit Forskolin alleine oder in Kombination mit Progestinen führen zu einer deutlich geringeren Prolaktinsekretionen von hESCs im Vergleich zu entsprechenden 8-Br-cAMP-Behandlungen

Konfluente *Monolayer* von hESCs wurden mit 8-Br-cAMP (0,25 mM) oder Forskolin (10 μ M) sowie mit den Progestinen MPA (1 μ M) oder Progesteron (P; 100 nM) alleine oder in Kombination inkubiert. An Tag 6 erfolgte die Quantifizierung von Prolaktin im Zellüberstand mittels ELISAs. Angezeigt wird der Median des Prolaktinergehalts in ng/ml in Boxplots sowie die Einzelwerte für die jeweils fünf Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. Unter allen Behandlungen mit 8-Br-cAMP stieg die Prolaktinkonzentration signifikant im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (K) an. Diese wurde in der Kombination mit MPA nochmal zusätzlich erhöht. Vergleichend hierzu führten die Behandlungen mit Forskolin nur zu einer geringen Prolaktinkonzentrationssteigerung in allen Versuchsgruppen. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ zur unbehandelten Kontrolle / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,05$ a) zu P; b) zu F; c) zu 8-Br-cAMP+P

3.3.3. Analyse Dezidualisierungs-assoziiierter Faktoren

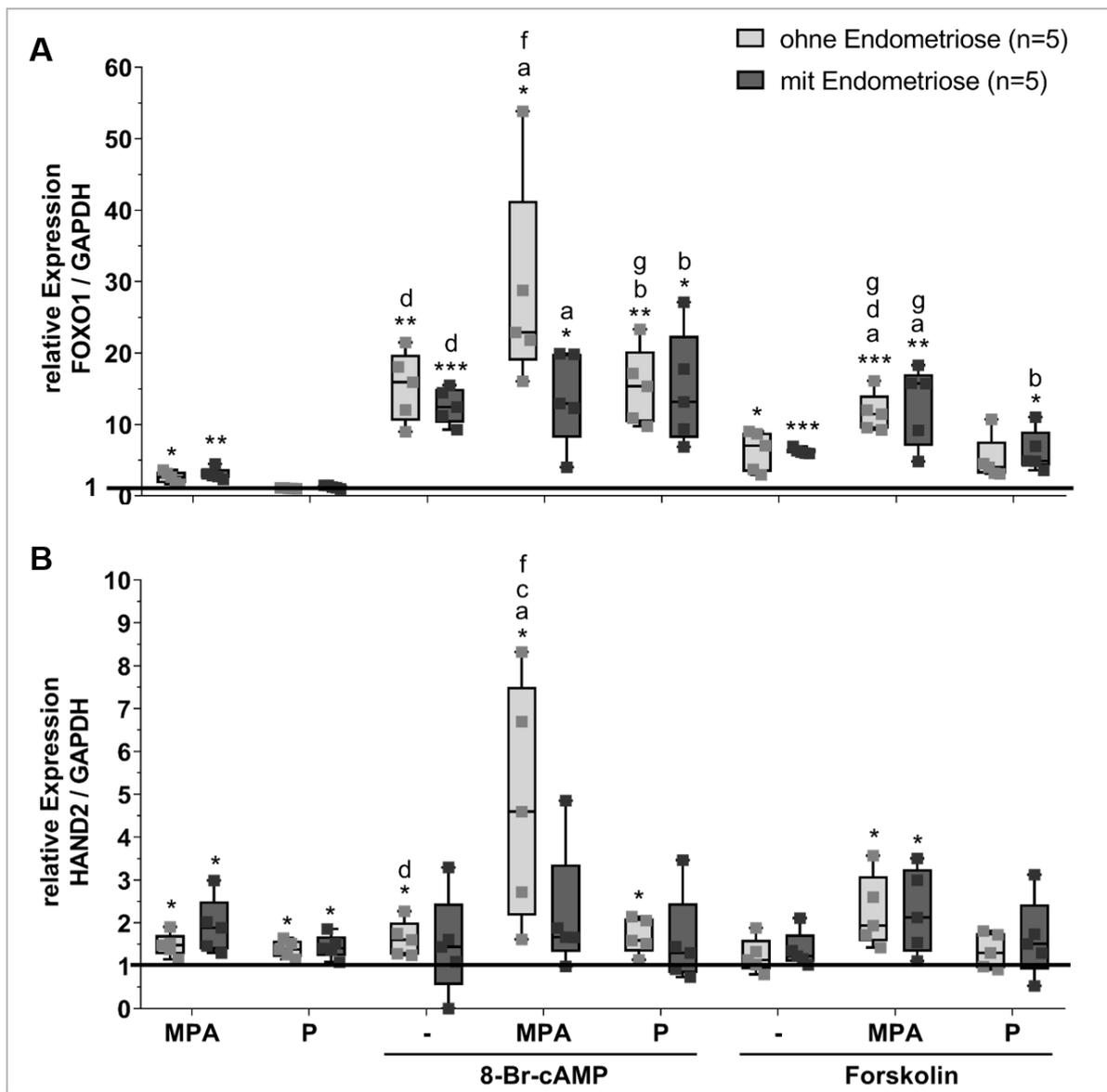
Zusätzlich zur Bestimmung der Prolaktinsekretion wurden als Marker der Dezidualisierungsinduktion die Expression beteiligter Transkriptionsfaktoren (FOXO1, HAND2, CEBP β , STAT5) mittels *Realtime*-PCR in allen Proben untersucht. Die Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren wurden auf das jeweilige GAPDH-Signal gerechnet und auf ihre jeweilige Kontrolle (Linie = 1) normiert, was für alle durchgeführten *Realtime*-PCRs in dieser Arbeit gleichermaßen durchgeführt wurde. Aus den Ergebnissen wurde der Median ermittelt und im Boxplot mit den zugehörigen Einzelwerten für die Patientinnen mit und ohne Endometriose aufgetragen. Die FOXO1-Transkription stieg parallel zum Prolaktinergehalt (siehe Abbildung 17) in allen Behandlungen mit 8-Br-cAMP und Forskolin signifikant an (Abbildung 18 A). Die hESCs von Patientinnen mit Endometriose reagierten hierbei jedoch in den Kombinationen mit 8-Br-cAMP im Vergleich zu den hESCs von Patientinnen ohne

Endometriose geringer. Im Hinblick auf die Transkription von FOXO1 zeigten sich für beide Behandlungsansätze (8-Br-cAMP, Forskolin) signifikant höhere Werte durch die Kombination mit MPA. Bereits eine alleinige Behandlung mit MPA führte zu einem signifikanten Anstieg der FOXO1-Transkription (Abbildung 18 A), wobei jedoch keine Erhöhung der Prolaktinsekretion zu verzeichnen war (Abbildung 17).

Wie FOXO1 wurde auch die Transkription von HAND2 bereits durch die alleinige Behandlung mit MPA und Progesteron signifikant ($p < 0,05$) gesteigert, wobei hESCs von Endometriosepatientinnen im Vergleich zu den hESCs des Kontrollkollektivs geringfügig höhere Werte unter Einfluss von MPA zeigten (Abbildung 18 B). Auch die alleinige Behandlung mit 8-Br-cAMP oder Forskolin führte zu einem deutlichen Anstieg der relativen HAND2-Expression. Diese wurde bei den hESCs der Patientinnen ohne Endometriose durch die Kombination mit MPA signifikant, bei den hESCs der Patientinnen mit Endometriose jeweils nur leicht gesteigert.

Die Transkription von CEBP β wurde durch Progesteron alleine, nicht aber durch MPA erhöht. Die Zugabe von 8-Br-cAMP führte generell zu einer gesteigerten Transkription von CEBP β , die bei den hESCs der Patientinnen mit Endometriose durchschnittlich höher war, aber auch eine stärkere Streuung aufwies (Abbildung 18 C). Der Einfluss von Forskolin auf die relative CEBP β -Transkription fiel deutlich geringer aus als der von 8-Br-cAMP und zeigte in allen Ansätzen nur niedrige Werte.

In Abbildung 18 D ist die relative STAT5-Transkription dargestellt. Auch hier führte die alleinige Behandlung mit Progesteron oder 8-Br-cAMP zu einem signifikanten Anstieg dieses Transkriptionsfaktors, der für 8-Br-cAMP bei den hESCs der Patientinnen mit Endometriose deutlicher ausfiel. Interessanterweise wurde die 8-Br-cAMP-vermittelte Induktion in den Zellen beider Patientinnenkollektive durch Progesteron leicht und durch MPA fast vollständig gehemmt. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Effekt der Behandlung mit Forskolin alleine und kein Unterschied der Behandlung mit Forskolin und Progesteron im Vergleich zu Progesteron alleine. Jedoch konnte eine signifikante Erhöhung der STAT5-Transkription nach Behandlung der Zellen mit Forskolin plus MPA verzeichnet werden.



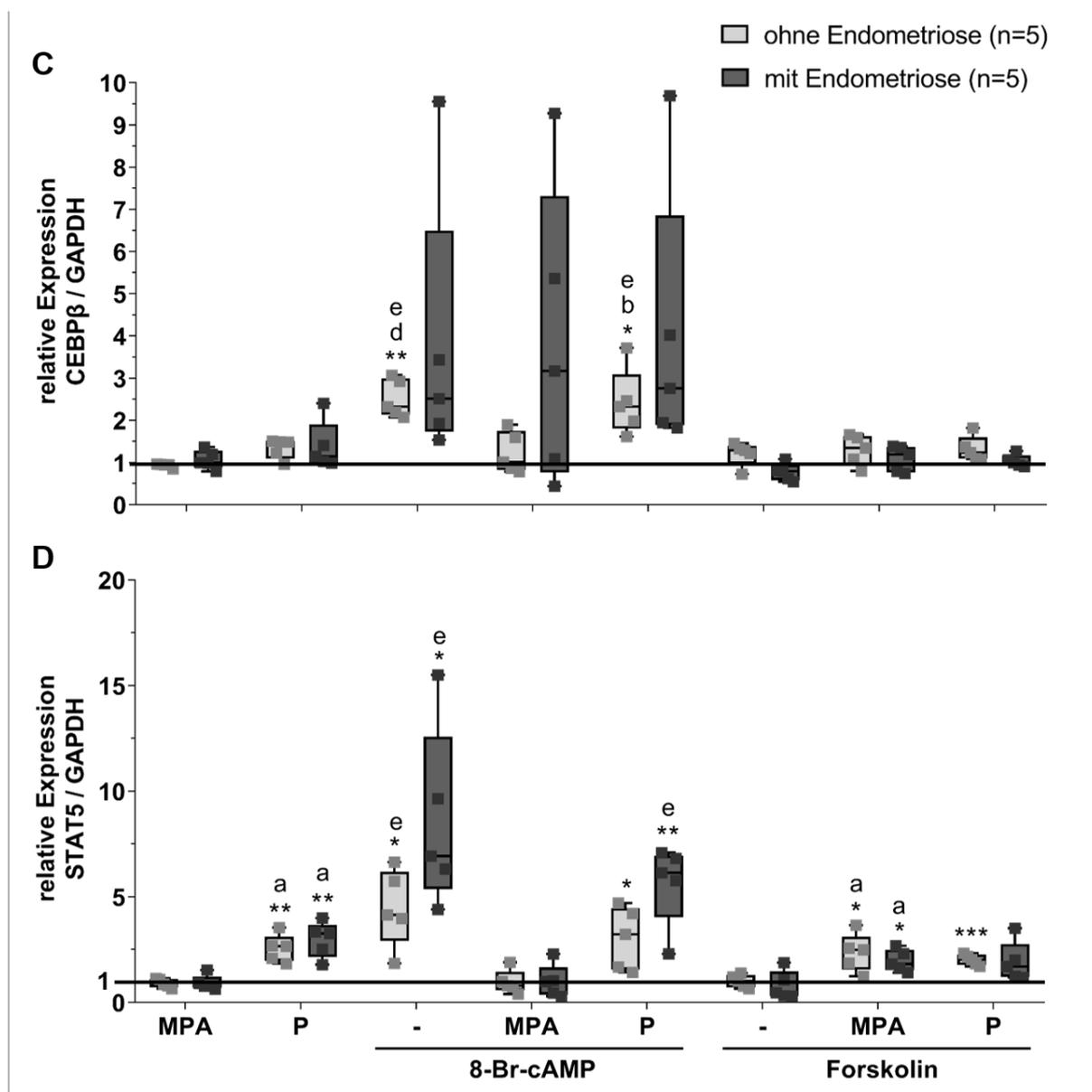


Abbildung 18: Transkription Dezidualisierung-spezifischer Transkriptionsfaktoren in hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose nach Behandlung mit Progesteron und MPA sowie 8-Br-cAMP und Forskolin alleine oder in Kombination

Konfluente *Monolayer* von hESCs wurden mit 8-Br-cAMP (0,25 mM) oder Forskolin (10 μ M) sowie mit den Progestinen MPA (1 μ M) oder Progesteron (100 nM, P) 6 Tage behandelt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und eine *Realtime*-PCR durchgeführt. Die relative Expression jeder Probe wurde auf die jeweilige Kontrolle (Linie = 1) normiert. Die Werte zeigen den Median sowie die Einzelwerte für fünf Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. **(A)** Es zeigte sich eine signifikant höhere FOXO1-Transkription nach Behandlungen mit MPA sowie mit 8-Br-cAMP und Forskolin, welche in der Kombination mit MPA noch gesteigert wurde. Tendenziell reagierten die hESCs von Frauen mit Endometriose mit einer geringeren Erhöhung der FOXO1-Transkription. **(B)** Die Transkription von HAND2 wurde durch die alleinige Behandlung mit MPA, Progesteron, 8-Br-cAMP und Forskolin gesteigert. In Kombination von 8-Br-cAMP/Forskolin mit MPA wiesen die Patientinnen ohne Endometriose eine deutliche zusätzliche Erhöhung der HAND2-Transkription auf. **(C)** Die CEBP β -Transkription wurde in allen Behandlungen mit 8-Br-cAMP erhöht, wobei diese in Patientinnen mit Endometriose tendenziell höher war. Dies war jedoch mit einer höheren Streuung der Einzelwerte verbunden. Der Einfluss von Forskolin war in allen Ansätzen deutlich geringer als mit 8-Br-cAMP. **(D)** Die STAT5-Transkription zeigte signifikant erhöhte Werte in den alleinigen Behandlungen von Progesteron und 8-Br-cAMP. Die Induktion durch 8-Br-cAMP wurde in der Kombination mit MPA gehemmt, nicht aber mit Progesteron. Forskolin plus Progesteron behandelte Zellen zeigten einen Anstieg der STAT5-Transkription jedoch ohne Unterschied zu Progesteron alleine. In der Kombination von Forskolin plus MPA stieg die Transkription von STAT5 signifikant an. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ zur unbehandelten Kontrolle / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,05$ a) zu MPA; b) zu P; c) zu cAMP; d) zu Forskolin, e) zu cAMP+MPA; f) zu cAMP+P, g) zu Forskolin+P

Somit konnte durch diese Analyse gezeigt werden, dass die Transkription einiger Dezidualisierungs-assoziiierter Transkriptionsfaktoren schon induziert wird, bevor der Prolaktinwert im Mediumüberstand als Marker für die funktionelle Dezidualisierung ansteigt. Am deutlichsten zeigte sich dies für den Transkriptionsfaktor FOXO1 (Abbildung 18 A). Da FOXO1 allgemein als Marker für ein frühes Stadium der Dezidualisierung angesehen wird (Kim et al. 2005), wurde dessen Expression auch auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde aus den hESCs Protein isoliert und Western blots mit anschließender densitometrischer Auswertung durchgeführt. Exemplarisch wird der Western blot einer Patientin ohne Endometriose gezeigt (Abbildung 19 A). Das FOXO1-Signal jeder Probe wurde auf das zugehörige GAPDH-Signal bezogen und auf die jeweilige Kontrolle (Linie = 1) normiert. Die Ergebnisse wurden in Boxplots mit Median und den zugehörigen Einzelwerten aufgetragen. Die Auswertungen zeigten, dass die Menge des FOXO1 Proteins in den hESCs in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse (Abbildung 18) sowohl nach Behandlung mit MPA als auch nach allen Behandlungen mit 8-Br-cAMP und Forskolin im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle anstieg (Abbildung 19 B). Im Gegensatz zum Transkript konnte die Induktion des FOXO1 Proteins durch 8-Br-cAMP und Forskolin jedoch nicht durch die gleichzeitige Gabe von MPA gesteigert werden. Auffällig war, dass die FOXO1 Proteinwerte einer der Endometriosepatientinnen innerhalb des Endometriosekollektivs deutlich höher lagen, was zu einer hohen Streuung in diesen Ansätzen führte.

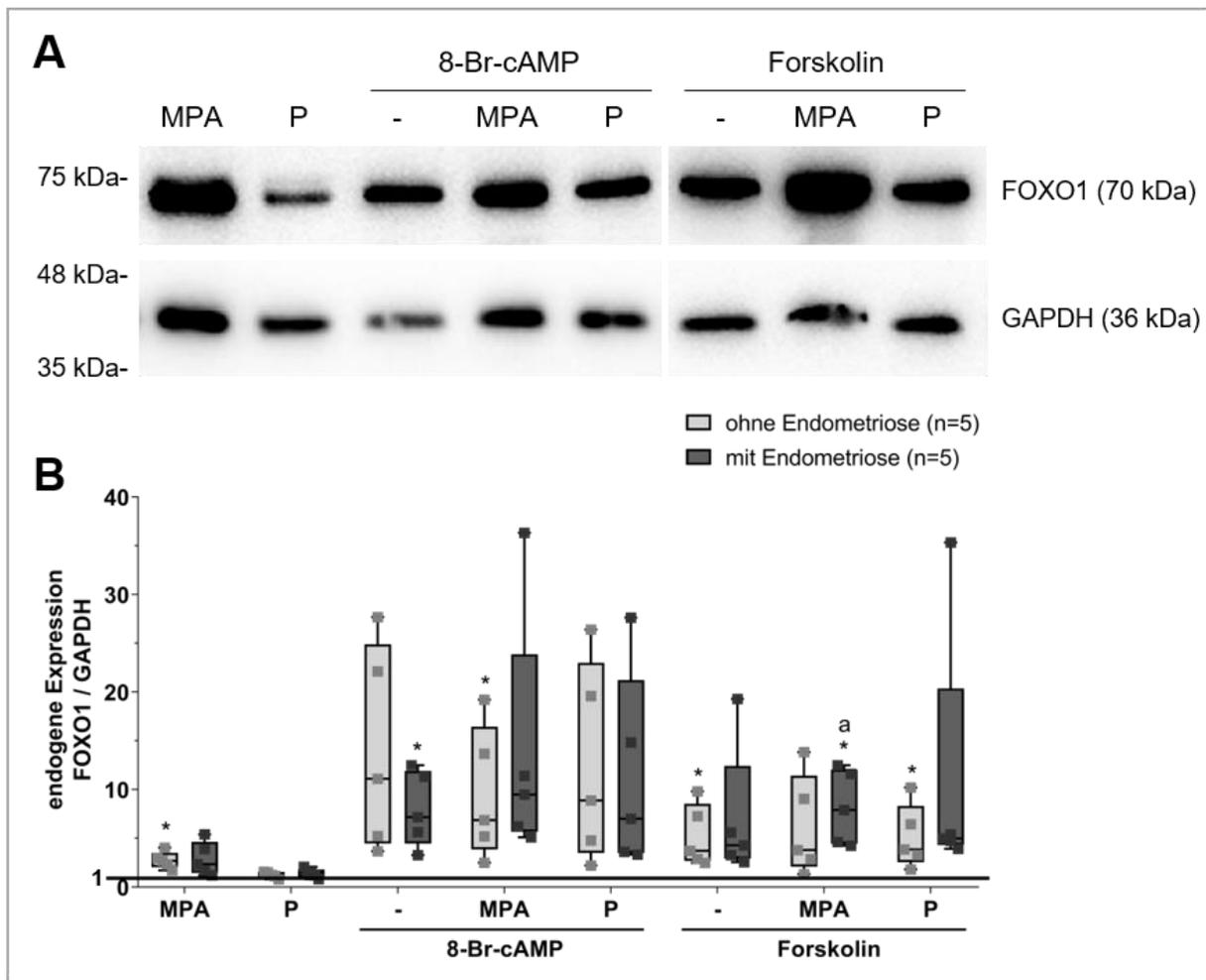


Abbildung 19: Western blot-Analyse der Proteinexpression des Transkriptionsfaktors FOXO1 nach Behandlung von hESCs mit 8-Br-cAMP und Forskolin alleine und in Kombination mit MPA oder Progesteron

Konfluente *Monolayer* aus hESCs von Patientinnen ohne (hellgrau; n=5) und mit (dunkelgrau; n=5) Endometriose wurden mit 8-Br-cAMP (0,25 mM) oder Forskolin (10 μ M) sowie mit den Progestinen MPA (1 μ M) oder Progesteron (100 nM, P) behandelt. **(A)** An Tag 6 wurden die Proteine im Western blot auf das FOXO1 Protein analysiert und densitometrisch ausgewertet. **(B)** Das FOXO1-Signal jeder Probe wurde mit dem jeweiligen GAPDH-Signal verrechnet und auf die zugehörigen Kontrollen normiert (Linie = 1). Die Werte zeigen den Median in einem Boxplot sowie die Einzelwerte der Patientinnen. Die Menge an FOXO1 Protein stieg nach allen Behandlungen der hESCs mit 8-Br-cAMP und Forskolin signifikant an. Im Vergleich zu der FOXO1-Transkription konnte jedoch keine zusätzliche Steigerung durch die kombinierte Behandlung mit MPA erzielt werden. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$ zur unbehandelten Kontrolle / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; * $p < 0,05$ zur unbehandelten Kontrolle/ zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,05$ a) zu MPA

Die bisherigen Analysen zeigten somit, dass die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen von Patientinnen mit wie auch ohne Endometriose sowohl durch 8-Br-cAMP als auch durch Forskolin erfolgreich induziert werden kann. Auffällig war jedoch, dass die Induktion der funktionellen Dezidualisierung durch Forskolin deutlich schwächer als die mit 8-Br-cAMP ausfiel. Da es sich bei Forskolin um ein bereits angewendetes Medikament handelt (Kavitha et al. 2010; Sapio et al. 2017), sollte in den folgenden Versuchen herausgefunden werden, wie sich die Forskolin-induzierte Dezidualisierung erhöhen lässt. Dementsprechend wurden in den folgenden

Experimenten dieser Arbeit weitere mögliche Induktoren der Dezidualisierung von hESCs analysiert, um diese zusammen mit Forskolin einsetzen zu können.

3.4. Einfluss von Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors und von PDE-Inhibitoren auf die Dezidualisierung von hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose

3.4.1. Analyse des Effektes von hCG und Relaxin auf die funktionelle Dezidualisierung

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3 führten zu der Frage, ob auch andere Induktoren die funktionelle Dezidualisierung der hESCs auslösen können und ob sich der Effekt von Forskolin durch diese steigern lassen könnte. Dementsprechend wurden in den folgenden Experimenten weitere Substanzen zur Induktion der Differenzierungsreaktion getestet. Es wurde beschrieben, dass sich die Dezidualisierung von hESCs *in vitro* auch über das humane Choriongonadotropin (hCG) und Relaxin, als Liganden eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, auslösen lässt (Telgmann und Gellersen 1998; Gellersen und Brosens 2003; Bartsch und Ivell 2004). Die Bindung von hCG oder Relaxin an ihren G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt intrazellulär zur Aktivierung des G-Proteins, welches wiederum die Adenylatcyclase aktiviert und somit zum Anstieg des intrazellulären cAMPs beiträgt (Gellersen und Brosens 2003; Tang und Gurdip 1993). Andererseits kann der Erhalt des intrazellulären cAMP-Spiegels über die Hemmung des Abbaus von cAMP durch Phosphodiesterasen (PDEs) bewirkt werden (Bartsch et al. 2004; Gellersen und Brosens 2014). Hierzu wurden in den folgenden Versuchen die Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitoren Milrinone und Rolipram eingesetzt. Milrinone gilt dabei als spezifischer PDE3-Inhibitor, während Rolipram PDE4s spezifisch inhibiert (Azevedo et al. 2014; Banner und Press 2009),

Es wurden zunächst die Effekte der Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (hCG, Relaxin) sowie der PDE-Inhibitoren (Milrinone, Rolipram) alleine und in Kombination mit dem Progestin MPA hinsichtlich einer funktionelle Dezidualisierung der hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose analysiert und mit der Wirkung des 8-Br-cAMP verglichen. Hierfür wurden die hESCs mit hCG (50 I.E.),

Relaxin (100 ng/ml), Milrinone (50 μ M) oder Rolipram (50 μ M) alleine und in Kombination mit MPA (1 μ M) behandelt. An Tag 6 wurde der Überstand entnommen und hinsichtlich seines Prolaktinergehalts überprüft, um Rückschlüsse auf eine mögliche funktionelle Dezidualisierung der hESCs zu ziehen (Abbildung 20). Hierbei diente die zuvor ausgetestete Behandlung der Zellen mit 8-Br-cAMP (0,25 mM) als Positivkontrolle. Unter Behandlung mit 8-Br-cAMP sezernieren die hESCs deutliche Mengen an Prolaktin in den Zellüberstand. Es konnten jedoch unter keiner der Behandlung mit den anderen Substanzen (hCG/Relaxin/Milrinone/Rolipram \pm MPA) mittels ELISA Prolaktinmengen im Zellüberstand nachgewiesen werden.

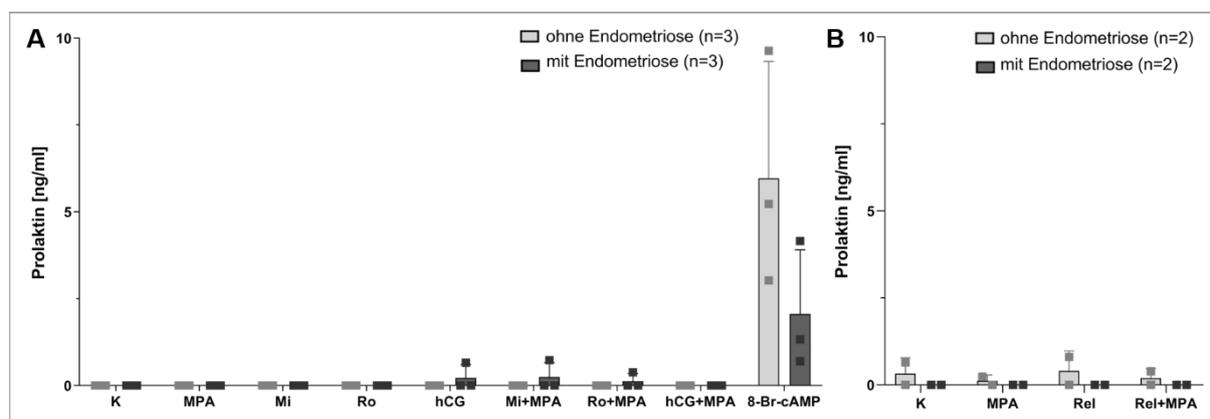


Abbildung 20: Analyse der Prolaktinsekretion von hESCs nach Behandlung mit Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors und PDE-Inhibitoren \pm MPA

Die konfluent gewachsenen hESCs wurden mit humanem Choriogonadotropin (hCG, 50 I.E.) (A) und Relaxin (Rel, 100 ng/ml) (B) als Liganden des G-Protein-gekoppeltem Rezeptor sowie mit den Phosphodiesterase- (PDE)-Inhibitoren Milrinone (Mi, 50 μ M) und Rolipram (Ro, 50 μ M) (A) alleine und in Kombination mit MPA (1 μ M) behandelt. An Tag 6 wurden die Zellüberstände mittels ELISAs auf ihren Prolaktin-Gehalt überprüft. Die Daten zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung des Prolaktinergehalts in ng/ml sowie die Einzelwerte von je drei (A) bzw. zwei (B) Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. Keine der getesteten Substanzen führte zu einer deutlichen Steigerung der Prolaktinkonzentration im Zellüberstand unter Behandlung mit den Liganden des G-Protein-gekoppeltem Rezeptors oder den PDE-Inhibitoren \pm MPA im Vergleich zu den cAMP behandelten Zellen, die als Positivkontrolle mitgeführt wurden. K \triangleq unbehandelte Kontrolle.

Zur Untersuchung möglicher synergistischer Effekte der verschiedenen Substanzen wurden in weiterführenden Experimenten die Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (hCG, Relaxin) zusammen mit den PDE-Inhibitoren (Milrinone, Rolipram) eingesetzt. Darüber hinaus wurde der Behandlungsansatz um die zusätzliche Gabe von Forskolin (10 μ M) erweitert, um zu analysieren, ob sich die in Kapitel 3.3 gezeigte Forskolin-induzierte Dezidualisierung durch die hier zusätzlich applizierten Substanzen erhöhen ließ.

Humane ESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose wurden hierzu 6 Tage mit den genannten Substanzen behandelt und anschließend wurde der Zellüberstand mittels ELISA hinsichtlich seiner Prolaktinkonzentration überprüft (Abbildung 21). Zur Kontrolle wurden die Behandlungen der hESCs mit den einzelnen Substanzen hier auch mitgeführt. Im Vergleich zu Abbildung 20 zeigten sich hier geringfügig höhere Prolaktinkonzentrationen in den Zellüberständen nach alleiniger Behandlung mit hCG, Relaxin, Milrinone und Rolipram. Die kombinierte Behandlung der hESCs mit den PDE-Inhibitoren Milrinone oder Rolipram und Forskolin führte zu einer Steigerung der Prolaktinsekretion. Dieser Anstieg konnte jedoch durch den Zusatz von hCG oder Relaxin nicht weiter erhöht werden.

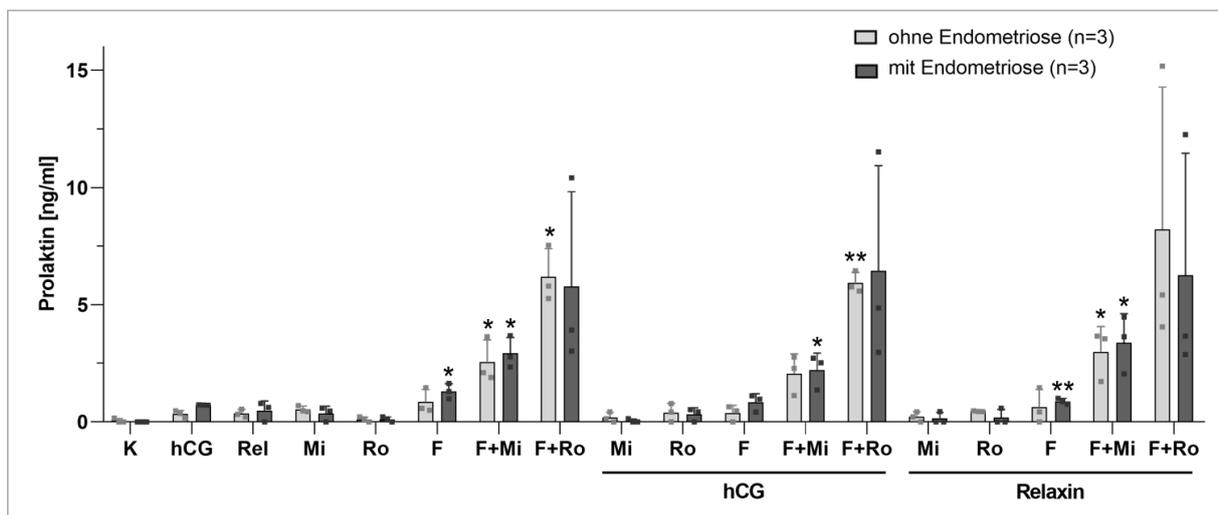


Abbildung 21: Effekt von PDE-Inhibitoren und Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf die Forskolin-induzierte Dezidualisierung der hESCs

Konfluente *Monolayer* von hESCs wurden mit Forskolin (F; 10 μ M), mit Liganden des G-Protein gekoppelten Rezeptors hCG (50 I.E.) und Relaxin (Rel; 100 ng/ml) sowie mit den Phosphodiesterase- (PDE)-Inhibitoren Milrinone (Mi, 50 μ M) und Rolipram (Ro, 50 μ M) alleine und in Kombination behandelt. Die Prolaktinkonzentration im Zellüberstand wurde an Tag 6 mittels ELISA ermittelt. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung des Prolaktinergehalts in ng/ml sowie die Einzelwerte von je drei Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. Die alleinigen Behandlungen mit den Substanzen führten zu einer geringen Erhöhung der Prolaktinkonzentrationen im Zellüberstand. Eine Kombination von Forskolin und den PDE-Inhibitoren (Milrinone oder Rolipram) induziert hingegen einen signifikanten Anstieg der Prolaktinsekretion. Die Kombination dieser Substanzen mit hCG oder Relaxin hatte keinen zusätzlichen steigernden Effekt auf die Prolaktinsekretion. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ zur unbehandelten Kontrolle (K) / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle.

3.4.2. Untersuchung Dezidualisierung-spezifischer Transkriptionsfaktoren

Auch für diese Induktion der funktionellen Dezidualisierung wurden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen anhand der Expression der Transkriptionsfaktoren FOXO1, HAND2, CEBP β und STAT5 näher analysiert. Es wurden *Realtime*-PCRs durchgeführt, wobei die entsprechenden Behandlungsansätze auf ihre jeweilige Kontrolle normiert (Linie = 1) wurden. Es zeigte sich, dass die FOXO1-Transkription bei den Kombinationen von Forskolin plus PDE-Inhibitoren anstieg (Abbildung 22 A). Hierbei konnte ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen der relativen Expression von FOXO1 und der Prolaktinsekretion festgestellt werden (siehe Abbildung 21). Die zusätzliche Behandlung mit hCG oder Relaxin führte jedoch zu keiner weiteren Erhöhung der FOXO1-Transkription, trotz steigender Prolaktinsekretion. Der Transkriptionsfaktor HAND2 zeigte in den Behandlungen mit Forskolin gesteigerte Werte im Vergleich zu denen ohne Forskolin, wobei die Kombinationen mit den PDE-Inhibitoren keinen weiteren Einfluss hatten (Abbildung 22 B). Ebenso wie auch schon für die Transkription von FOXO1 zu beobachten, führte die zusätzliche Behandlung mit hCG oder Relaxin zu keinem Anstieg der HAND2-Transkription. Die Transkriptionsfaktoren CEBP β (Abbildung 22 C) und STAT5 (Abbildung 22 D) reagierten ebenfalls bei den Behandlungen mit Forskolin plus PDE-Inhibitoren mit einer tendenziell erhöhten Transkription und auch hier hatten hCG oder Relaxin keine weiteren Auswirkungen auf die Transkriptionsmenge. Insgesamt zeigten sich weniger deutliche Effekte auf die Transkription von HAND2, CEBP β und STAT5 im Vergleich zu FOXO1. Eine Aussage bezüglich Unterschiede von hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose kann nicht eindeutig getroffen werden, da zum Teil starke inter-individuelle Streuungen vorlagen.

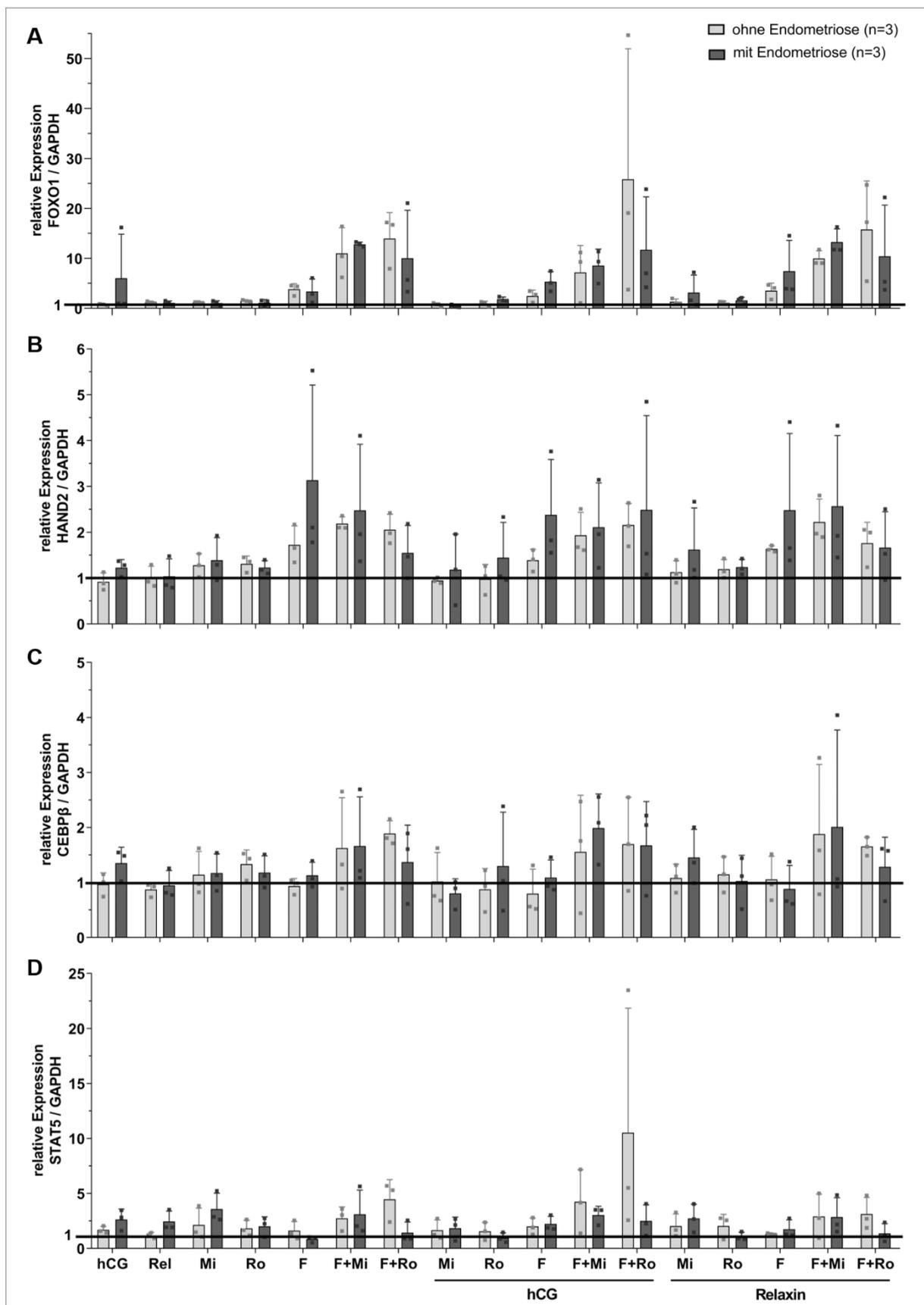


Abbildung 22: Expression Dezidualisierungs-assoziiertes Transkriptionsfaktoren in hESCs nach Behandlung mit Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors und PDE-Inhibitoren in Kombination mit Forskolin

Konfluente hESCs wurden mit humanem Choriogonadotropin (hCG; 50 I.E.) und Relaxin (Rel; 100 ng/ml) sowie mit den Phosphodiesterase- (PDE)-Inhibitoren Milrinone (Mi; 50 μ M) und Rolipram (Ro; 50 μ M) alleine und in Kombination mit Forskolin (F; 10 μ M) über 6 Tage behandelt. Es wurde eine *Realtime*-PCR durchgeführt und die relative Expression in den Behandlungsansätzen auf ihre jeweilige Kontrolle normiert (Linie = 1). Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit der Standardabweichung sowie die Einzelwerte von je drei Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. Die FOXO1- (A) und HAND2- (B) Transkription wurde in allen Kombinationen mit Forskolin erhöht. Die kombinierte Behandlung mit PDE-Inhibitoren führte zu einem weiteren Anstieg der Transkription von FOXO1, nicht aber der von HAND2. Weder durch hCG noch durch Relaxin konnte für beide Gene eine zusätzliche Erhöhung der Transkription verzeichnet werden. Sowohl CEBP β (C) als auch STAT5 (D) zeigten tendenzielle Transkriptionserhöhungen mit Forskolin plus PDE-Inhibitoren, wobei hCG oder Relaxin auch hier keinen weiteren Einfluss hatten.

Insgesamt zeigte sich, dass durch die Inkubation der hESCs mit dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin die Prolaktinsekretion gesteigert werden konnte, welche aber weder durch hCG noch durch Relaxin weiter erhöht wurde. Somit führte das zusätzliche Ansteuern der Adenylatcyclase über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu keinem weiteren Einfluss auf die Prolaktinsekretion von hESCs. Auf transkriptioneller Ebene zeigten die Dezidualisierungs-assoziierten Transkriptionsfaktoren ein den Ergebnissen für die Prolaktinmessungen ähnliches Bild. In Behandlungsansätzen, in denen eine gesteigerte Prolaktinsekretion gemessen werden konnte, wurden auch eine gesteigerte Transkription von FOXO1, HAND2 und CEBP β beobachtet, die für FOXO1 am deutlichsten war. Die Forskolinwirkung konnte zudem deutlich durch die Verwendung von PDE-Inhibitoren gesteigert werden.

3.5. Effekt von PDE-Inhibitoren auf die Forskolin-induzierte Dezidualisierung

3.5.1. Funktionelle Dezidualisierung durch die Kombination von Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA

Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wird durch Adenylatcyclasen (Synthese) und Phosphodiesterasen (Abbau) reguliert (Gellersen und Brosens 2014). PDE-Inhibitoren hemmen die Phosphodiesterasen in der Zelle, sodass der Abbau von cAMP verhindert und somit das intrazelluläre cAMP-Level stabilisiert wird. Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, kann Forskolin in Kombination mit MPA die Prolaktinsekretion erhöhen, jedoch in geringerem Maße als die Kombination von 8-Br-cAMP mit MPA. Darüber hinaus ließ sich die Wirkung von Forskolin durch Einsatz von PDE-Inhibitoren (Milrinone, Rolipram) verstärken, jedoch nicht unter Verwendung von Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (hCG, Relaxin). Zur Untersuchung weiterer synergistischer

Effekte von Forskolin und PDE-Inhibitoren wurde in einem größeren Versuchsansatz die Wirkung einer zusätzlichen Behandlung mit dem Progestin MPA analysiert.

Hierzu wurden die hESCs 6 Tage mit Forskolin (10 μM), Milrinone (50 μM), Rolipram (50 μM) und MPA (1 μM) alleine und in Kombination behandelt. Der Zellüberstand wurde im ELISA hinsichtlich der Prolaktinkonzentration untersucht und die Ergebnisse im Boxplot mit Median und den Einzelwerten jeder Patientin graphisch dargestellt (Abbildung 23). Die alleinigen Behandlungen sowohl mit Forskolin als auch mit Milrinone und Rolipram führten zu einer leicht, aber dennoch signifikanten Steigerungen der Prolaktinsekretion. Wie zuvor bereits gezeigt, wurde die Forskolin-induzierte Prolaktinsekretion durch die Kombination mit MPA zusätzlich erhöht, während der Effekt der PDE-Inhibitoren auf die Prolaktinsekretion durch die MPA-Gabe gehemmt wurde. Die bereits zuvor gezeigte signifikante Verstärkung der Forskolin-induzierten Dezidualisierung durch PDE-Inhibitoren wurde durch MPA noch weiter erhöht. In diesen Ansätzen war dieser Anstieg für den PDE-Inhibitor Rolipram höher als für Milrinone. Interessanterweise reagierten die hESCs der Endometriosepatientinnen bei den Kombinationsbehandlungen mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA in allen Versuchsgruppen tendenziell stärkeren Prolaktinsekretion im Vergleich zu den hESCs von Patientinnen ohne Endometriose.

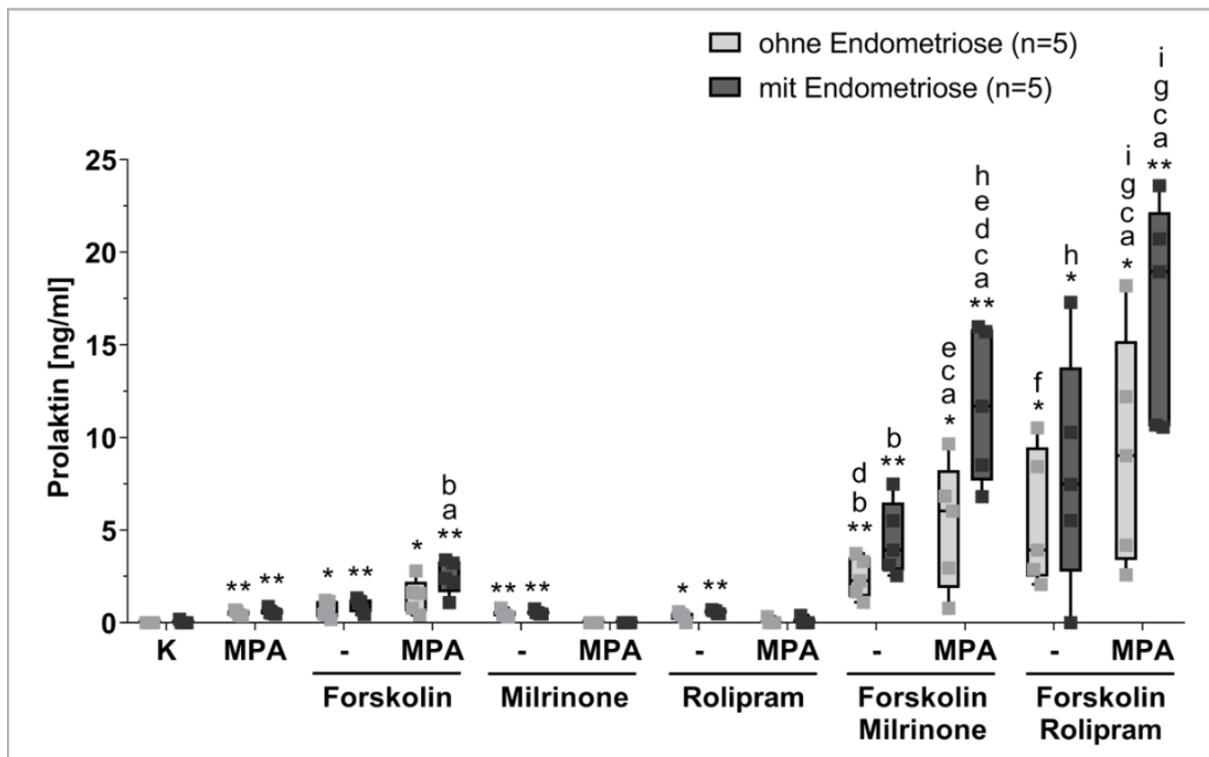


Abbildung 23: Synergistischer Effekt von PDE-Inhibitoren und MPA auf die Forskolin-induzierte Dezidualisierung von hESCs

Konfluente *Monolayer* von hESCs wurden mit Forskolin (10 μ M) und den Phosphodiesterase- (PDE)-Inhibitoren Milrinone (50 μ M) oder Rolipram (50 μ M) sowie MPA (1 μ M) alleine (-) und in Kombination behandelt. Anschließend wurde die Konzentration von Prolaktin im Zellüberstand mittels ELISAs an Tag 6 ermittelt. Angezeigt wird der Median des Prolaktinergehalts in ng/ml in einem Boxplot sowie die Einzelwerte für fünf Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. Es zeigten sich geringe, aber dennoch signifikant erhöhte Prolaktinwerte im Zellüberstand der hESCs nach alleiniger Forskolin-, Milrinone- oder Rolipram-Behandlung. Durch die Zugabe von MPA wurden diese in Forskolin-behandelten hESCs weiter erhöht, während MPA in Kombination mit den PDE-Inhibitoren eine hemmende Wirkung auf die Prolaktinsekretion hatte. Die Forskolin-induzierte Dezidualisierung in hESCs wurde in der Kombination mit den PDE-Inhibitoren signifikant erhöht und durch die zusätzliche Behandlung mit MPA weiter gesteigert. Dieser Anstieg war für die Kombinationen mit Rolipram stärker als für die mit Milrinone. Die hESCs von Patientinnen mit Endometriose wiesen tendenziell höhere Prolaktinkonzentrationen im Zellüberstand auf als das Kollektiv ohne Endometriose. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ zur unbehandelten Kontrolle (K) / zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; p < 0,05 a) zu MPA; b) zu Forskolin; c) zu Forskolin+MPA; d) zu Milrinone; e) zu Milrinone+MPA; f) zu Rolipram; g) Rolipram+MPA; h) zu Forskolin+Milrinone; i) zu Forskolin+Rolipram

3.5.2. Analyse Dezidualisierungs-spezifischer Marker nach kombinierter Behandlung mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA

In den Kapiteln zuvor wurde bereits herausgestellt, dass die Transkription der am Prozess der Dezidualisierung beteiligten Transkriptionsfaktoren FOXO1, HAND2, CEBP β und STAT5 unter der Dezidualisierungsinduktion erhöht werden. Daher wurde im Folgenden der Einfluss der oben beschriebenen Kombinationsbehandlungen auf das Transkriptlevel dieser Faktoren in den hESCs untersucht. Darüber hinaus wurde der Transkriptionsfaktor CREB1 (CAMP response element (CRE)-binding protein)

sowie die Kinase AKT1 (Serin/Threonin Kinase 1) zusätzlich in die Untersuchungen einbezogen. Bei CREB1 handelt es sich um einen Faktor, der ebenfalls über den cAMP-Signalweg aktiviert wird und zusammen mit CEBP β in Promotorregionen von Zielgenen wirken kann (Gellersen und Brosens 2014). AKT1 hingegen kann hemmenden Einfluss auf FOXO1 und seine Translokation aus dem Zellkern haben (Gellersen und Brosens 2003).

In Abbildung 24 sind die relativen mRNA-Expressionen der genannten Faktoren nach durchgeführten *Realtime*-PCRs dargestellt. Die entsprechenden Behandlungsansätze wurden auf ihre jeweilige Kontrolle normiert (Linie = 1) und im Boxplot mit Median und den Einzelwerten für die hESCs der Patientinnen angegeben. Die zuvor bereits gezeigte signifikante Steigerung der FOXO1-Transkription nach alleiniger Forskolin-Behandlung sowie in Kombination mit MPA (vgl. Abbildung 18) konnte auch hier in der größeren Kohorte bestätigt werden (Abbildung 24 A). Dieser Anstieg korrespondierte auch hier zu dem in diesem Versuch induzierten Prolaktinlevel (vgl. Abbildung 23). Die alleinigen Behandlungsansätze mit Milrinone oder Rolipram führten auch in dieser Versuchsreihe nicht zu einem Anstieg der FOXO1-Transkription, wohingegen die Kombination dieser beiden PDE-Inhibitoren mit Forskolin eine signifikante Erhöhung von FOXO1 mRNA in den hESCs induzierte, welche nochmals deutlich durch die Zugabe von MPA gesteigert wurde (Abbildung 24 A). Hierbei wiesen die Ansätze mit Rolipram tendenziell höhere Werte im Vergleich zu denen mit Milrinone auf. Die hESCs der Patientinnen mit Endometriose reagieren hierbei tendenziell mit einer schwächeren FOXO1-Transkription als das Kontrollkollektiv.

Die Transkription von HAND2 wurde in allen Behandlungsansätze ohne MPA etwa gleich stark exprimiert mit Ausnahme der alleinigen Milrinone-Behandlung (Abbildung 24 B). Milrinone alleine führte nicht zum Anstieg der HAND2-Expression, obwohl hierbei ein signifikanter Anstieg der Prolaktinsekretion zu verzeichnen war (Abbildung 23). Tendenzuell wiesen alle Behandlungsansätze mit MPA signifikant höhere Werte für die HAND2-Transkription auf, wobei kein zusätzlicher Effekt in den Kombinationen von Forskolin mit den PDE-Inhibitoren auftrat (Abbildung 24 B).

Der Transkriptionsfaktor CEBP β wurde tendenziell in den Kombinationen mit MPA, mit Ausnahme von Rolipram plus MPA, höher exprimiert (Abbildung 24 C). Die CEBP β -Transkription wurde durch die Behandlung mit Forskolin und den PDE-Inhibitoren gesteigert, was durch die zusätzliche Gabe von MPA noch weiter erhöht wurde. Somit zeigte sich in aller Substanzansätzen ein ähnliches Transkriptionsmuster wie für

FOXO1, was ebenfalls zur Prolaktinsekretion der hESCs für diese Substanzansätze korrespondierte.

Die Transkription von STAT5 wurde in den alleinigen Behandlungsansätzen mit MPA und Milrinone sowie mit Rolipram plus MPA behandelten hESCs gehemmt (Abbildung 24 D). Die Expressionswerte lagen hierbei unterhalb der Kontrollen (Linie = 1). Allerdings führte die Zugabe von MPA in den Milrinone-behandelten hESCs, ähnlich wie die alleinige Forskolin-Behandlung, zu einem schwachen Anstieg der STAT5-Transkription. Interessanterweise zeigte sich durch eine alleinige Rolipram-Behandlung eine gesteigerte Transkription von STAT5, welche sogar höher war als die durch die Kombination von Forskolin mit Rolipram induzierte Transkription. Jedoch konnte in den Ansätzen mit Forskolin und Rolipram durch den Zusatz von MPA eine gesteigerte Erhöhung der relativen STAT5-Transkription erreicht werden. Auch in der Kombination von Forskolin mit Milrinone wurde durch MPA ein Anstieg der STAT5-Transkription bewirkt. Somit wurde auch für den Transkriptionsfaktor STAT5 ein verstärkender Einfluss des MPAs auf die Induktion der Transkription nach Behandlung mit Forskolin und PDE-Inhibitoren erzielt.

In Bezug auf die Transkription von CREB1 zeigten sich insgesamt geringere Auswirkungen (Abbildung 24 E). Es konnte aber ein signifikanter Anstieg der CREB1-Transkription nach alleiniger Behandlung mit Forskolin in den hESCs von Patientinnen ohne Endometriose sowie nach Behandlung mit Forskolin und Rolipram \pm MPA in den hESCs von Patientinnen mit Endometriose verzeichnet werden. Die Inkubation der hESCs mit der Kombination von Forskolin, Rolipram und MPA führte in den Zellen der Patientinnen ohne Endometriose zu höheren Werten als die entsprechende Behandlung ohne MPA.

Die Transkription von AKT1 wurde durch die kombinierte Behandlung der hESCs mit Forskolin und PDE-Inhibitoren gehemmt (Abbildung 24 F). Die zusätzliche Behandlung mit MPA hob jedoch den hemmenden Effekt von Forskolin plus PDE-Inhibitor wieder auf, während eine alleinige MPA-Behandlung keinen Anstieg der AKT1-Transkription zeigte.

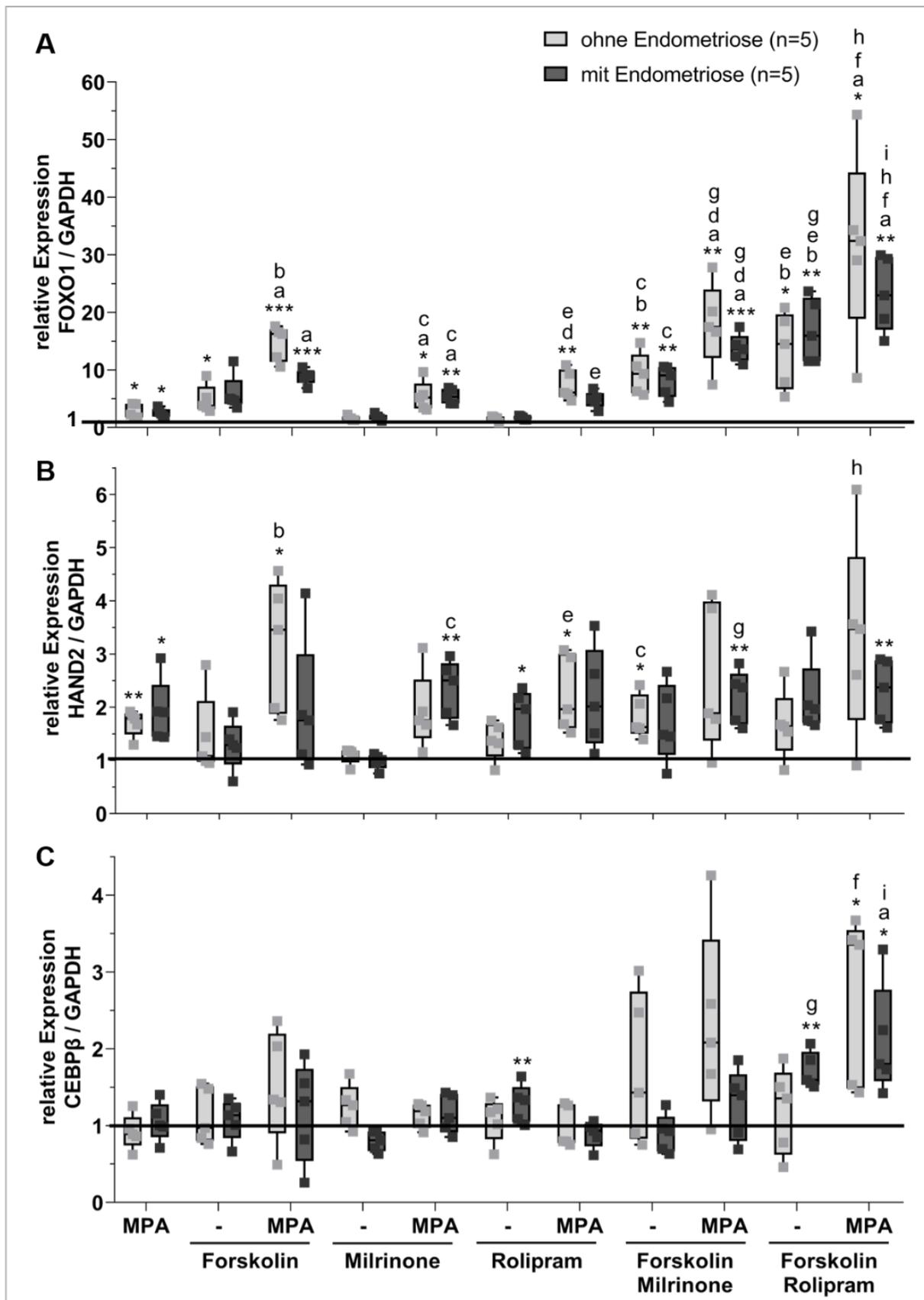


Abbildung auf nächster Seite fortgesetzt

(hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. **(A)** Die FOXO1-Transkription steigt signifikant in allen Behandlungsansätzen mit MPA an. Dabei ließ sich eine stärkere Transkriptionsinduktion von FOXO1 in der kombinierten Behandlung mit Forskolin und PDE-Inhibitoren verzeichnen, welche durch die zusätzliche Inkubation mit MPA weiter erhöht wurden. Diese waren für die hESCs von Patientinnen ohne Endometriose im Vergleich zu der Kohorte mit Endometriose höher. Rolipram zeigte hierbei eine stärkere Erhöhung der FOXO1-Transkription als Milrinone. **(B)** Die Transkription von HAND2 war in allen Ansätzen mit MPA erhöht, wobei sich jedoch keine zusätzliche Steigerung in den Kombinationen von Forskolin und PDE-Inhibitoren beobachten ließen. **(C)** CEBP β war in den Behandlungsansätzen mit Forskolin und PDE-Inhibitoren erhöht, was durch die zusätzliche Gabe von MPA gesteigert wurde. **(D)** Der Transkriptionsfaktor STAT5 wurde in den alleinigen Behandlungen mit MPA, Milrinone sowie Rolipram plus MPA gehemmt. Die Zugabe von MPA führte in Milrinone behandelten hESCs zu einem Anstieg der STAT5-Transkription. Eine Inkubation mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA führte zu einer gesteigerten Transkription von STAT5. **(E)** Die Transkription von CREB1 zeigte in fast allen Behandlungen ein ähnliches Level, konnte aber durch Forskolin, Rolipram und MPA in hESCs von Patientinnen ohne Endometriose gesteigert werden. **(F)** Auch die AKT1-Transkription wies in einigen Behandlungsansätzen niedrigere Level im Vergleich zu den Kontrollen auf. Durch die Inkubation mit MPA wurde in den Ansätzen mit Forskolin plus PDE-Inhibitoren ein Anstieg des AKT1-Transkriptlevels erwirkt. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: ** p<0,01 zur unbehandelten Kontrolle/ zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; *p<0,05 a) zu MPA b) Forskolin; c) Milrinone; d) Milrinone+MPA; e) Rolipram, f) Rolipram+MPA; g) Forskolin+Milrinone; h) Forskolin+Rolipram; i) Forskolin+Milrinone+MPA.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Forskolin-induzierte Dezidualisierung von hESCs sowohl von Patientinnen mit als auch ohne Endometriose durch die gleichzeitige Gabe von PDE-Inhibitoren gesteigert und durch MPA nochmals erhöht werden kann. Von den untersuchten Transkriptionsfaktoren zeigte FOXO1 hierbei die stärkste Korrelation zur gemessenen Prolaktinmenge und damit dem gemessenen Ausmaß der Dezidualisierungsreaktion. Dies wurde im Folgenden mittels Western blot-Analyse auf Proteinebene validiert (Abbildung 25 A). Die Western blots wurden densitometrisch ausgewertet und das FOXO1-Signal jeder Probe auf ihre jeweilige Kontrolle normiert (Linie = 1). Die Ergebnisse wurden als Boxplot mit Median und den Einzelwerten der Patientinnen mit und ohne Endometriose aufgetragen (Abbildung 25 B). Es ist zu erkennen, dass die Expression von FOXO1 nach alleiniger Behandlung mit MPA und Forskolin anstieg. Durch die Kombination von Forskolin und MPA wurde die Expression von FOXO1 in den hESCs von Patientinnen ohne Endometriose erhöht. Die Inkubation der hESCs mit Milrinone oder Rolipram in Kombination mit MPA führte ebenfalls zur Erhöhung der FOXO1-Expression. Damit zeigte sich auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene ein ähnlicher Effekt (vgl. Abbildung 24 A). Nach Inkubation von Forskolin mit den PDE-Inhibitoren war eine erhöhte FOXO1-Expression erkennbar, diese konnte jedoch nicht, wie bei der Transkription von FOXO1, durch die zusätzliche Gabe von MPA gesteigert werden. Im Falle der Kombination von Forskolin und Rolipram wurden sogar höhere Proteinwerte ermittelt als in der Kombination mit MPA. Es zeigt sich somit, dass das FOXO1-Proteinlevel durch MPA weniger beeinflusst wurde als die FOXO1-Transkription.

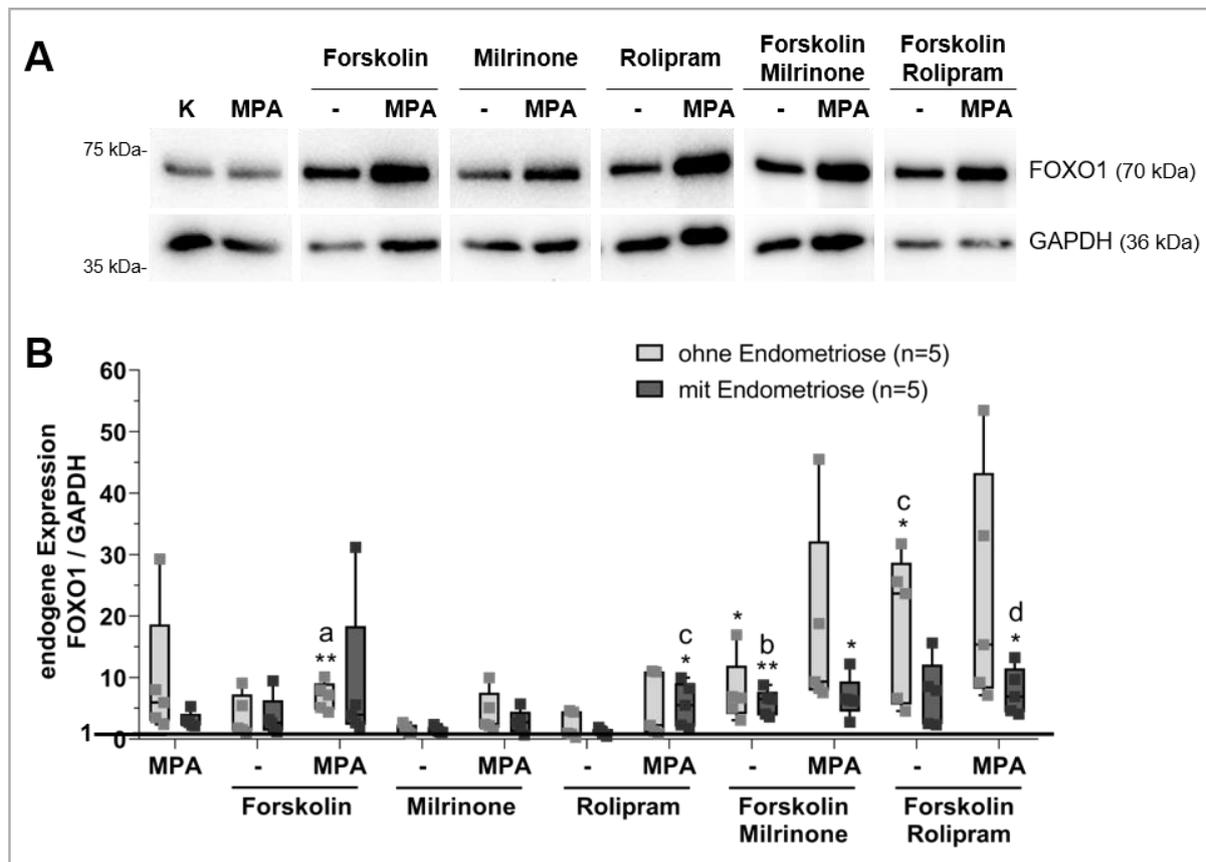


Abbildung 25: Western blot für das FOXO1 Protein nach kombinierter Behandlung der hESCs mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA

Die konfluenten hESCs wurden mit Forskolin (10 μ M), den Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitoren Milrinone (50 μ M) und Rolipram (50 μ M) sowie mit dem Progestin MPA (1 μ M) 6 Tage behandelt. Anschließend wurde eine Western blot-Analyse durchgeführt. **(A)** Repräsentativer Western blot einer Patientin ohne Endometriose gezeigt. **(B)** Der Western Blot wurde densitometrisch ausgewertet und das FOXO1-Signal jeder Probe wurde auf die zugehörige Kontrolle normiert (Linie = 1). Die Werte zeigen den Median in einem Boxplot sowie die Einzelwerte für fünf Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose. Es zeigte sich ein Anstieg des FOXO1 Proteins nach Behandlung der hESCs mit Forskolin, Milrinone oder Rolipram plus MPA. Die gleichzeitige Inkubation mit Forskolin und den PDE-Inhibitoren führte zu einem Anstieg der FOXO1 Proteinmenge, jedoch konnte keine zusätzliche Steigerung durch MPA bewirkt werden. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: ** $p < 0,01$ zur unbehandelten Kontrolle (K)/ zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,05$ a) zu Forskolin; b) zu Rolipram; c) zu Rolipram+MPA.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor FOXO1 mit einer Reihe anderer Faktoren wie z.B. AKT1 interagieren kann und ein Zielprotein von AKT1 darstellt (Gellersen und Brosens 2003). AKT1 agiert als Serin/Threonin-Kinase und phosphoryliert über den PI3K/AKT1-Signalweg u.a. FOXO1, das drei mutmaßliche Phosphorylierungsstellen (T24, S256, S319) für AKT1 aufweist, wobei diese Phosphorylierungen Bindestellen für das 14-3-3 Chaperonprotein generieren. Dies wiederum führt zu einer Translokation von FOXO1 aus dem Zellkern und somit zu dessen Inaktivierung (Brosens und Gellersen 2006; Joshi et al. 2020). Um zu überprüfen, ob FOXO1 unter der steigenden Dezidualisierungsinduktion in den Forskolin \pm Milrinone/Rolipram \pm MPA behandelten hESCs auch eine steigende

inaktivierende Phosphorylierung aufweist, wurden Western blots für die Phosphorylierung T24 durchgeführt. Parallel wurde die AKT1-Expression sowie die Phosphorylierung dieser Kinase in den unterschiedlich behandelten hESCs überprüft. Die densitometrische Auswertung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, wobei die Werte für das phosphorylierte FOXO1 auf das jeweilige GAPDH-Signal der Probe normiert wurde. In Abbildung 26 A ist für jedes der untersuchten Proteine ein repräsentativer Western blot einer Patientin ohne Endometriose dargestellt, Abbildung 26 B, C und D zeigen die Ergebnisse der quantitativen Auswertungen aller Patientinnen. Die Expression von phosphoryliertem FOXO1 (Abbildung 26 B) zeigte einen geringen Anstieg in den alleinigen Behandlungen mit Forskolin, Milrinone oder Rolipram. In den jeweiligen Kombinationen mit MPA konnte hingegen eine Erhöhung von phosphoryliertem FOXO1 gemessen werden. Im Vergleich mit der FOXO1-Expression in diesen Ansätzen (Abbildung 25 B) wurde gezeigt, dass mit steigender FOXO1-Expression auch mehr phosphoryliertes FOXO1 nachgewiesen werden kann. Dem gegenüber steht, dass das phosphorylierte FOXO1 in den gesamten Substanzkombinationen aus Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA nicht zusätzlich anstieg. Hier wurden ähnliche Werte ohne oder mit MPA ermittelt (Abbildung 26 B). Das konnte bereits für die FOXO1-Expression ermittelt werden (vgl. Abbildung 25 B) und spiegelt sich hier auch in der phosphorylierten Form des FOXO1 wider.

Für das AKT1 Protein zeigte sich für die hESCs der Patientinnen ohne Endometriose eine deutliche Erhöhung durch die Behandlung mit dem PDE-Inhibitor Rolipram, jedoch nicht mit Milrinone (Abbildung 26 C). Diese wurde durch die gleichzeitige Gabe von MPA leicht gesteigert. Im Vergleich zu der ermittelten AKT1-Transkription in diesen Behandlungsansätzen wurde hier ein gegensätzliches Bild deutlich. Forskolin alleine oder in Kombinationen mit den anderen Testsubstanzen hatte keinen Effekt auf die Expression des AKT1 Proteins, während durch die Zugabe von MPA die AKT1-Transkription gesteigert wurde (vgl. Abbildung 24 F). Auch für den phosphorylierten Nachweis von AKT1 konnten nur für einzelne Ansätze erhöhte Werte gemessen werden (Abbildung 26 D). Es ließen sich keine eindeutigen Korrelationen mit der Expression des nicht-phosphorylierten AKT1 Proteins erkennen. Ein Zusammenhang zwischen dem phosphorylierten FOXO1 Protein und dem phosphorylierten wie auch nicht-phosphorylierten AKT1 Protein war nicht zu erkennen.

das phosphorylierte P-FOXO1 T24-Signal jeder Probe nur auf das jeweilige GAPDH-Signal normiert wurde und als *Ratio* dargestellt ist, da P-FOXO1 T24 in den jeweiligen Kontrollansätzen nicht als Referenz zur Verfügung stand. Für das AKT1- sowie P-AKT1-Signal wurde jede Probe auf die zugehörige Kontrolle normiert (Linie = 1). **(A)** Repräsentativ sind die Western blots der Zellysate einer Patientin ohne Endometriose gezeigt. Die Werte für die untersuchten Proteine werden in einem Boxplot mit Median sowie den Einzelwerten für fünf Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose dargestellt. **(B)** Die Expression von P-FOXO1 zeigte für die alleinigen Behandlungen mit Forskolin, Milrinone oder Rolipram einen leichten Anstieg, welcher durch die zusätzliche Inkubation mit MPA erhöht wurde. In den Kombinationen von Forskolin mit allen Testsubstanzen konnten keine gesteigerte P-FOXO1-Expression durch die Kombination mit MPA ermittelt werden. **(C)** Für die Expression von AKT1 konnten erhöhte Werte nach Behandlung mit Rolipram für hESCs von Patientinnen ohne Endometriose verzeichnet werden, die durch MPA geringfügig erhöht wurden. Die Substanzkombinationen mit Forskolin wiesen hingegen keine nennenswerten Steigerungen der AKT1-Expression auf. **(D)** Es konnten keine Parallelen zwischen dem phosphorylierten P-AKT1-Signal und der Expression von AKT1 sowie der Phosphorylierung von FOXO1 ermittelt werden.

Es kann festgehalten werden, dass die funktionelle Dezidualisierung der hESCs mit einem Anstieg der FOXO1-Transkription einhergeht. Die durch Forskolin und PDE-Inhibitoren induzierte transkriptionelle Erhöhung wurde durch die gleichzeitige Gabe von MPA zusätzlich gesteigert. In allen Behandlungsansätzen konnte in einer etwa gleichen Menge phosphoryliertes FOXO1 nachgewiesen werden. Einen eindeutigen Zusammenhang des Levels an phosphoryliertem FOXO1 Protein mit der AKT1-Expression bzw. mit dem phosphorylierten Status von AKT1 war nicht zu erkennen. Es zeigte sich, dass FOXO1 unter der steigenden Dezidualisierungsinduktion mittels Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA zu dem gemessenen Zeitpunkt noch keine gesteigerte inaktivierende Phosphorylierung aufwies.

3.5.3. Analyse des Phosphodiesterasestatus in den hESCs nach Forskolin-induzierter Dezidualisierung

Im Folgenden wurden die Auswirkung der unterschiedlichen Behandlungen mit den PDE-Inhibitoren auf den transkriptionellen Status verschiedener Isoformen von PDE3 bzw. PDE4 in den hESCs überprüft. Die relative Expression von PDE3A stieg nur bei Kombination von Forskolin mit Rolipram und MPA in hESCs von Patientinnen ohne Endometriose signifikant an, nicht aber bei der Behandlung mit den jeweiligen Substanzen allein. Hierbei zeigte sich kein Einfluss von MPA (Abbildung 27 A). Die Kombination von Forskolin und Rolipram sowie der Zusatz mit MPA führten zu einer signifikanten Steigerung der Expression der Isoform PDE3B. Hierbei zeigte die Kombination mit MPA eine zusätzliche Erhöhung der PDE3B-Transkription für die Kohorte ohne Endometriose. Ebenfalls wurde eine signifikante Erhöhung durch die Kombination von Forskolin und Milrinone für die Patientinnen ohne Endometriose im Vergleich zu den Kontrollen gemessen (Abbildung 27 B).

Im Hinblick auf die unterschiedlichen untersuchten PDE4-Isoformen zeigte sich für PDE4A ein sehr heterogenes Bild, wobei die Kombinationsbehandlungen mit Forskolin und einem PDE-Inhibitor eher zu einer Reduktion der Transkription dieser PDE4-Isoform führten (Abbildung 27 C). Im Gegensatz hierzu konnte eine deutliche Erhöhung der Isoformen PDE4B (Abbildung 27 D) und PDE4D (Abbildung 27 E) nach Behandlung der hESCs mit Forskolin festgestellt werden, die sich nach Zugabe der PDE-Inhibitoren tendenziell steigerte. Dabei konnte ein erhöhender Einfluss von MPA in der Kombination mit Rolipram für hESCs von Patientinnen ohne Endometriose für beide Isoformen beobachtet werden. Zusätzlich konnte ein Anstieg der PDE4B-Transkription durch die Behandlung mit den PDE-Inhibitoren allein beobachtet werden, wobei hier ein hemmender Effekt bei gleichzeitiger Gabe von MPA zu erkennen war (Abbildung 27 D).

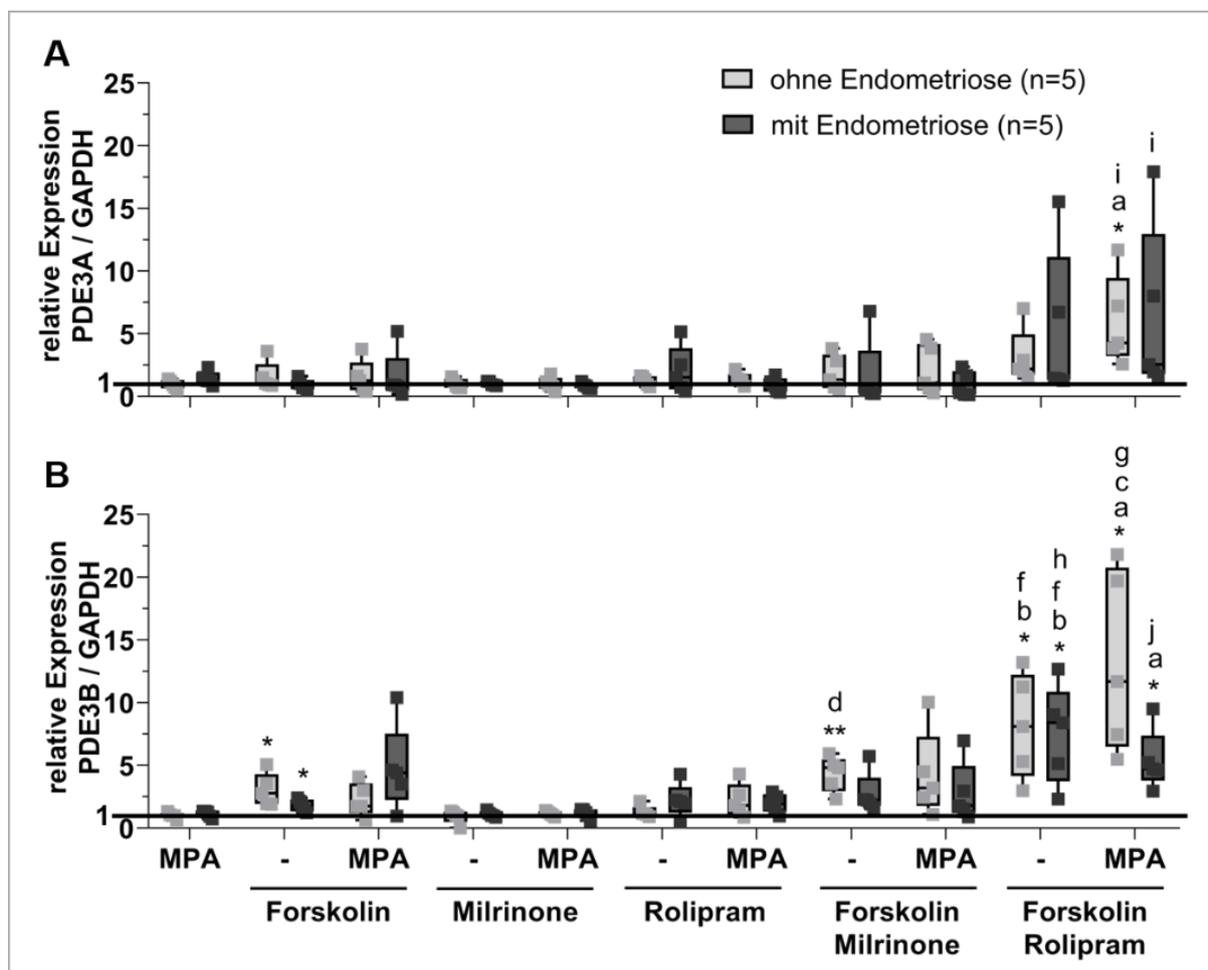


Abbildung auf nächster Seite fortgesetzt

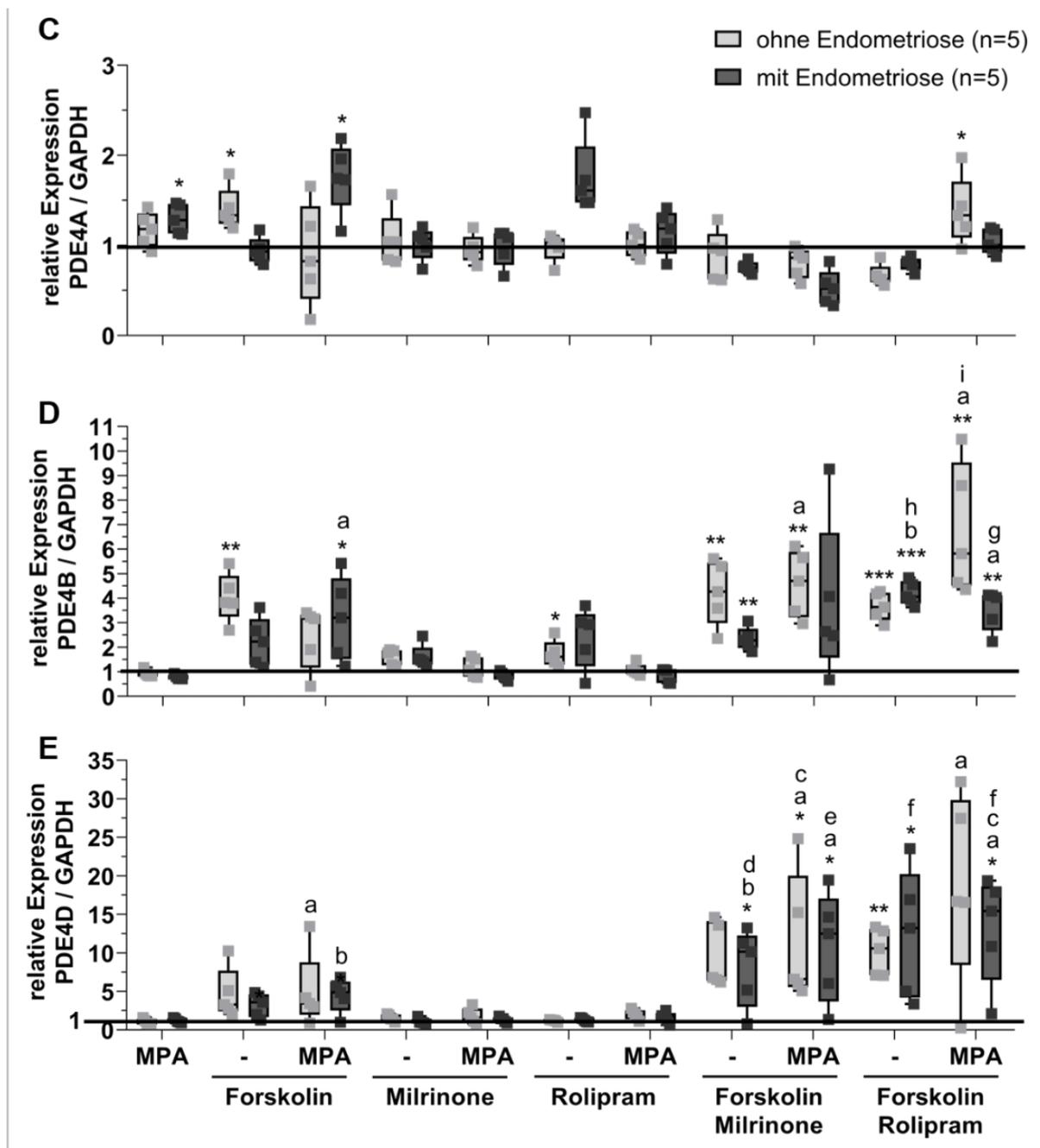


Abbildung 27: Effekt der Behandlung von hESCs mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA alleine oder in Kombination auf die Transkription unterschiedlicher Isoformen von PDE3 und PDE4

Die Transkription der Phosphodiesterasen (PDE) 3 und 4 und deren Isoformen in den behandelten hESCs wurde mittels *Realtime*-PCR überprüft (Forskolin 10 μ M, PDE3-Inhibitor Milrinone 50 μ M, PDE4-Inhibitor Rolipram 50 μ M, MPA 1 μ M). Die einzelnen Behandlungsansätze wurden auf ihre jeweilige Kontrolle normiert (Linie = 1) und im Boxplot mit Median für hESCs von Patientinnen ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Endometriose dargestellt. (A) Die Transkription von PDE3A stieg nur in der kombinierten Behandlung von Forskolin, Rolipram \pm MPA, jedoch nicht mit den jeweiligen Substanzen alleine. (B) Die PDE3B-Transkription zeigte signifikante Anstiege nach Behandlung der hESCs mit Forskolin und Rolipram sowie mit MPA für beide Patientinnenkollektive. MPA hatte hierbei einen erhöhenden Einfluss. (C) PDE4A zeigte ein heterogenes Bild der Transkription. Eine Kombinationsbehandlung mit Forskolin und einem PDE-Inhibitor führte hier eher zu einer Reduktion. Die Transkription von (D) PDE4B und (E) PDE4D wies deutliche Erhöhungen nach Behandlung der hESCs auf, die tendenziell durch die Zugabe der PDE-Inhibitoren und MPA gesteigert werden konnte. Hierbei ließ sich für beide Isoformen ein positiver Einfluss von MPA in Forskolin und Rolipram behandelten hESCs erkennen, während die Behandlungen mit PDE-Inhibitoren und MPA eher hemmenden Einfluss auf die PDE4B-Transkription zeigten. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ zur unbehandelten Kontrolle/ zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,05$ zu a) zu MPA; b) zu Forskolin; c) zu Forskolin+MPA; d) zu Milrinone; e) zu Milrinone+MPA; f) zu Rolipram; g) Rolipram+MPA; h) zu Forskolin+Milrinone; i) zu Forskolin+Rolipram; j) Forskolin+Milrinone+MPA.

Es zeigte sich somit parallel zu einer gesteigerten Induktion der Dezidualisierung ein Anstieg einiger PDE-Isoformen in den hESCs nach Behandlung mit Forskolin alleine und in stärkerem Maße noch nach der Kombinationsbehandlung von Forskolin jeweils mit den beiden PDE-Inhibitoren. Somit scheinen die Zellen gegen die dauerhafte Aufrechterhaltung eines cAMP-Signals gegenzusteuern.

Es konnte in den oben dargestellten *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass die Forskolin-induzierte Dezidualisierung unter Zugabe von PDE-Inhibitoren gesteigert und durch die gleichzeitige Gabe des Progestins MPA noch verstärkt werden kann. Hierbei zeigte die vergleichende Analyse des PDE3-Inhibitors Milrinone mit dem PDE4 Inhibitor Rolipram vor allem in der Kombination mit MPA einen tendenziell stärkeren Effekt von Rolipram auf die funktionelle Dezidualisierung der hESCs sowie auch auf die Transkription einiger beteiligter Transkriptionsfaktoren und die Expression des FOXO1-Proteins.

3.6. Validierung der *in vitro* Ergebnisse in einem humanisierten Endometriose Mausmodell *in vivo*

Da *in vitro* Experimente nie die komplexe *in vivo* Situation nachbilden können, wurde die *in vitro* nachgewiesene Steigerung der Forskolinwirkung durch den PDE-Inhibitor Rolipram in Kombination mit dem Progestin MPA *in vivo* in einem etablierten humanisierten Endometriose Mausmodell überprüft. Hierzu wurde eutopes humanes Endometriumgewebe verschiedener Patientinnen in die Peritonealhöhle immundefizienter Mäuse transplantiert und diese dann mit den Substanzen bzw. Substanzkombinationen behandelt, um deren Auswirkung auf die ektopen endometrialen Läsionen zu analysieren.

3.6.1. Analyse des eutopen Endometriums

Das humane eutope Endometrium für diese Versuche wurde anamnestisch aus der Sekretionsphase entnommen und die Zyklusphase anhand der Histomorphologie an HE-gefärbten Schnitten und des Proliferationsstatus mittels Ki67-Färbung verifiziert. Die HE-gefärbten Schnitte aller vier Patientinnen zeigten Epithel und Stroma. In allen Fällen zeigten sich sezernierende Drüsenanschnitte, die durch die charakteristische Sägeblattstruktur mit erweitertem Lumen und Sekretansammlungen auffielen. Das Stroma zeigte sich ödematös aufgelockert (Abbildung 28 A-D). Die bei einer Patientin (Abbildung 28 D) noch vorhandenen dichteren Stromabereiche wiesen auf eine etwas frühere Sekretionsphase hin. Auch die nur vereinzelt Ki-67-positiven Zellen im Stroma und Epithel bestätigten das Vorliegen der Sekretionsphase (Abbildung 28 E-H).

Für alle *in vivo* verwendeten endometrialen Gewebe konnte somit die anamnestisch erhobene sekretorische Zyklusphase histologisch bestätigt werden.

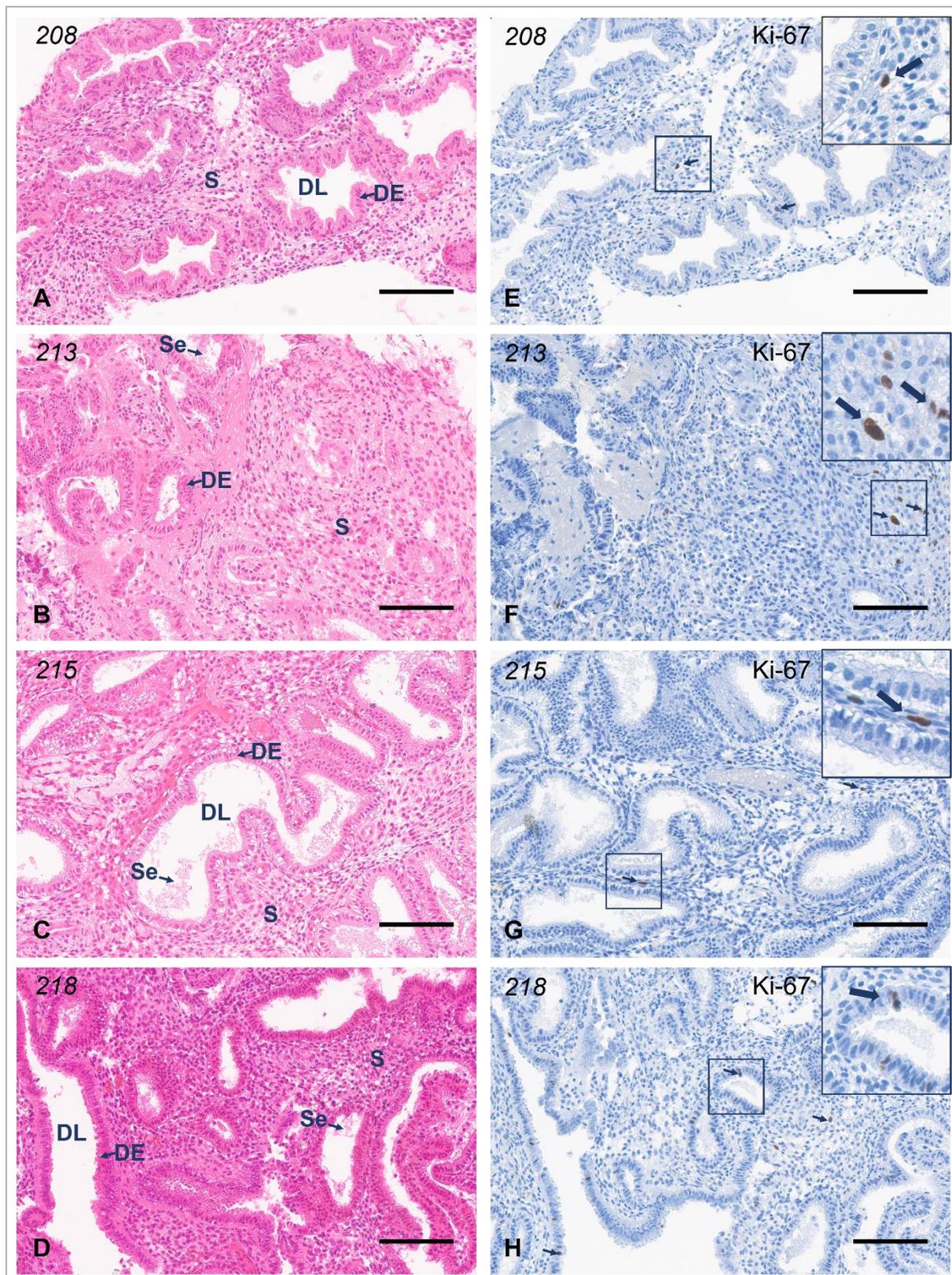


Abbildung 28: Histologische Untersuchung der in den *in vivo* Versuchen eingesetzten eutopen humanen Endometriumgewebe

Die verwendeten humanen endometrialen Gewebe (208, 213, 215, 218) wurden vor der Transplantation in die Nacktmäuse histomorphologisch nach Hämatoxylin und Eosin (HE)-Färbung (A-D) sowie nach Anti-Ki-67-Detektion (E-H) an Paraffinschnitten analysiert. (A-D) Der sekretorische Phänotyp ist durch eine ausgeprägte Sägeblattstruktur der Drüsen, der Sekretansammlung im Drüsenlumen und einer Auflockerung des Stromas sowie (E-H) einer sehr geringen Anzahl Ki-67-positiver Zellen (Pfeile) und damit einer geringen Proliferationsrate charakterisiert. Das Endometriumgewebe 215 (C) zeigte zudem Drüsenepithelzellen mit randständigen Vakuolen, die ebenfalls ein typisches Merkmal dieser Phase sind und schon auf eine etwas fortgeschrittenere

Sekretionsphase hinweisen. S \triangleq Stroma, DE \triangleq Drüsenepithel, DL \triangleq Drüsenlumen, Se \triangleq Sekret, Maßstab \triangleq 100 μm .

Wie zuvor für die Ausgangsgewebe der *in vitro* Versuche wurde auch in diesen für die *in vivo* Versuche eingesetzten nativen Endometriumgeweben der Status der Steroidhormonrezeptoren PRA, PRB und GR untersucht. Die Isoformen PRA und PRB waren in den Geweben aller Patientinnen nachweisbar (Abbildung 29 A, B), wobei das Endometrium der Patientin 213 eine stark erhöhte Expression für beide Isoformen auswies. Auch der GR in den Geweben aller Patientinnen nachweisbar (Abbildung 29 C, D), wobei sich hier im Gewebe der Patientin 213 eine deutlich höhere Expression als in den Endometrien der drei anderen Patientinnen zeigte. Diese Ergebnisse bestätigten die Präsenz dieser Steroidhormonrezeptoren in allen für die *in vivo* Versuche verwendeten Endometriumgewebe, wobei sich große inter-individuelle Unterschiede in der Expressionsstärke der untersuchten Hormonrezeptoren zeigten.

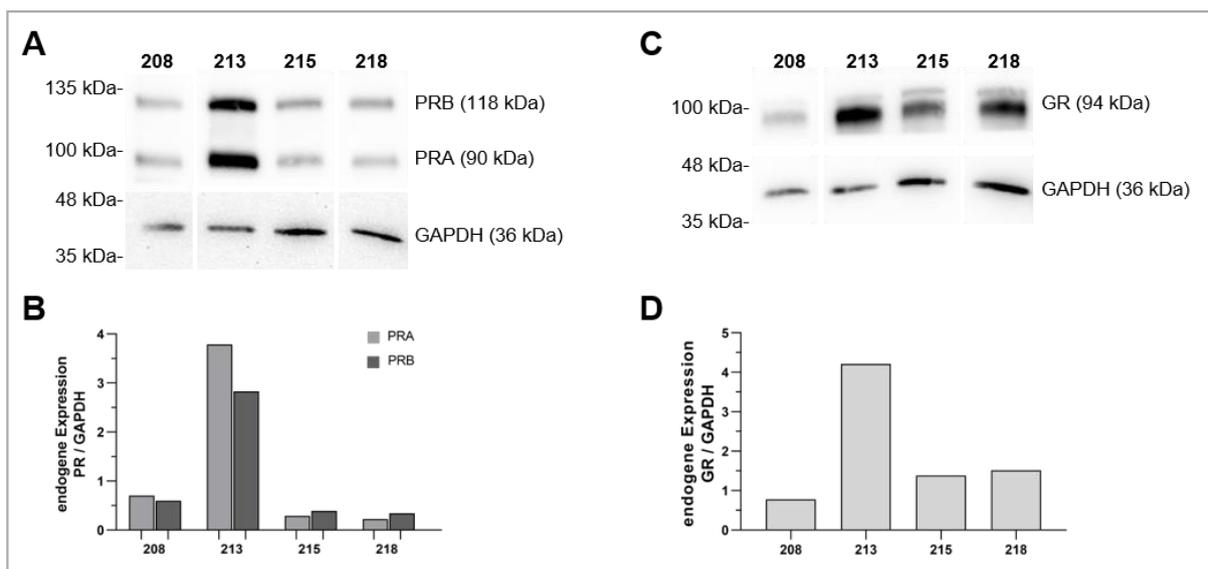


Abbildung 29: Western blot-Analyse für die Progesteronrezeptoren (PRA und PRB) und den Glukokortikoidrezeptor (GR) in den für die *in vivo* Versuche verwendeten eutopen humanen Endometrien

Die nativen eutopen Endometrien von vier Patientinnen (208, 213, 215, 218) wurden mittels Western blot-Analyse auf die Präsenz der Steroidhormonrezeptoren PRA und PRB (A, B) und GR (C, D) überprüft. (B, D) Bei der densitometrischen Auswertung wurde das PR/GR-Signal jeder Probe auf ihr jeweiliges GAPDH-Signal normiert. Die verwendeten Endometriumgewebe exprimierten alle drei untersuchten Rezeptoren, wobei individuelle Unterschiede in der Expressionsmenge vorlagen.

3.6.2. Analyse der ektopen endometrialen Läsionen nach Transplantation und Behandlung in der Nacktmaus

3.6.2.1. Gewichte und Morphologie der ektopen humanen Endometriumgewebe

Das oben beschriebene endometriale Gewebe der vier Patientinnen wurde intraperitoneal in athymische weibliche Nacktmäuse (NMRI, nu/nu) implantiert, die in den darauffolgenden 6 Tagen mit den jeweiligen Substanzen oder Substanzkombinationen behandelt wurden. Je Versuchsansatz wurde 6 Mäusen parallel das Endometrium derselben Patientin transplantiert, wobei jede Maus 4 Gewebefragmente mit einer Kantenlänge von 1,5-2 mm erhielt. Nach der 6-tägigen Behandlung der Nacktmäuse wurden die ektopen Endometriumfragmente entnommen, gewogen und zum einen histomorphologisch, zum anderen im Hinblick auf die Expression Dezidualisierungs-assoziiertes Transkriptionsfaktoren analysiert.

Abbildung 30 zeigt beispielhaft das makroskopische Erscheinungsbild der Fragmente einer Patientin vor Transplantation (Abbildung 30 A), am Peritoneum der Maus angenäht (Abbildung 30 B) sowie am Tag des Versuchsendes nach Entnahme (Abbildung 30 C). Makroskopisch ließen sich keine gravierenden Unterschiede vor und nach Transplantation erkennen. Das humane Gewebe war intakt und zeigte keine Unterschiede in der Konsistenz. Die transplantierten Gewebe ließen sich nach der Behandlung sehr gut wiederfinden und isolieren. Jedoch kam es in einigen Fällen vor, dass die Fragmente so im Fettgewebe der Maus verwachsen waren, dass eine Entnahme nicht möglich war, was zu einer abweichenden n-Zahl zwischen den Behandlungsgruppen führte.

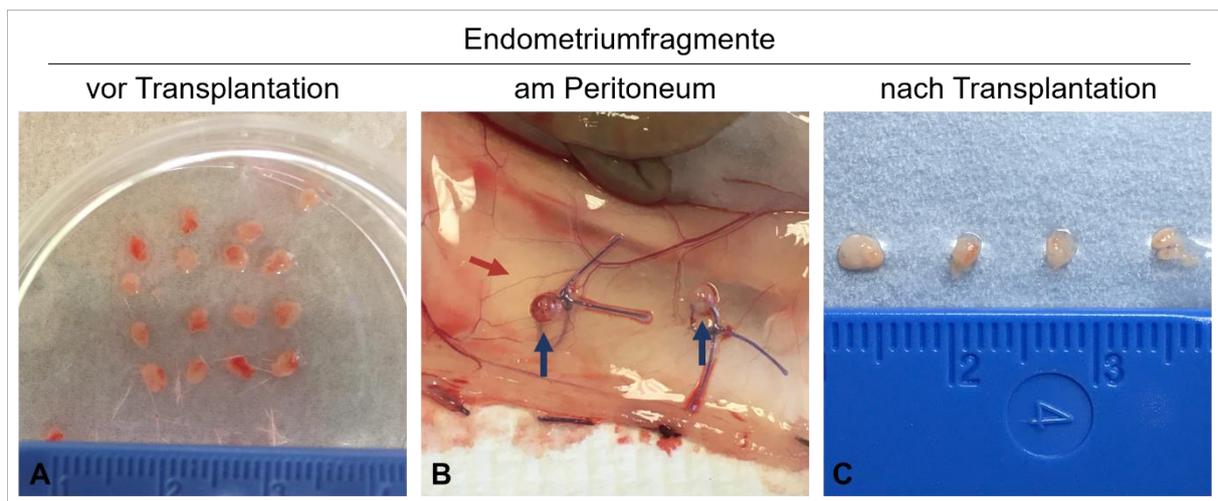


Abbildung 30: Makroskopisches Erscheinungsbild der humanen endometrialen Gewebefragmente vor Transplantation, angenäht am Peritoneum sowie nach Entnahme aus der Nacktmaus

Exemplarisch ist das verwendete Gewebe einer Patientin dargestellt. **(A)** Fragmente aus eutopen Endometrien vor Transplantation. **(B)** Am Peritoneum (roter Pfeil) der Bauchwand einer Nacktmaus fixierte endometriale Fragmente (blauer Pfeil) am Tag der Entnahme. **(C)** Ektope Fragmente nach Entnahme aus der Bauchhöhle. Das Gewebe erschien nach der Behandlungsdauer intakt und es ließen sich keine makroskopischen Unterschiede vor und nach Transplantation erkennen.

Die Nacktmäuse wurden beginnend am Tag nach Transplantation für 6 Tage mit Forskolin (100 µg / Tag i.p.) alleine, Rolipram (12,5 µg / Tag i.p.) alleine oder in Kombination mit Forskolin und/oder MPA (50 µg / Tag s.c.) behandelt. Darüber hinaus wurde für jeden Versuchsansatz eine Vehikelkontrolle (25 µl DMSO / Tag i.p.; 25 µl EtOH / Tage s.c.) mitgeführt. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Fragmente jeder Maus entnommen und gewogen. Abbildung 31 stellt zusammenfassend die Gewichte aller transplantierten Fragmente jedes Versuchsansatzes für die jeweiligen Behandlungen graphisch dar. Gezeigt wird der Median im Boxplot mit den zugehörigen Einzelwerten. Es ließen sich keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen erkennen (Median 1,7-2,1 mg).

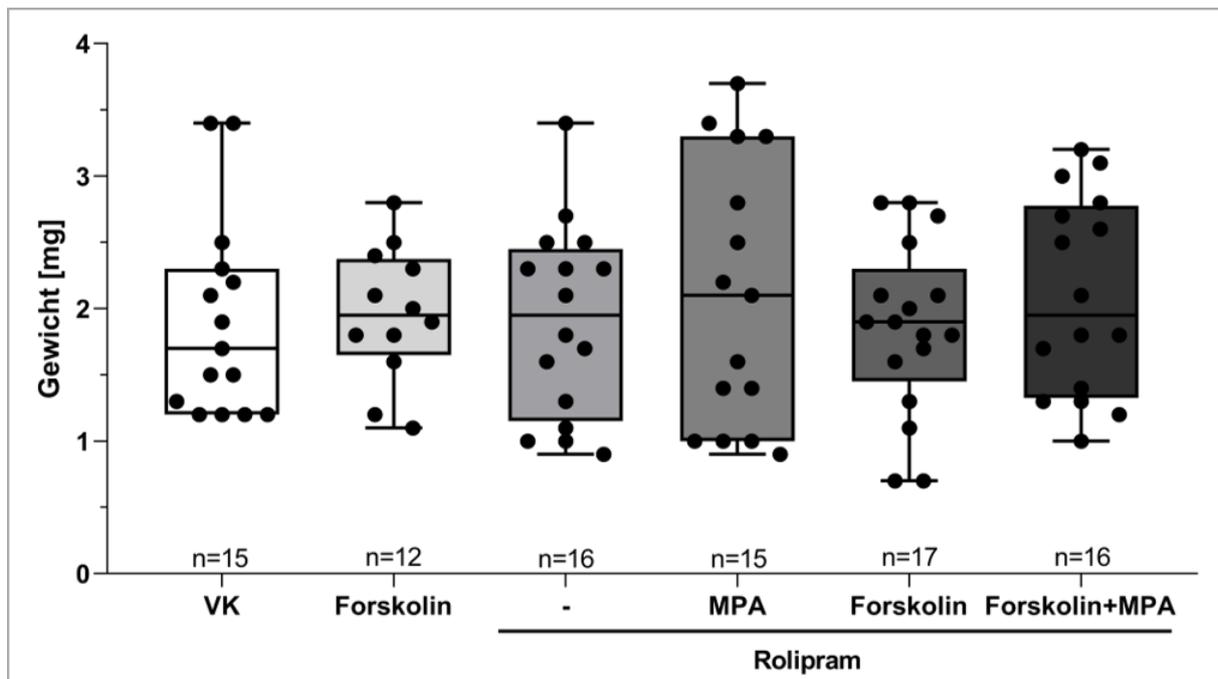


Abbildung 31: Gewichte der ektopen Endometriumfragmente nach 6-tägiger Kultur in unterschiedlich behandelten Nacktmäusen

Nach 6-tägiger Behandlung der Nacktmäuse mit Forskolin (100 µg / Tag i.p.) alleine, Rolipram (12,5 µg / Tag i.p.) alleine und in Kombination mit Forskolin und/oder MPA (50 µg / Tag s.c.) sowie der Vehikelkontrolle (VK, 25 µl DMSO / Tag i.p. & 25 µl EtOH / Tag s.c.) wurden alle Fragmente entnommen und gewogen. Die verschiedenen Behandlungen hatten keine signifikanten Effekte auf das Fragmentgewicht zur Folge.

Die entnommenen Fragmente wurden anschließend histomorphologisch an HE-gefärbten Paraffinschnitten analysiert. Alle humanen ektopen endometrialen Fragmente wiesen nach 6-tägigen Behandlungen eine gut erhaltene Morphologie auf. Abbildung 32 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Versuchsreihe für die durchgeführten Behandlungsgruppen. Es lassen sich deutlich endometriale Drüsen mit teilweise gut sichtbarem Drüsenepithel erkennen. Zudem sind in einigen Schnitten sezernierende Drüsen zu verzeichnen (Abbildung 32 B, C, E, F). Das Stroma war ebenfalls gut erhalten und wies in allen Ansätzen eine dicht gepackte Morphologie mit weniger ödematösen Bereichen im Vergleich zum Ausgangsgewebe vor Transplantation auf (Abbildung 28). Eine eindeutige morphologische Identifizierung dezidualisierter Bereiche, charakterisiert durch einen epitheloiden Phänotyp, war in den ektopen Fragmenten jedoch nicht möglich.

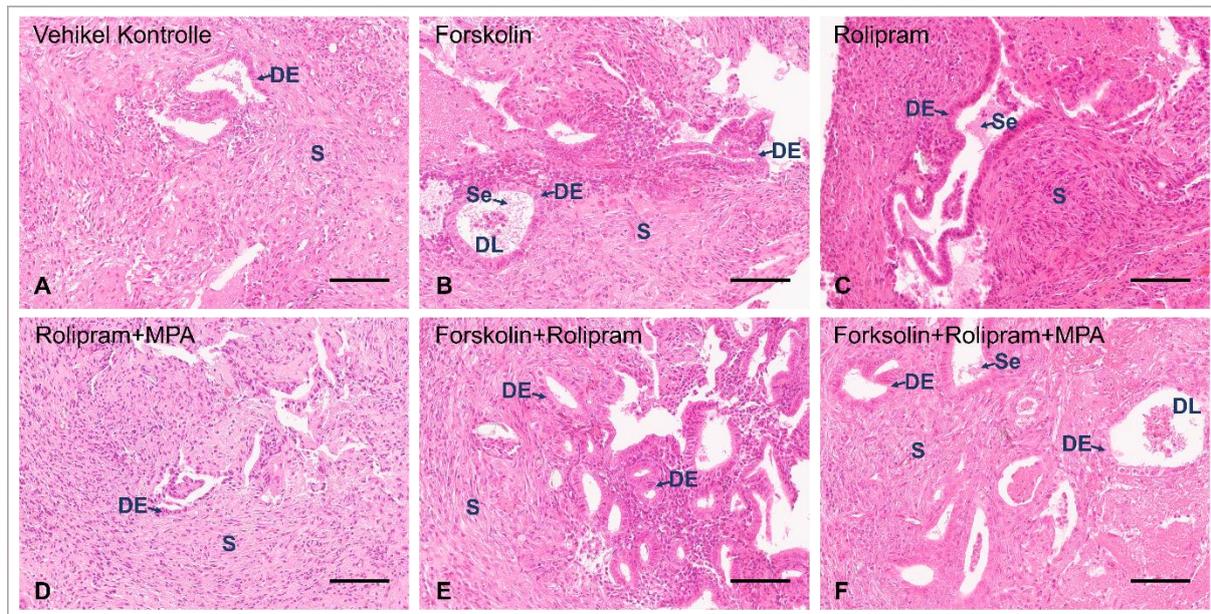


Abbildung 32: Histomorphologie der ektopen humanen Endometriumfragmente nach Transplantation in Nacktmäuse und 6-tägiger Behandlung mit Forskolin, Rolipram und MPA alleine oder in Kombination

Das humane endometriale Gewebe wurde in die Peritonealhöhle von Nacktmäusen transplantiert, die anschließend für 6 Tage mit Forskolin (100 µg / Tag i.p.) alleine (**B**), Rolipram (12,5 µg / Tag i.p.) alleine (**C**) und in Kombination mit Forskolin und/oder MPA (50 µg / Tag s.c.) (**D-E**) sowie der Vehikelkontrolle (25 µl DMSO/Tag i.p. & 25 µl EtOH / Tag s.c.) (**A**) behandelt wurden. Exemplarisch gezeigt wird ein Beispiel einer Behandlungsreihe eines verwendeten humanen Endometriums. Alle Fragmente wiesen eine gut erhaltene Morphologie auf und zeigten endometrium-typisches Drüsenepithel und Stroma. (**B, C, D, F**) Es waren sezernierende Drüsen in den Gewebeanschnitten erkennbar. Das Stroma erschien jedoch dichter gepackt vorzuliegen im Vergleich zum nativen Endometrium vor Transplantation. S ≙ Stroma, DE ≙ Drüsenepithel, DL ≙ Drüsenlumen, Se ≙ Sekret, Maßstab ≙ 100 µm.

3.6.2.2. Analyse der Genexpression Dezidualisierungs-assoziiierter Transkriptionsfaktoren in den ektopen humanen Endometriumfragmenten

Um Rückschlüsse auf eine möglich beginnende Dezidualisierung ziehen zu können, wurden die nach der Behandlung entnommenen ektopen Endometriumfragmente hinsichtlich der Transkription Dezidualisierungs-spezifischer Faktoren, die in der vorliegenden Arbeit auch bereits in den *in vitro* Versuchen evaluiert wurden, analysiert. Da bekannt ist, dass in diesem *in vivo* Modell bereits nach vier Tagen murine Gefäße in die humanen Fragmente eingewachsen sind (Grümmer et al. 2001), enthalten die humanen ektopen Fragmente somit auch immer eingewachsenes murines Gewebe. Um bei den folgenden molekularbiologischen Analysen humane von murinen Expressionssignalen unterscheiden zu können, wurden daher zunächst Primer generiert, die eine reine humane Spezifität aufweisen sollten. Diese wurden vor Durchführung einer *Realtime*-PCR mittels einer qualitativen RT-PCR für alle verwendeten spezifischen Primer verifiziert. Zur Austestung der Spezies-Spezifität

wurde murines Gewebe der Bauchwand, des Uterus sowie des Darms von drei verschiedenen Mäusen verwendet. Als Positivkontrolle dienten humane endometriale mit 0,25 mM 8-Br-cAMP plus 1 μ M MPA dezidualisierte Stromazellen. Zusätzlich wurde ein -RT-Ansatz mitgeführt, um genomische Kontaminationen auszuschließen (für humane Zellen in Vorversuchen durchgeführt, hier nicht gezeigt). Die RT-PCR mit GAPDH-Primern, die murines GAPDH detektieren können, bestätigen eine erfolgreiche RNA-Isolation und deren Umschreibung in cDNA aus den murinen Geweben. Hingegen zeigten die human-spezifischen GAPDH-Primer ausschließlich mit der humanen Probe ein Signal. Ebenso zeigten fast alle verwendeten Primer, mit Ausnahme der für HAND2 sowie für CREB1, eine spezifische Bande für die amplifizierte humane Probe und wiesen keine Kreuzreaktionen mit den murinen Geweben auf. HAND2 wurde in murinem Uterus- und Darmgewebe transkribiert, jedoch nicht in Gewebe aus der Bauchwand. Da die Fragmente an die Bauchwand der Nacktmäuse implantiert wurden, ist davon auszugehen, dass das aus den humanen Fragmenten amplifizierte HAND2-Genprodukt überwiegend humanen Ursprungs ist. Die verwendeten CREB1-Primer hingegen zeigten Kreuzreaktionen mit dem murinem Bauchwandgewebe, sodass hier keine Spezies-Spezifität gegeben war.

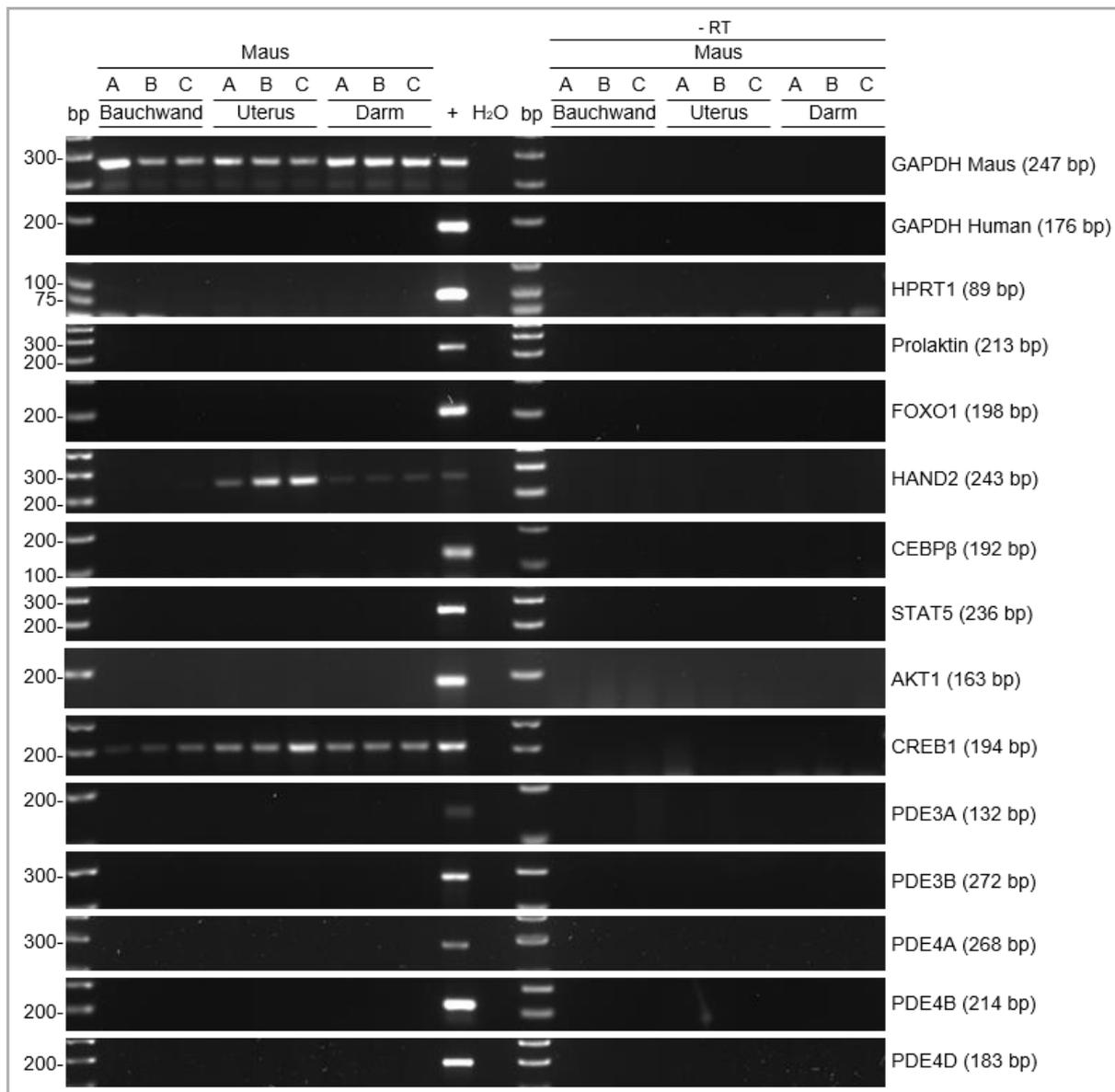


Abbildung 33: Überprüfung der Humanspezifität verwendeter Primer mittels RT-PCR

Gezeigt ist die Agarosegelelektrophorese der amplifizierten Produkte nach RT-PCR mit den verwendeten spezifischen Primern für die verschiedenen analysierten Gene. Es wurde murines Gewebe des Darms, des Uterus und der Bauchwand aus drei verschiedenen Mäusen (A, B, C) verwendet. Als Positivkontrolle (+) dienen mit 0,25 mM 8-Br-cAMP plus 1 µM MPA dezidualisierte hESCs. Um genomische Kontaminationen ausschließen zu können, wurde ein -RT Ansatz der murinen Proben durchgeführt, indem die *DNaseI*-behandelte RNA als Template in der PCR diente. Für die humanen Zellen wurde die -RT bereits in Vorversuchen überprüft (nicht gezeigt). Die verwendeten Primer für die *Housekeeping*-Kontrolle des humanen GAPDH wiesen eine humane Spezifität auf. Der Nachweis von GAPDH mittels Primer, die auch murines GAPDH erkennen (GAPDH Maus) bestätigten die korrekte RNA-Isolation aus murinem Gewebe. Es zeigte sich, dass die Primer mit Ausnahme von CREB1 und HAND2 human-spezifisch sind, HAND2 jedoch nicht in den murinen Proben aus der Bauchwand exprimiert wird.

Die so generierten und verifizierten Primer wurden im Folgenden zur Untersuchung von an der Induktion der Dezidualisierung beteiligten Faktoren eingesetzt. Aus den ektopen Fragmenten wurden nach deren Entnahme die RNA isoliert und die daraus umgeschriebene cDNA mittels *Realtime*-PCR in technischen Triplikaten eingesetzt. Es wurden zwei *Housekeeping*-Kontrollen (GAPDH, HPRT1) mitgeführt. Das Signal von

GAPDH und HPRT1 wurde zusammengerechnet und von dem Signal des zu analysierenden Gens abgezogen. Der so erhaltene Wert wurde auf die Vehikelkontrolle (Linie = 1) normiert. Da bekannt ist, dass der Dezidualisierungsmarker Prolaktin von den dezidualisierten Zellen sehr schnell sezerniert wird und das Protein in den ektopen Fragmenten schwer nachweisbar ist, wurde hier auch das Transkriptlevel des Prolaktingens untersucht. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse als Balkendiagramm mit Median und Interquartilsabstand mit den Einzelwerten dargestellt.

In den entnommenen endometrialen Gewebefragmenten war ein Anstieg der Prolaktin-Transkription nach Behandlung mit Rolipram plus MPA erkennbar (Abbildung 34 A). Eine zusätzliche Gabe von Forskolin zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Prolaktin-Transkription jedoch zeigten sich hier im Vergleich zu Rolipram plus MPA transkriptionell geringere Werte. Parallel zu dem beobachteten Anstieg der Prolaktin-Transkription in diesen Behandlungsansätzen wurde FOXO1 (Abbildung 34 B) leicht erhöht transkribiert. Der Faktor HAND2 (Abbildung 34 C) zeigte lediglich nach Rolipram plus MPA-Behandlung eine gering gesteigerte Transkription auf. Eine alleinige Behandlung mit Forskolin führte sowohl für Prolaktin (Abbildung 34 A) und FOXO1 (Abbildung 34 B) als auch für HAND2 (Abbildung 34 C) und PDE4A (Abbildung 34 H) zu erniedrigten transkriptionellen Werten. Die Transkription von CEBP β (Abbildung 34 D), STAT5 (Abbildung 34 E) und AKT1 (Abbildung 34 F) wurde hingegen durch die alleinige Forskolin-Behandlung leicht erhöht. Der Transkriptionsfaktor CREB1 (Abbildung 34 G) wurde in allen Behandlungskombinationen mit Rolipram gesteigert transkribiert. Dabei gilt es jedoch zu bedenken, dass die verwendeten Primer für dieses Gen nicht eindeutig human-spezifisch waren. Es zeigte sich, dass die Kombinationsbehandlung aus Forskolin, Rolipram und MPA lediglich für PDE4A erhöhte Transkriptlevel aufwies (Abbildung 34 H). Neben der Isoform PDE4A wurden ebenfalls die Transkriptionslevel der PDE3-Isoformen (A und B) sowie der PDE4-Isoformen (B und D) überprüft, welche jedoch in den humanen ektopen Endometriumfragmenten nicht nachgewiesen werden konnten.

Insgesamt zeigte sich für keines der untersuchten Gene eine signifikante Steigerung durch die unterschiedlichen Behandlungen. Zudem wurde deutlich, dass die vier verwendeten Endometriumgewebe unterschiedlich auf die einzelnen Behandlungen nach Transplantation in die Nacktmaus reagierten. Dabei ließen sich keine eindeutigen

Zusammenhänge zwischen den untersuchten Genen und den analysierten Proben feststellen.

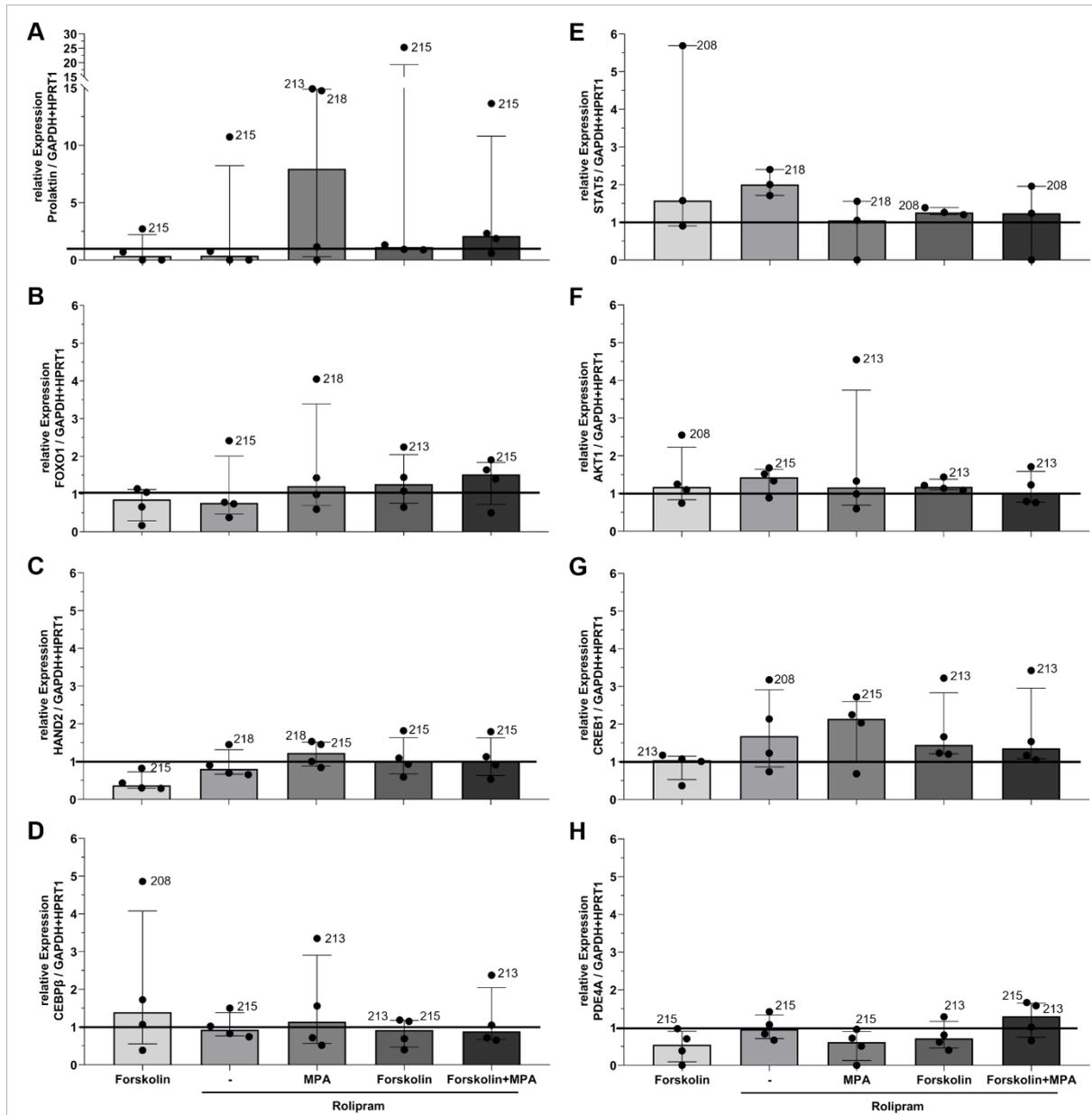


Abbildung 34: Realtime-PCR-Analyse der relativen Expression von Dezidualisierungs-spezifischen Faktoren in humanen ektopen Endometriumfragmenten nach Transplantation in Nacktmäuse und 6-tägiger Behandlung mit Forskolin, Rolipram und MPA alleine oder in Kombination

Fragmente von humanem Endometriumgewebe von vier Patientinnen (208, 213, 215, 218) wurden in die Bauchhöhle von Nacktmäusen transplantiert. Die Nacktmäuse wurden anschließend 6 Tage mit Forskolin (100 µg / Tag i.p.) alleine, Rolipram (12,5 µg / Tag i.p.) alleine und in Kombination mit Forskolin und/oder MPA (50 µg / Tag s.c.) sowie der Vehikelkontrolle (25 µl DMSO / Tag i.p. & 25 µl EtOH / Tag s.c.) behandelt. Die für jede Probe ermittelten Signale der Zielgene wurden auf die *Housekeeping*-Kontrollen (GAPDH und HPRT1) normiert und anschließend auf die Vehikelkontrolle (Linie = 1) bezogen. Dargestellt sind Balkendiagramme mit Median und Interquartilsabständen sowie die Einzelwerte der vier Versuchsdurchführungen. Die Zahlen bezeichnen die Gewebeprobe, die einen deutlich erhöhten Wert für die jeweils untersuchte Gentranskription aufzeigten. (A) Die Prolaktin-Transkription war nach Behandlung mit Rolipram plus MPA gesteigert. Parallel hierzu erfolgte auch ein Anstieg der (B) FOXO1- und (C) HAND2-Transkription. Zudem konnten auch erhöhte Werte für FOXO1 durch die zusätzliche Behandlung mit Forskolin verzeichnet werden. Diese waren jedoch geringer als die entsprechende

Behandlung ohne Forskolin (**B**). Die Transkriptionsfaktoren (**D**) CEBP β , (**E**) STAT5 und (**F**) AKT1 wurden nach alleiniger Forskolin-Behandlung gesteigert transkribiert. (**G**) CREB1 Transkripte waren in allen Behandlungsansätzen mit Rolipram erhöht und (**H**) PDE4A wies für die Kombination aus Forskolin, Rolipram und MPA eine gesteigerte Transkription auf. Insgesamt zeigten sich jedoch keine eindeutigen Korrelationen der Behandlungsansätze mit den transkriptionellen Erhöhungen in den verschiedenen Gewebeproben.

Auch wenn für alle untersuchten Gene keine signifikanten Effekte detektiert werden konnten, so zeigte sich doch in der Tendenz eine beginnende Dezidualisierung bei der kombinierten Behandlung aus Rolipram plus MPA sowie nach zusätzlicher Gabe von Forskolin. Hierbei fielen jedoch auch die starken Variabilitäten zwischen den verwendeten Endometriumgeweben und der jeweilig ermittelten Gentranskription auf. In diesen *in vivo* Versuchen fiel die Dezidualisierungsinduktion deutlich geringer aus als in den zuvor durchgeführten *in vitro* Versuchen und war in den humanen ektopen Endometriumfragmenten nach einer 6-tägigen Behandlung histomorphologisch noch nicht nachweisbar. Somit zeigte sich, dass die vielversprechenden *in vitro* getesteten Substanzkombinationen nicht so einfach auf die *in vivo* Situation übertragen werden können und es weiterführende Analysen mit längeren Inkubationszeiten und größerer Probenzahl benötigt, um genauere Aussagen treffen zu können.

4. Diskussion

Die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen stellt einen entscheidenden Prozess für die Implantation des Embryos und eine erfolgreiche Schwangerschaft dar (Brar et al. 1997; Dunn et al. 2003; Gellersen et al. 2007; Logan et al. 2012). Unter der Kontrolle der Hormone Östrogen und Progesteron (Queckbörner et al. 2020) führt dieser zelluläre Differenzierungsprozess zum Zellzyklusarrest sowie zur Inhibition der Zellproliferation (Logan et al. 2012). Bei Endometriosepatientinnen kann dieser Prozess der Dezidualisierung bedingt durch eine Progesteronresistenz gestört sein und so die Bildung ektooper Läsionen begünstigen (Attia 2000; Klemmt et al. 2006; Patel et al. 2017), die Beschwerden wie chronische Unterbauchschmerzen bis hin zu einer Subfertilität verursachen (Zondervan et al. 2020; Giudice 2010). Da die endometrialen Stromazellen eine entscheidende Rolle bei der Etablierung von ektooper Läsionen haben können (Nisolle et al. 2000), kann die Förderung der Dezidualisierungsreaktion einen möglichen Therapieansatz zur Behandlung der Endometriose darstellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der intrazellulären cAMP-Synthese in Kombination mit einer Hemmung des intrazellulären cAMP-Abbaus eine gesteigerte Dezidualisierungsreaktion nicht nur von eutopen endometrialen Stromazellen von gesunden Patientinnen, sondern auch von an Endometriose erkrankten Patientinnen induzieren kann. Diese Induktion konnte durch die Gabe des synthetischen Progestins MPA verstärkt werden.

4.1. Einfluss der Dezidualisierung auf zytologische Parameter

Die Dezidualisierung der im undifferenzierten Zustand spindelförmigen endometrialen Stromazellen führt zu abgerundeten, epitheloiden, hoch spezialisierten sekretorischen Deziduazellen (Pan-Castillo et al. 2018; Gellersen et al. 2007). Diese bereits in der Literatur beschriebenen morphologischen Veränderungen (Gellersen et al. 2007) waren auch in der vorliegenden Arbeit nach erfolgreicher Induktion der Dezidualisierung zu erkennen, indem die Zellen eine Transformation zu einer epitheloiden Morphologie durchliefen. Der durch den Dezidualisierungsprozess induzierte Einfluss auf die Zellgröße wurde in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei zeigte sich eine Verringerung der Zellgröße in allen mit 8-Br-cAMP behandelten Zellen, wohingegen die mit Forskolin-behandelten

Zellen eine vergleichsweise geringere Reduktion aufwiesen. Eine Veränderung der Zellgröße ist möglicherweise eine Folge des *Remodellings* der Zellen während der Dezidualisierung und ähnelt einer mesenchymal-epithelialen Transition (MET). Hierbei verändert sich die Form der Zellen sowie ihre elastischen Eigenschaften aufgrund von Veränderungen des Zytoskeletts im Zuge der MET (Pan-Castillo et al. 2018). Diese Veränderungen werden zusammen mit einer Umverteilung von Vinculin sowie einer Destabilisierung von F-Aktin beschrieben, was zu einer abgerundeten Zellmorphologie führt (Pan-Castillo et al. 2018). Entgegen der in der Literatur beschriebenen Zellgrößenzunahme in dezidualisierten Zellen (Wu et al. 1995; Wynn 1974), zeigte die Behandlung mit 8-Br-cAMP in dieser Arbeit eine Abnahme der Zellgröße nach 6 Tagen Behandlung *in vitro*. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien wurden die Arbeiten von Wu et al. jedoch an fixiertem Deziduagewebe von Plazenten durchgeführt (Wu et al. 1995). Auch Untersuchungen von Wynn et al., die eine Vergrößerung der Deziduazellen an Tag 24 im Menstrationszyklus zeigten, wurden an fixiertem endometrialen Gewebe durchgeführt (Wynn 1974). In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden primäre hESCs genutzt, welche *in vitro* dezidualisiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. In der Verwendung unterschiedlicher Ausgangsgewebe und Analysemethoden könnte der beschriebene Unterschied in der Zellgröße begründet sein. Es ist zudem nicht auszuschließen, dass sich die hESCs bei einer längeren Behandlungsdauer zur Induktion der Dezidualisierung *in vitro* vergrößern würden. Darüber hinaus haben Wu et al. eine Korrelation zwischen der Zellgröße und der gesteigerten Expression von Prolaktin beschrieben. Auch wenn dezidualisierte Zellen Prolaktin nicht speichern, ermöglicht ihnen die Zellvergrößerung eine höhere Synthesekapazität und Freisetzung von Prolaktin (Wu et al. 1995). Da in dieser Arbeit keine Vergrößerung der Zellen gefunden werden konnte, jedoch eine gesteigerte Prolaktinsekretion kann diese These hier nicht bestätigt werden.

In dieser Arbeit wurde neben der Zellgröße auch die Zellgranularität analysiert. Es ist bekannt, dass die während des Dezidualisierungsprozesses differenzierenden endometrialen Stromazellen Glykogen und Lipide anreichern (Wynn 1974; Pan-Castillo et al. 2018). Parallel kommt es zur Ausdehnung des rauen Endoplasmatischen Retikulums sowie des Golgi Komplexes und zu einer gesteigerten Expression verschiedener extrazellulärer Matrixproteine und dem Anstieg der Produktion sekretorischer Proteine (Christian et al. 2002a; Pan-Castillo et al. 2018). *In vitro*

Studien mit primären endometrialen Stromazellen zeigten zudem, dass die deziduale Transformation zu einer geänderten Expression von Steroidhormonrezeptoren mit Folgen für den Steroidmetabolismus, einer geänderten Expression von intrazellulären Enzymen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und deren Rezeptoren sowie zur Induktion von Apoptose-Modulatoren und Dezidua-spezifischen Transkriptionsfaktoren führt (Christian et al. 2002a).

In der vorliegenden Arbeit führte eine Behandlung mit MPA alleine oder in Kombination mit 8-Br-cAMP zu einem Anstieg der Granularität der Zellen, wohingegen die mit Forskolin-behandelten hESCs eine Verringerung der Zellgranularität aufwiesen. Es könnte vermutet werden, dass die gesteigerte Granularität nach 8-Br-cAMP Behandlung der hESCs mit den intrazellulären Prozessen der Dezidualisierung in Verbindung stehen, da sich in diesen Ansätzen im Vergleich zu denen mit Forskolin auch eine erhöhte Prolaktinsekretion detektieren lässt. Hierbei fällt jedoch auf, dass auch die alleinige MPA-Behandlung zu einem Anstieg der Granularität, nicht jedoch der Prolaktinsekretion führte. Somit könnte diesbezüglich keine eindeutige Korrelation beobachtet werden.

4.2. Wirkung von Progestinen auf die *in vitro* Dezidualisierung endometrialer Stromazellen

In dieser Arbeit zeigten sich unterschiedliche Effekte von Progesteron und dem Progestin MPA in Kombination mit der Aktivierung des cAMP-Signalweges. Die alleinige 6-tägige *in vitro* Behandlung mit einem der untersuchten Progestine (Progesteron oder MPA) führte nicht zu einer Induktion der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen von Patientinnen mit und ohne Endometriose. Aus der Literatur ist bekannt, dass Progestine nur schwache Induktoren der Dezidualisierung *in vitro* darstellen und die *in vitro* Behandlung von Stromazellen mit Progestinen alleine nur geringe Auswirkung auf den dezidualen Phänotypen hat (Gellersen und Brosens 2003). Anzeichen einer Dezidualisierung wurden erst nach 8 bis 10 Tagen Stimulation der Stromazellen beobachtet (Gellersen et al. 2007; Brar et al. 1997; Brosens et al. 1999). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Dezidualisierungsreaktion neben dem Progesteronsignal auch ein erhöhtes cAMP-Level benötigt, woraus sich ein sogenannter „*cross-talk*“ in humanen endometrialen Stromazellen zwischen cAMP und Progesteron ergibt (Gellersen und Brosens 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte

die durch Forskolin/8-Br-cAMP-induzierte gesteigerte Prolaktinsekretion der hESCs durch die Kombination mit dem Progestin MPA, jedoch nicht mit Progesteron signifikant gesteigert werden. Bereits Brosens et al. konnten zeigen, dass die cAMP-induzierte funktionelle Dezidualisierung primärer ESCs, markiert durch den Anstieg des Markerproteins Prolaktin, deutlich durch die gleichzeitige Zugabe von MPA erhöht wird (Brosens et al. 1999). Houserman et al. hingegen zeigten, dass die Forskolin-induzierte Steigerung des cAMP-Levels in endometrialen Stromazellen durch die zusätzliche Gabe von Progesteron ansteigt, wobei hier keine funktionellen Versuche im Hinblick auf die Überprüfung der Prolaktinsekretion der Stromazellen durchgeführt wurden (Houserman et al. 1989). In beiden vorgenannten Studien wurden jedoch die Wirkungen von Progesteron und MPA nicht miteinander verglichen. In der Literatur wird beschrieben, dass eine Konzentration von 100 nM Progesteron (getestete *Range* 0,01 nM bis 10 µM) in Kombination mit Östradiol die Induktion der *in vitro* Dezidualisierung bzw. die höchste intrazelluläre cAMP-Level in hESCs bewirkt (Kasahara et al. 2001). Im Hinblick auf den Einsatz von MPA zur Induktion der Dezidualisierung hingegen wird im überwiegenden Teil der Publikationen eine Konzentration von 1 µM eingesetzt, sowohl alleine als auch in Kombination mit cAMP (Brar et al. 1997; Brosens et al. 1999; Matsuoka et al. 2010). Auch in dieser Arbeit wurde mit den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen für diese Progestine gearbeitet, obwohl die eingesetzte Konzentration von MPA 10-fach höher war als die für Progesteron. Um auszuschließen, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigte selektive Steigerung der 8-Br-cAMP/Forskolin-induzierten Dezidualisierung nur durch MPA nicht durch den Unterschied in den verwendeten Konzentrationen bedingt war, wurden beide Progestine in vergleichbaren Konzentrationen ausgetestet. Hierbei zeigte sich, dass eine 10-fach höhere Konzentration an Progesteron in Kombination mit 8-Br-cAMP keine zusätzliche Steigerung der Prolaktinmenge im Zellüberstand bewirkte. Zudem hatte auch eine Reduktion der MPA-Konzentration keinen merklichen Einfluss auf die beobachtete MPA-vermittelte Steigerung des cAMP-Effektes. Somit kann der beobachtete Unterschied von MPA und Progesteron auf die cAMP-vermittelte Induktion der Dezidualisierung nicht auf die eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen Progestine zurückgeführt werden, sondern liegt in der Substanz an sich begründet.

MPA ist ein 17 α -Hydroxyprogesteron Derivat, welches aufgrund seiner pharmakologischen Ähnlichkeiten zu Progesteron als synthetisches Progestin (Ghatge

et al. 2005) in der Kontrazeption sowie in der *first-line* Endometriose-Therapie Verwendung findet (Kalaitzopoulos et al. 2021). In der Literatur wird eine hohe Bindungsaffinität sowie eine agonistische Wirkung von MPA auf den Progesteron-Rezeptor (PR) beschrieben (Schindler et al. 2008). Studien in ovariectomierten Meerschweinchen bestätigen die Bindungsaffinität von MPA an den PR, zeigten jedoch auch eine schnellere Dissoziation vom PR als das Progesteron (Feil et al. 1976). Der PR ist an der Dezidualisierung von hESCs beteiligt und kann mit verschiedenen Dezidua-spezifischen Transkriptionsfaktoren interagieren (Gellersen und Brosens 2003). Die PR-Isoformen PRA und PRB zeigen ein Zyklus- und Zelltyp-abhängiges Expressionsprofil (Gellersen und Brosens 2014). Während die PRB-Expression in der proliferativen Phase im Stroma und Epithel des Endometriums deutlich ansteigt und danach wieder absinkt, zeigt der PRA während des gesamten Zyklus und in der Schwangerschaft eine starke Expression in den Stromazellen (Gellersen und Brosens 2014). Die Expression in den Stromazellen wurde in den für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche verwendeten nativen eutopen Endometrien überprüft. Hier zeigte sich eine erhöhte Expression für PRA in Patientinnen ohne Endometriose. Im Gegensatz hierzu wies das eutope Endometrium der Patientinnen mit Endometriose eine geringere PRA- als PRB-Expression und eine im Vergleich mit den Patientinnen ohne Endometriose erhöhte PRB-Expression auf. Eine gesteigerte PRB-Expression konnten auch Wölfler et al. in ihren Studien beschreiben. Sie zeigten in ihren immunhistochemischen Untersuchungen, dass im Endometrium von Endometriosepatientinnen in der mittleren bis späten sekretorischen Phase eine höhere PRB-Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne Endometriose gefunden wurde. Darüber hinaus haben sie auch starke intra- und inter-individuelle Varianzen und kein zyklusabhängiges Expressionsbild für beide Rezeptor-Isoformen festgestellt (Wölfler et al. 2016). Solche Unterschiede zeigten sich auch in der vorliegenden Arbeit. Die Isoform PRA gilt als die dominant vorkommende Form im endometrialen Stroma (Critchley und Saunders 2009; Gellersen und Brosens 2014), wird aber als die transkriptionell weniger aktive Form beschrieben, die jedoch ein Inhibitor der Isoform PRB darstellt (Christian et al. 2002a; Gellersen und Brosens 2003). Es wird vermutet, dass der aktivierte PRA eine fördernde Rolle bei der Interaktion mit dem cAMP-Signalweg während der Dezidualisierungsreaktion von hESCs spielt (Brosens und Gellersen 2006). Da die Promotorregion des dezidualen Prolaktins kein klassisches palindromisches *Progesterone Response Element* (PRE) besitzt (Christian et al. 2002a; Gellersen und Brosens 2003), wird angenommen, dass

der PRA hier als eine Art *Scaffold* dient und mit dem transkriptionellen Aktivierungskomplex, bestehend aus Dezidua-spezifischen Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren, interagiert (Christian et al. 2002a; Brosens und Gellersen 2006). So lässt sich eine Steigerung der dezidualen Prolaktinexpression durch Progestine erklären (Christian et al. 2002a). Die auch in dieser Arbeit gezeigte verminderte Expression des PRA im Endometrium von Endometriosepatientinnen könnte somit eine Ursache für eine eingeschränkte Dezidualisierungsreaktion der hESCs darstellen.

Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte steigernde Effekt des MPA auf den cAMP/Forskolin-vermittelten Anstieg der Prolaktinkonzentration im Zellüberstand der hESCs ist möglicherweise auf die Bindung des MPA an den PR zurückzuführen, könnte jedoch auch durch seine Bindung an andere Steroidrezeptoren aufgrund von Sequenzhomologien bedingt sein (Ghatge et al. 2005; Moore et al. 2012). Für MPA wurden Bindungsaffinitäten für den Androgen- (AR), den Mineralocorticoid- (MR) sowie den Glukokortikoidrezeptor beschrieben (Schindler et al. 2008), wobei jedoch Studien zur Wirkung von MPA im Gegensatz zu anderen synthetischen Progestinen (Levonorgestrel u. a.) geringere Effekte auf den MR belegten (Louw-du Toit et al. 2020). Der AR wird im zyklischen Endometrium mit einer Verringerung in der sekretorischen Phase exprimiert, jedoch bleibt der Rezeptor in der Dezidua der frühen Schwangerschaft detektierbar (Cloke et al. 2008). MPA führt nach Induktion der Dezidualisierungsreaktion in hESCs zu einer Erhöhung des AR und zu seiner Transaktivierung (Cloke et al. 2008). Dabei kann der AR an der Zytoskelettorganisation, der Zellmotilität und der Zellzyklusregulation beteiligte Gene regulieren (Kajihara et al. 2012; Kuroda et al. 2013), welche mit der Transformation dezidualisierender Stromazellen assoziiert sind (Kajihara et al. 2014). Neben der Bindungsaffinität für den AR weist MPA ebenfalls eine Affinität für den Glucocorticoidrezeptor (GR) auf (Bamberger et al. 2001; Schindler et al. 2008). Der PR und GR weisen eine 90-%ige Sequenzidentität innerhalb ihrer DNA-Bindedomäne auf, sodass sie damit eine ähnliche Bindungskapazität für die gleichen Chromatinbereiche inne haben (Ogara et al. 2019). Der GR wird in endometrialen Stromazellen während des Zyklus mit einer stärkeren Expression in der proliferativen Phase exprimiert (Bamberger et al. 2001). Er agiert als transkriptioneller Co-Aktuator für STAT5, induziert die STAT5-abhängige Transkription und kann zusammen mit STAT5 die Transkriptionsfaktoren CEBPs binden (Petta et al. 2016). Sowohl STAT5 als auch CEBP werden im Zusammenhang mit der Dezidualisierung beschrieben und

können mit dem PR interagieren (Gellersen und Brosens 2003). Zudem kann der GR die Induktion von WNT4, einer Komponente in der Progesteronantwort im Uterus und in der Mamma, stimulieren und darüber hinaus an einer anhaltenden cAMP-Aktivität in dezidualisierenden Zellen beteiligt sein (Kuroda et al. 2013). Außerdem wirkt der GR auf die katalytische Untereinheit der PKA und ist an einer anhaltenden cAMP-Antwort in dezidualisierenden Zellen mit beteiligt (Kuroda et al. 2013). Der GR wurde im Kern von endometrialen Stromazellen, nicht jedoch in den Epithelzellen, über den gesamten Menstruationszyklus hinweg nachgewiesen (Bamberger et al. 2001; Critchley und Saunders 2009). Mittels Western blot-Analyse wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine GR-Expression im eutopen Endometrium beider Patientinnenkohorten nachgewiesen. Hierbei wiesen die Endometrien der Endometriosepatientinnen ein homogeneres inter-individuelles Bild in der Expressionsstärke des Rezeptors auf im Vergleich zu denen der nicht erkrankten Frauen, jedoch gab es keinen Unterschied in der Gesamtexpression zwischen diesen beiden Kohorten. Das zeigt, dass die Expression des GR scheinbar nicht durch die Endometrioseerkrankung, welche oftmals auch mit Entzündungsprozessen verknüpft ist (Greene et al. 2016), beeinflusst war. Dennoch könnte der GR auch als anti-inflammatorischer Faktor agieren (Petta et al. 2016), da eine Rolle während der Schwangerschaft beschrieben wurde, indem er Inflamationsprozesse in der Plazanta unterdrückt (Moutsatsou und Sekeris 2003).

Der GR wurde in den hier verwendeten eutopen Endometrien nachgewiesen und könnte somit eine Rolle bei der Induktion der Dezidualisierung in den *in vitro* Versuchen spielen. Die vielseitigeren Bindungsaffinitäten von MPA gegenüber denen von Progesteron und der damit verbundenen Wirkungsweisen könnten die Befunde dieser Arbeit erklären, dass die 8-Br-cAMP/Forskolin-induzierte Dezidualisierung durch MPA, nicht aber durch Progesteron gesteigert wurde.

4.3. Vergleich des Effektes von 8-Br-cAMP und Forskolin auf die *in vitro* Dezidualisierung von hESCs

Neben der Progesteronwirkung benötigt die Initiierung der Dezidualisierung ein erhöhtes intrazelluläres cAMP-Level sowie die Aktivierung des Proteinkinase A (PKA)-Signalweges (Gellersen und Brosens 2003). cAMP ist ein ubiquitärer *second messenger*, welcher über die Bindung von Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren produziert wird. Hierbei aktiviert das G-Protein die membranständige

Adenylatcyclase, welche wiederum cAMP aus ATP bilden kann (Gellersen und Brosens 2014). Das gebildete cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der PKA, wodurch die katalytische Untereinheit abgegeben wird und diese dann weiteren Einfluss auf an der Dezidualisierungsreaktion beteiligter *downstream targets* nehmen kann (Gellersen und Brosens 2003; Gellersen und Brosens 2014; Yan et al. 2016). Die Dezidualisierung von hESCs kann *in vitro* nach wenigen Tagen durch die alleinige Gabe von 0,5 mM cAMP induziert werden (Brosens et al. 1999; Pohnke et al. 1999; Hwang et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits geringere Konzentrationen von 8-Br-cAMP (0,1 mM; 0,25 mM) ausreichen, um eine funktionelle Dezidualisierung auszulösen. In einer Studie von Tang et al. wurden die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen von Dibutyl- (db)-cAMP (0,02; 0,1; 0,5; 2,5 mM) auf endometriale Stromazellen untersucht (Tang et al. 1993). Tang et al. konnten zeigen, dass db-cAMP die Prolaktinproduktion in einer konzentrationsabhängigen Weise beeinflusst und 0,5 mM db-cAMP die höchsten Prolaktinlevel im Überstand der endometrialen Stromazellen induzierte (Tang et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde für die konzentrationsabhängige Untersuchung des cAMP-Effektes auf die Dezidualisierung das cAMP-Analog 8-Br-cAMP verwendet. Im Gegensatz zu Tang et al. konnte hierbei jedoch bereits bei einer Konzentration von 0,25 mM 8-Br-cAMP die höchste Prolaktinkonzentration im Zellüberstand der hESCs gemessen werden. Grund hierfür könnte eine abweichende Wirkung des hier verwendeten cAMP-Analogs sein. Weitere Experimente von Tang et al. zeigten, dass db-cAMP geringere Auswirkungen auf die Prolaktinmenge im Vergleich zu 8-Br-cAMP hat (Tang et al. 1993). Zudem können auch die interindividuellen Unterschiede der verwendeten primären Stromazellen in der Studie von Tang et al. im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären Stromazellen für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein. Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden, dass eine gesteigerte Dezidualisierung auch mit geringeren Konzentrationen an 8-Br-cAMP zuverlässig ausgelöst werden kann. Im Vergleich zwischen Tang et al. und der hier vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass verschiedene cAMP-Derivate genutzt werden können, um in primären endometrialen Stromazellen *in vitro* eine Dezidualisierungsreaktion auszulösen.

Neben der direkten Gabe von cAMP lässt sich das intrazelluläre cAMP-Level in verschiedenen Zellentitäten *in vitro* auch durch Forskolin erhöhen (Sapio et al. 2017). Forskolin ist ein direkter Aktivator der Adenylatcyclase, welche intrazellulär cAMP aus

ATP generiert und somit die cAMP-Konzentration steigert (Sapio et al. 2017). Auch in endometrialen Stromazellen führte die Gabe von Forskolin innerhalb weniger Stunden zu einem gesteigerten cAMP-Level (Houerman et al. 1989). Dabei zeigte sich bei einer untersuchten *Range* von 1 μM bis 50 μM eine Dosis-Abhängigkeit in endometrialen Stromazellen, wobei eine Konzentration von 25 μM Forskolin zur stärksten Steigerung der cAMP-Produktion führte (Houerman et al. 1989). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der konzentrationsabhängige Effekt von Forskolin auf die Prolaktinproduktion von endometrialen Stromazellen untersucht. In einer untersuchten *Range* von 1 μM bis 100 μM Forskolin konnten nur geringe Effekte auf die Prolaktinkonzentration im Zellüberstand verzeichnet werden. Durch die zusätzliche Gabe des Progestins MPA hingegen wurde die Prolaktinproduktion in den getesteten Konzentrationen von 10 μM und 25 μM Forskolin deutlich erhöht. Hierbei induzierte die Kombination mit 10 μM Forskolin die höchsten Konzentrationen von Prolaktin im Zellüberstand. Auch Houerman et al. zeigten einen steigernden Effekt von zusätzlich zu Forskolin applizierten Steroidhormonen auf die Prolaktinproduktion von hESCs, wobei hier eine Kombination von Östradiol- und Progesteron eingesetzt wurde (Houerman et al. 1989). Diese Daten unterstützen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, dass Forskolin alleine eine geringere Auswirkung auf die Prolaktinsekretion der Stromazellen hat, diese aber durch die zusätzliche Gabe des hier angewendeten Progestins MPA erhöht wird.

Auch in Studien von Tang et al. wurden signifikante Steigerungen der Prolaktinmenge nach Behandlung mit db-cAMP/8-Br-cAMP oder Forskolin in Kombination mit MPA gezeigt, wobei Forskolin zu einem schwächeren Effekt führte (Tang et al. 1993). Die höheren durch 8-Br-cAMP-induzierten Prolaktinwerte könnten dadurch bedingt sein, dass 8-Br-cAMP resistenter gegenüber dem Abbau durch Phosphodiesterasen ist und diese Enzyme vermutlich sogar inhibieren kann (Muneyama et al. 1971). Jedoch zeigten andere Analysen auch, dass 8-Br-cAMP trotz hoher Stabilität durch die Phosphodiesterasen zu 8-Br-AMP hydrolysiert werden kann (Xu et al. 2004). Darüber hinaus ist 8-Br-cAMP membrangängig (Werner et al. 2011), wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration unmittelbar erhöht wird und somit direkt wirken kann. Forskolin hingegen wirkt als Aktivator der Adenylatcyclase auf die katalytische Untereinheit des Enzyms (Sapio et al. 2017). Somit ist es möglich, dass die Behandlung mit Forskolin zu einer verzögerten intrazellulären Erhöhung des *second messengers* cAMP führt. *Second messenger*-Signalwege können an vielen unterschiedlichen physiologischen

Zellprozessen, wie z. B. dem Wachstum, der Reproduktion, der Differenzierung und der Apoptose beteiligt sein. Eine Rolle dieses Signalweges wurde daher auch bei diversen Erkrankungen, wie zum Beispiel Entzündungsreaktionen, Krebs, myokardialer Atrophie und Depression beschrieben (Yan et al. 2016). Für einige Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Asthma und Adipositas wird Forskolin bereits eingesetzt, um in den cAMP-Signalweg einzugreifen (Kavitha et al. 2010; Sapio et al. 2017). Dies macht die Verwendung von Forskolin auch für mögliche Behandlungsoptionen für die Erkrankung Endometriose interessant, bei der eine mögliche Progesteronresistenz, die zu einer verminderten Dezidualisierung endometrialer Stromazellen führen kann, umgangen werden kann (Patel et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine verringerte Dezidualisierungsreaktion der aus eutopem Endometrium von erkrankten Frauen isolierten hESCs im Vergleich zu denen nicht-erkrankter Frauen nach Behandlung mit 0,25 mM 8-Br-cAMP/10 µM Forskolin plus MPA festgestellt. Auch Klemmt et al. konnten zuvor zeigen, dass aus Endometrioseeläsionen sowie auch aus eutopem Endometrium von Frauen mit Endometriose isolierte Stromazellen eine reduzierte Dezidualisierungskapazität aufwiesen. Dabei zeigten sie, dass das Level an Prolaktin im Zellüberstand an Tag 6 der cAMP-Behandlung den höchsten Peak aufwies, jedoch für das eutopem Endometrium von erkrankten Frauen signifikant niedriger war als für die nicht an Endometriose erkrankten Frauen (Klemmt et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die 8-Br-cAMP/Forskolin-vermittelte Induktion der Dezidualisierung nicht nur bei den endometrialen Stromazellen gesunder Frauen, sondern auch bei denen von an Endometriose erkrankter Frauen durch die gleichzeitige Behandlung mit MPA signifikant gesteigert werden kann. In beiden Kohorten erwies sich die Forskolin-induzierte Dezidualisierung jedoch als deutlich weniger effektiv als die durch 8-Br-cAMP-induzierte Differenzierung. Zur Entwicklung neuer Optionen für die Endometriose-therapie auf der Basis von Forskolin war ein Ziel dieser Arbeit, den Effekt von Forskolin neben der Applikation von MPA durch andere synergistisch wirkende Substanzen weiter zu verstärken.

4.4. **Steigerung der Forskolin-induzierten Dezidualisierung von hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose**

Das intrazelluläre Level von cAMP kann neben der Stimulation der Adenylatcyclase auch durch einen verminderten Abbau durch die Inhibition der Phosphodiesterasen (PDEs) gesteigert werden (Harris et al. 1973). PDEs beschreiben eine Familie von Phosphohydrolasen, die selektiv die Hydrolyse von 3'-zyklischen Phosphatbindungen von Adenosin- und/oder Guanosin-3',5'-zyklischem Monophosphat katalysieren (Bender 2006). Damit spielen sie eine kritische Rolle in der intrazellulären Signalgebung, die durch *second messenger* vermittelt wird (Keravis und Lugnier 2012). Erhöhte Konzentrationen der zyklischen Nukleotide führen zur Aktivierung der PKA und der Proteinkinase G (PKG). Diese Kinasen phosphorylieren eine Vielzahl an Substraten und Transkriptionsfaktoren, wodurch wiederum zahlreiche verschiedene zelluläre Prozesse reguliert werden (Card et al. 2004). Die im Zuge der Dezidualisierung gesteigerte Aktivierung der PKA sorgt für die Expression von cAMP-spezifischen PDEs (Gellersen und Brosens 2014), um somit hohen und langanhaltenden Steigerungen des intrazellulären cAMP-Levels entgegen zu wirken (Rosselli et al. 2021). Um die durch Forskolin-induzierte Dezidualisierung zu erhöhen, sollte hier durch die zusätzliche Gabe von PDE-Inhibitoren das intrazelluläre Level von cAMP gesteigert werden. Es zeigte sich, dass die Forskolin-induzierte Dezidualisierung signifikant durch die zusätzliche Gabe von PDE-Inhibitoren gesteigert werden konnte. Diese Steigerung wurde durch MPA weiter erhöht. Die Ergebnisse untermauern den Befund, dass das erhöhte intrazelluläre cAMP-Level benötigt wird um die Zelle für Progesteron zu sensibilisieren und den *cross-talk* beider Wege miteinander zu verstärken (Gellersen und Brosens 2003). In dieser Arbeit wurde mit dem PDE3-Inhibitor Milrinone und dem PDE4-Inhibitor Rolipram gearbeitet. Milrinone ist ein klinisch zugelassener PDE3-Inhibitor, welcher vor allem für Kurzzeittherapien von schweren Herzinsuffizienzen und zur Stabilisierung und Vorbereitung einer Herztransplantation Verwendung findet (Bender und Beavo 2006; Banner und Press 2009; Azevedo et al. 2014). Bei Rolipram handelt es sich um einen effektiven PDE4-Inhibitor, der vor allem die Isoformen PDE4B und 4D mit großer Affinität inhibiert (Card et al. 2004). Rolipram wurde bereits in verschiedenen Studien verwendet, welche sich mit anti-depressiven Wirkungen (Zeller et al. 1984), anti-inflammatorischen Effekten auf Multiple Sklerose (Bielekova et al. 2009) und schützenden Effekten nach Rückenmarksverletzungen (Schaal et al. 2012)

beschäftigten. Jedoch zeigten diese Studien starke Nebeneffekte von Rolipram, sodass dieser Wirkstoff klinisch nicht weiterentwickelt wurde (Tenor et al. 2011) und klinisch nicht zugelassen wurde (Azevedo et al. 2014). Allerdings kann dieser Wirkstoff zur Grundlagenforschung genutzt werden (Card et al. 2004).

In Kombination mit Forskolin führte die Behandlung der hESCs mit Rolipram generell zu einer deutlich höheren Prolaktinsekretion im Vergleich zu Milrinone, was auf einer stärkeren Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration beruhen könnte. Bartsch et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von hESCs mit Rolipram nach drei Tagen zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels führt, welches durch Progesteron gesteigert werden konnte (Bartsch und Ivell 2004). Eine Steigerung der Forskolin-induzierten intrazellulären cAMP-Produktion durch Milrinone wurde von Rosselli et al. an isolierten Zellen des *bovinen* Eileiters gezeigt, die jedoch geringer war als die durch den dort verwendeten PDE4-Inhibitor Ro-20-1724 (Rosselli et al. 2021). Somit zeigen sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in vorangegangenen Arbeiten PDE4-Inhibitoren einen stärkeren Effekt als PDE3-Inhibitoren. Nach Angaben des 'The Human Protein Atlas' (<https://www.proteinatlas.org/>) sind die PDE3-Isotypen gering bzw. kaum im weiblichen Reproduktionstrakt exprimiert, wohingegen die PDE4-Isotypen gesteigert vorkommen. In hESCs gilt PDE4 als wesentliche cAMP-spezifische Isoform (Gellersen und Brosens 2014) und eine gesteigerte Transkription der Isoform PDE4D konnte in 8-Br-cAMP-behandelten hESCs ermittelt werden (Bartsch und Ivell 2004). Hingegen werden die PDE3-Isotypen laut Literatur überwiegend in Fettgewebe, in der Leber sowie in Herz- und glatten Muskelzellen exprimiert (Bender und Beavo 2006; Keravis und Lugnier 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PDE3-Isoformen A und B auch in hESCs exprimiert werden und ihre Transkription nach einer Kombinationsbehandlung mit Forskolin, PDE-Inhibitoren und MPA signifikant anstieg, wobei es keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden Patientinnenkohorten gab. Die Transkription der PDE4-Isotypen B und D zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg nach Behandlung mit Forskolin alleine und in Kombination mit PDE-Inhibitoren mit/ohne MPA bei simultanem Anstieg der Prolaktinsekretion in den hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose. Laut Literatur führt die Induktion der Dezidualisierung von hESCs mit 8-Br-cAMP nach wenigen Stunden zu einem deutlichen Anstieg von PDE4D, wohingegen keine Erhöhung der anderen Isoformen erfolgt (Bartsch und Ivell 2004). Hierbei könnte die zeitliche Komponente eine Rolle spielen, da Bartsch et al.

Transkripte der PDE4-Isoformen nach 20 min und 4 h analysiert haben, hier in dieser Arbeit die Analyse jedoch nach 6 Tagen erfolgte. Zudem untersuchten Bartsch et al. die PDE-Transkription in den hESCs nur nach Behandlung mit 8-Br-cAMP, nicht aber wie in dieser Arbeit nach Behandlung mit PDE-Inhibitoren. Für PDE3 wurden bisher keine vergleichbaren Analysen in hESCs publiziert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Forskolin-induzierte Dezidualisierungsreaktion mit Hilfe von PDE-Inhibitoren gesteigert werden kann. Der simultane Anstieg der Transkription der untersuchten PDEs zeigt, dass der allgemeine Mechanismus der Zelle funktioniert, um einem dauerhaften gesteigerten cAMP-Signal entgegenzuwirken. Vor allem die Kombinationen mit Rolipram zeigten vielversprechende Ergebnisse, weshalb eine Kombination aus Rolipram, Forskolin und MPA für die weiterführenden *in vivo* Versuche ausgewählt wurde.

In der vorliegenden Arbeit reagierten die hESCs aller Patientinnen mit einer signifikant erhöhten Prolaktinsekretion nach Induktion der Dezidualisierung, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den hESCs der Kohorten ohne und mit Endometriose ermittelt werden konnte. Obwohl sich die Patientinnen, aus deren Gewebe die hESCs gewonnen wurden, hinsichtlich der Zyklusphase und dem Alter nicht unterschieden, zeigten in manchen Versuchsansätzen die hESCs der Patientinnen ohne Endometriose, in manchen die hESCs der Patientinnen mit Endometriose eine tendenziell höhere Prolaktinkonzentration im Zellüberstand. Da in den Versuchsreihen verschiedene Kohorten von hESCs verwendet wurden, weist dies auf inter-individuelle Unterschiede in der Reaktion auf die Induktion der Dezidualisierung hin, was bei der zukünftigen Entwicklung von Therapeutika nicht außer Acht gelassen werden sollte

4.5. Analyse von am Dezidualisierungsprozess-beteiligten Transkriptionsfaktoren

Ein spezifisches Markerprotein für eine erfolgreiche Dezidualisierung ist das Prolaktin (Telgmann und Gellersen 1998). Die Promotorregion des dezidualen Prolaktingens wird durch einen multimeren Transkriptionsfaktorkomplex aktiviert, welcher aus cAMP- und Progesteron-abhängigen Signalen zusammengesetzt ist. Hierbei induziert das erhöhte cAMP-Level die Expression verschiedener *downstream* Transkriptionsfaktoren in hESCs (Kajihara et al. 2013). Zu diesen

Transkriptionsfaktoren zählen u. a. CREB1, FOXO1, CEBP β und STAT5 (Gellersen und Brosens 2003; Kajihara et al. 2013; Joshi et al. 2020; Murata et al. 2022). Darüber hinaus wird der Faktor HAND2 in Zusammenhang mit der Progesterin-abhängigen Dezidualisierung hESCs gebracht (Okada et al. 2018; Murata et al. 2022). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Transkription dieser Faktoren bei Induktion der Dezidualisierung durch verschiedene Substanzen aktiviert wird.

Ein Transkriptionsfaktor, der bekanntermaßen durch das ansteigende cAMP-Level und der damit aktivierten katalytischen Einheit der PKA phosphoryliert wird, ist CREB1 (Christian et al. 2002a; Gellersen und Brosens 2003; Gellersen und Brosens 2014). CREB1 ist ein Leucizipper, der als Transkriptionsfaktor zusammen mit dem CRE modulator (CREM) und dem CREB binding protein (CBP) agieren kann und an das palindromische *cAMP response element* (CRE) in Promotorregionen bindet. Durch die Histonacetyltransferase-Aktivität von CBP wird die Chromatinkonformation moduliert, was die Transkriptionsinitiation erleichtert (Gellersen und Brosens 2014). Es ist bekannt, dass der deziduale Prolaktinpromotor eine mögliche CRE-Sequenz an Position -12 innehat und sich phosphoryliertes CREB1 bereits 30 min nach Stimulation des Signalweges auf die Transkription von CRE-enthaltenden Promotoren auswirkt (Telgmann et al. 1997; Gellersen und Brosens 2014). In hESCs wird CREB1 unabhängig des Differenzierungsstadiums exprimiert (Gellersen und Brosens 2014) und das Transkriptlevel bleibt auch während der Dezidualisierung konstant (Gellersen et al. 1997). Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, in der sich ein homogenes Transkriptionslevel von CREB1 in fast allen hESCs unabhängig von der Behandlung, zeigte. Allein die Kombination von Forskolin, Rolipram und MPA führte zu einem signifikanten Anstieg des CREB1 mRNA-Levels, die auch die stärkste funktionelle Dezidualisierung in Form einer gesteigerten Sekretion von Prolaktin bewirkte. Forskolin als Aktivator der Adenylatcyclase sowie der PDE-Inhibitor Rolipram sorgten für eine Steigerung des intrazellulären cAMP-Levels, was sich wiederum auf den PKA-Weg auswirken und so eine erhöhte Phosphorylierung von CREB1 zur Folge haben kann. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass der CREB1 Coaktivator CBP mit dem PR interagieren kann (Rowan 2000). Der transkriptionelle Coaktivator CBP hat nicht nur die Fähigkeit CREB1 zu binden, sondern auch mit verschiedenen Faktoren der basalen Transkriptionskomplexmaschinerie zu interagieren (Gellersen und Brosens 2003). Hierbei kann CBP auch mit CEBP β , einem wichtigen Mediator des cAMP-Signals in hESCs, zusammenwirken (Pohnke et al. 1999; Gellersen und

Brosens 2003). CEBP β gehört zu den Leucinzipper DNA-bindenden Proteinen und wird durch cAMP in hESCs induziert (Christian et al. 2002b; Gellersen und Brosens 2003; Maruyama und Yoshimura 2008). Es gilt als essentieller Faktor für die weibliche Reproduktion (Maruyama und Yoshimura 2008), kann den Prolaktin Promotor induzieren und so die Dezidualisierung voranbringen (Gellersen und Brosens 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den mit 8-Br-cAMP-inkubierten hESCs ein Anstieg der CEBP β -Transkription, welcher für hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose ähnlich war, jedoch stärkere Streuungen in der Endometriose Kohorte aufzeigte. Dass im eutopen Endometrium von Patientinnen mit Endometriose eine Transkription von CEBP β gefunden werden kann, wurde bereits in einer Studie von Yang et al. gezeigt, die eine mögliche Herunterregulation von CEBP β in ektopen endometrialen Läsionen, nicht aber im eutopen Endometrium der erkrankten Frauen zeigte (Yang 2002). Der in der vorliegenden Arbeit fehlende Effekt von Relaxin und hCG alleine oder in den unterschiedlichen Substanzkombinationen auf die Transkription von CEBP β in hESCs parallel zur fehlenden Prolaktinsekretion spricht dafür, dass hier die intrazelluläre cAMP-Konzentration noch nicht ausreichend war, um die Transkription von CEBP β zu induzieren und damit den Prozess der Dezidualisierung der hESCs anzustoßen. Im Gegensatz hierzu war nach Behandlung von Forskolin in Kombination mit PDE-Inhibitoren und MPA ein Anstieg der CEBP β -Transkription zu beobachten, der parallel zu einer Erhöhung der Prolaktinsekretion in diesen Zellen führte. Somit kann postuliert werden, dass CEBP β hier durch eine cAMP-Erhöhung induziert wurde und sich auf die Prolaktinsekretion auswirkt. Bei der transkriptionellen Aktivierung des dezidualen Prolaktinpromotors durch CEBP β (Pohnke et al. 1999), interagiert dieses mit weiteren Faktoren wie STAT5 und FOXO1 (Maruyama und Yoshimura 2008). STAT5 wird als Mitglied der STAT-Familie durch Phosphorylierung aktiviert, sodass es dimerisieren und in den Zellkern translozieren kann. Dort reguliert es verschiedene Wachstums- und Differenzierungsprozess-beteiligte Gene (Maruyama und Yoshimura 2008). Die *in vivo* Expression von STAT5 im humanen Endometrium ist auf die sekretorische Phase des Zyklus beschränkt (Mak et al. 2002), und eine Expression von STAT5 und dessen Phosphorylierung und Dimerisierung in hESCs führt zu einer gesteigerten Aktivität des dezidualen Prolaktinpromotors *in vitro* (Gellersen und Brosens 2003; Maruyama und Yoshimura 2008). Die Transkription von STAT5 in hESCs zeigte in dieser Arbeit einen signifikanten Anstieg durch die Inkubation mit 8-Br-cAMP, der sich durch die Zugabe

von Progestinen nicht steigern ließ. Hierbei wurde die Transkription von STAT5 durch die zusätzliche Inkubation mit MPA inhibiert, was gegenläufig zu der ermittelten Prolaktinsekretion in diesen Ansätzen war. Dagegen führte die Behandlung der hESCs mit Forskolin und MPA bei gesteigerten Prolaktinsekretionen parallel auch zu einer Erhöhung des Transkriptionslevels von STAT5. Studien von Mak et al. zeigten, dass im Zuge eines Dezidualisierungsstimulus mit 8-Br-cAMP plus MPA eine Phosphorylierung und nukleäre Translokation von STAT5 stattfindet, sodass sie rückschließen konnten, dass die Expression von STAT5 einen wichtigen Schritt während der Dezidualisierung darstellt (Mak et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkription von STAT5 im Zusammenhang mit einem erfolgreichen Dezidualisierungsstimulus und der daraus resultierenden Steigerung der Prolaktinsekretion stehen könnte. Wie oben beschrieben wirkt STAT5 zusammen mit CEBP β und FOXO1 auf die Regulation des Prolaktinpromotors. FOXO1 gehört zur Forkhead box class O-Familie, die als Transkriptionsfaktoren an zellulären Funktionen wie der Zellproliferation, der Apoptose und der Differenzierung beteiligt sind (Maruyama und Yoshimura 2008; Kajihara et al. 2013; Gellersen und Brosens 2014). Im humanen Endometrium wird FOXO1 deutlich während der Dezidualisierung hochreguliert (Gellersen und Brosens 2014) und gilt als ein früher Schlüsseltranskriptionsfaktor in diesem Prozess (Joshi et al. 2020). Dabei ist FOXO1 unabdingbar für die Induktion der meisten Dezidualisierungs-spezifischen Marker wie Prolaktin, IGFBP1 und WNT4 (Kajihara et al. 2013; Gellersen und Brosens 2014). *In vitro* wird die FOXO1-Expression in hESCs parallel zu CEBP β durch cAMP induziert (Gellersen und Brosens 2003). Diese cAMP-vermittelte Induktion der Dezidualisierung führte auch in der vorliegenden Arbeit zu einem signifikanten Anstieg der FOXO1-Transkription. Kaum Auswirkungen auf die FOXO1-Transkription zeigten die Behandlungen mit Relaxin oder hCG alleine oder in Kombination mit PDE-Inhibitoren, was der bereits für CEBP β - und STAT5-beobachteten Transkription entspricht und sich ebenfalls auch durch eine geringe Prolaktinkonzentration im Zellüberstand zeigte. Die kombinierte Behandlung von Forskolin und PDE-Inhibitoren führte hingegen zu einem deutlich stärkeren signifikanten Anstieg der FOXO1-Transkription und der Prolaktinkonzentration in den hESCs. Diese Ergebnisse unterstreichen den Einfluss des intrazellulär angestiegenen cAMP-Levels und die damit verbundene Auswirkungen auf FOXO1 und den Prolaktinpromotor. Bereits Labied et al. konnten zeigen, dass innerhalb von drei Tagen 8-Br-cAMP Behandlung sowohl die FOXO1 mRNA sowie das Protein hochreguliert werden. Dieser Effekt konnte deutlich durch

die Kombination des cAMP mit MPA erhöht werden, nicht aber durch MPA alleine (Labied et al. 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte die Zugabe von MPA bei den Inkubationen mit 8-Br-cAMP, Forskolin alleine und in Kombination mit PDE-Inhibitoren einen zusätzlichen Anstieg der FOXO1-Transkription sowie dessen Proteinexpression. Hierbei waren deutliche Unterschiede zwischen mRNA- und Proteinlevel zu erkennen. Auf Proteinebene wurde FOXO1 bei allen Behandlungen ähnlich exprimiert, während auf mRNA-Ebene deutlich höhere Werte in den Behandlungen mit Forskolin in Kombination mit PDE-Inhibitoren und MPA im Vergleich zu den alleinigen Behandlungen zu verzeichnen waren. Die Unterschiede zwischen mRNA- und Proteinlevel können verschiedene Gründe haben, wie post-transkriptionelle Regulationen und Halbwertszeit des Proteins (Greenbaum et al. 2003), aber auch *Proofreading* Mechanismen (Isken und Maquat 2007). Der steigernden Einfluss von MPA auf FOXO1 könnte darin begründet sein, dass hierdurch eine partielle Translokation und Akkumulation von FOXO1 in das Zytoplasma von dezidualisierenden hESCs stattfindet (Gellersen und Brosens 2014). Durch den Entzug der Progestine hingegen kommt es zu einer raschen nukleären Re-Lokalisation des Transkriptionsfaktors und einer gesteigerten Expression von pro-apoptotischen Genen gefolgt von einer erhöhten Apoptose in den dezidualisierenden hESCs (Brosens und Gellersen 2006). Somit kommt FOXO1 nicht nur eine Rolle in der Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes und Prolaktinsekretion zu, sondern auch in der Apoptoseregulation nach Progesteronentzug. Es ist bekannt, dass nur eine geringe Menge an FOXO1 Protein benötigt wird, um die Transkription von Dezidualisierung-spezifischen Faktoren wie Prolaktin zu erhöhen (Brosens und Gellersen 2006). Die Inhibition der transkriptionellen Aktivität von FOXO1 verbunden mit der zytoplasmatischen Speicherung des FOXO1 Proteins ist das Ergebnis von gezielten Phosphorylierungen. Diese MPA-vermittelten Phosphorylierungen sind abhängig von der PI3K/AKT-Aktivierung (Labied et al. 2006). Hierbei handelt es sich um einen autokrinen Effekt durch Progestine, da diese bekanntermaßen auch die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren in differenzierenden hESCs steigern, die den PI3K/AKT-Signalweg ansteuern (Labied et al. 2006). Das Signal durch Wachstumsfaktoren führt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zur Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase AKT (auch Proteinkinase B), die wiederum FOXO-Transkriptionsfaktoren phosphorylieren kann und Bindestellen für ein 14-3-3 Chaperon Protein generiert (Brosens und Gellersen 2006). Die Bindung durch das Chaperon sorgt für die Translokation des Transkriptionsfaktors vom Kern ins

Zytoplasma (Brosens und Gellersen 2006) und damit zu seiner Inaktivierung (Joshi et al. 2020). Die AKT-Proteinfamilie besteht aus den drei Isoformen AKT1-3, die eine hohe Sequenzhomologie sowie funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit zueinander aufweisen (Fabi und Asselin 2014). Fabi et al. zeigten in ihren Studien an immortalisierten humanen endometrialen Stromazellen, dass hier die Isoform AKT1 am stärksten exprimiert ist (Fabi et al. 2017), wie auch im eutopen Endometrium *in vivo* (*The Human Protein Atlas*). Daher wurde diese Isoform in der vorliegenden Arbeit untersucht. Tendenziell wurde AKT1 nur gering in den hESCs transkribiert, jedoch zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung mit Forskolin, Rolipram und MPA ein signifikanter Anstieg der AKT1-Transkription, parallel zu einer höheren FOXO1-Transkription sowie einer gesteigerten Prolaktinsekretion. Diese signifikante Erhöhung zeigte sich auf Proteinebene jedoch weder für AKT1 noch für seine phosphorylierte Form. Es ist bekannt, dass AKT1 die Phosphorylierung von FOXO1 beeinflussen kann (Klotz et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Phosphorylierung von FOXO1 in den hESCs nachgewiesen, die durch die unterschiedlichen Behandlungen jedoch nicht signifikant beeinflusst wurde. Fabi et al. hingegen zeigten, dass das AKT1 Protein sowie auch seine phosphorylierte Form unter dem Einfluss von 8-Br-cAMP plus MPA in immortalisierten hESCs reduziert wurde, bei gleichzeitig steigender FOXO1 Proteinexpression (Fabi et al. 2017). Dieser beobachtete Unterschied könnte dadurch bedingt sein, dass Fabi et al. immortalisierte hESCs verwendeten während in der vorliegenden Arbeit primäre hESCs von verschiedenen Patientinnen verwendet wurden. Primäre Zellen stammen direkt von entnommenem Gewebe ab und haben eine limitierte Lebensspanne in Kultur aufgrund ihrer replikativen Seneszenz. Darüber hinaus sind primäre Zellen im Gegensatz zu immortalisierten Zellen genetisch nicht modifiziert, sodass sie ihre genetische Integrität behalten (Pamies et al. 2018) und somit der *in vivo* Situation eher entsprechen. Ein signifikanter Unterschied der Regulation des AKT1 Proteins in den hESCs von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu denen von Frauen ohne Endometriose zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht. In der Literatur wird beschrieben, dass die Aktivierung des AKT-Weges in dezidualisierenden hESCs unterdrückt wird, jedoch im ektopen Endometrium gesteigert vorkommen und so die Dezidualisierung beeinträchtigen kann (Joshi et al. 2020). Da hier jedoch nur eutopes Endometrium untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass aus ektopen Läsionen isolierte endometriale Stromazellen eine abweichende Reaktion auf die untersuchten Behandlungen zeigen würden.

Neben den bereits genannten Transkriptionsfaktoren spielt auch der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor HAND2 eine Schlüsselrolle bei durch Progesterin-induzierten Dezidualisierung von hESCs (Okada et al. 2018; Fukuda et al. 2015) und ist in diesen Zellen auch entscheidend für die IL-15 Transkription (Murata et al. 2022). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die HAND2-Transkription nicht durch 8-Br-cAMP induziert werden konnte. Jedoch zeigten alle Behandlungen in denen das Progesterin MPA hinzugegeben wurde eine Steigerung der HAND2-Transkription im Vergleich zu den jeweilig zugehörigen Behandlungen ohne MPA. Dies entspricht Studien von Cho et al. die zeigten, dass das HAND2 mRNA-Level in hESCs durch die Behandlung mit MPA, nicht aber durch eine Behandlung mit 8-Br-cAMP erhöht wurde (Cho et al. 2013). Auch die alleinigen Behandlungen mit Forskolin, Milrinone oder Rolipram sowie die Kombination dieser Substanzen konnte die HAND2-Transkription im Gegensatz zu der zusätzlichen Inkubation MPA in diesen Substanzkombinationen nicht steigern. Das unterstreicht die Beobachtung, dass HAND2 nicht durch die Steigerung des intrazellulären cAMP-Levels reguliert wird, sondern ein durch Progesterin regulierter Faktor ist. Cho et al. zeigten in ihren Studien zudem, dass auch weitere Progesterine (Norethisteron, Levonorgestrel, Dienogest und Progesteron) zu einem Anstieg der HAND2-Transkription führten (Cho et al. 2013). Die Progesterin-induzierte HAND2-Expression in hESCs der Patientinnen mit Endometriose zeigte keine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den hESCs der Patientinnen ohne Endometriose. Kato et al. konnten in ihren Studien ebenso keine signifikanten Unterschiede in der HAND2-Expression in eutopem Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose ermitteln (Kato et al. 2019), jedoch war die Progesterin-induzierte HAND2-Transkription in endometriotischen Stromazellen im Vergleich zu aus dem eutopen Endometrium isolierten Stromazellen geringer (Kato et al. 2019). Verschiedene Studien zeigten, dass HAND2 die Expression des *fibroblast growth factors* (FGF) in hESCs während der Dezidualisierung inhibiert (Murata et al. 2019; Kato et al. 2019). Diese Faktoren sind in endometrialen und endometriotischen Stromazellen nach Zugabe von HAND2 small-interfering RNA (siRNA) hochreguliert, was eine Migration und Invasion von endometriotischen Stromazellen induziert (Kato et al. 2019). Somit kann sich für HAND2 eine entscheidende Rolle in der Invasionskapazität von endometriotischen Zellen ergeben (Kato et al. 2019). Darüber hinaus lässt sich durch Runterregulation von HAND2 mittels siRNA eine geschwächte morphologische Differenzierung sowie ein geringeres Prolaktin- und FOXO1-Level beobachten, was HAND2 eine entscheidende Rolle in der Dezidualisierung zukommen lässt (Shindoh et al. 2014).

An dem Prozess der Dezidualisierung sind eine Vielzahl von Faktoren beteiligt. Hierbei zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor HAND2 über ein Progesteron-abhängiges Signal reguliert wird, während die Transkriptionsfaktoren CREB1, CEBP β , STAT5 und FOXO1 vor allem über ein cAMP-Signal induziert werden. FOXO1 wies dabei die stärkste Reaktion auf und konnte noch weiter durch ein zusätzliches Progesteron-abhängiges Signal gesteigert werden, wobei hier Parallelen zu dem Anstieg des von den hESCs sezernierten Prolaktin gezeigt werden konnten. Eine mögliche Regulation von FOXO1 durch eine gesteigerte AKT1-Transkription konnten nicht beobachtet werden.

4.6. Induktion der Dezidualisierung von hESCs durch Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Der cAMP-Signalweg kann auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren angesteuert werden. Ein Ligand für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ist das humane Choriongonadotropin (hCG), eines der ersten Signale, das vom Embryo sezerniert wird (Tapia-Pizarro et al. 2017). Bei hCG handelt es sich um ein Glykoprotein, welches eine ähnliche Struktur und Funktion wie das luteinisierende Hormon (LH) aufweist (Hudelist et al. 2008). Beide Hormone können ihre biologische Funktion über denselben 7-Transmembran G-Protein-gekoppelten Rezeptor (LHCGR) auslösen, zur Aktivierung der Adenylatcyclase führen und damit zum Anstieg des cAMP-Levels in den Zellen beitragen (Hudelist et al. 2008; Sacchi et al. 2018). Auch wenn hCG vor allem den Rezeptor in gonadalen Zellen ansteuert, um die Steroidgenese zu stimulieren, wurde der Rezeptor auch in Gewebe außerhalb der Gonaden, wie dem Myometrium, dem Endometrium, der Dezidua, der Plazenta und den Einleitern detektiert (Hudelist et al. 2008). Tang et al. konnten zeigen, dass eine Inkubation mit hCG einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in hESCs bewirkt und darüber hinaus auch zu einer erhöhten Prolaktinkonzentration im Zellüberstand beiträgt und somit einen Effekt auf die Dezidualisierung von hESCs hat (Tang und Gorpide 1993). In der vorliegenden Arbeit führte die Inkubation von hESCs von Patientinnen mit und ohne Endometriose mit hCG jedoch kaum zu einer Induktion der Prolaktinsekretion, was sich auch durch die zusätzliche Gabe von MPA und PDE-Inhibitoren nicht steigern ließ. Der Unterschied zu den Ergebnissen von Tang et al. könnte darin begründet sein, dass diese dem Kulturmedium auch Insulin zugesetzt

hatten (Tang und Gurside 1993). Insulin könnte einen zusätzlichen Einfluss auf die Dezidualisierung der Zellen haben, da es das Potential hat u. a. Prolaktin hoch zu regulieren (Hirschberg et al. 2021). In den Studien von Han et al. wurde ebenfalls ein Effekt von hCG auf die Dezidualisierung von hESCs beschrieben. Zwar konnten sie keine funktionelle Differenzierung nach alleiniger hCG-Behandlung nachweisen, hCG konnte aber den Effekt von durch Östradiol- und Progesteron-induzierter Differenzierung nach 10 Tagen deutlich erhöhen (Han et al. 1999). Studien von Kasahara et al. stehen diesen Ergebnissen jedoch gegenüber, da sie inhibitorische Effekte von hCG auf die Östradiol- und Progesteron-induzierte Dezidualisierung von hESCs vermuteten (Kasahara et al. 2001).

Auch durch Relaxin konnte in dieser Arbeit kaum eine Prolaktinsekretion der hESCs induziert werden. Relaxin ist ein heterodimeres Peptidhormon mit strukturellen Homologien zu Insulin, was als Ligand eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, den Relaxinrezeptor (LGR7), auf die Zellen wirken kann (Bond et al. 2004). Sowohl Relaxin als auch sein Rezeptor werden im humanen Endometrium exprimiert, sodass potentiell die Förderung der Dezidualisierung der Stromazellen hierdurch möglich ist (Morelli et al. 2010; Tang et al. 2005). Zudem lässt sich die Expression des Relaxinrezeptors durch Progestine erhöhen, was einen möglichen synergistischen Effekt der Progestine und Relaxin sowie der G-Protein-gekoppelten Aktivitäten unterstreicht (Tang et al. 2005). In den Studien von Bartsch und Ivell konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration in hESCs nach Behandlung der Zellen mit Relaxin alleine erhöht ist und durch sowohl Progesteron als auch durch den PDE-Inhibitor Rolipram gesteigert werden kann (Bartsch und Ivell 2004). Zudem konnten sie einen Anstieg der Prolaktin-Transkription an Tag 3 in ihren Behandlungskombination aus Relaxin, Rolipram mit und ohne Progesteron zeigen (Bartsch und Ivell 2004; Bartsch et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Erhöhungen des Prolaktin Proteins durch die Behandlung mit Relaxin festgestellt. Im Unterschied zu der vorgenannten Arbeit wurde jedoch hier das Protein im Zellüberstand nach einer längeren Kulturdauer an Tag 6 analysiert und keine Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene durchgeführt. Hierbei ist außerdem zu bedenken, dass in der Studie von Bartsch et al. Insulin zu dem Kulturmedium zugesetzt wurde (Bartsch und Ivell 2004), was wie bereits weiter oben beschrieben wurde, eine Auswirkung auf die Induktion der Dezidualisierung haben könnte.

Die Forskolin-induzierte Erhöhung der Prolaktinsekretion konnte weder durch die Kombination mit hCG noch mit Relaxin bewirkt werden. In dieser Arbeit zeigten sich somit keine signifikanten Auswirkungen von hCG oder Relaxin auf die funktionelle Dezidualisierung der hESCs sowohl von Patientinnen mit als auch ohne Endometriose. Möglicherweise liegt eine Ursache hierfür darin, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor erst verzögert einsetzt. Für den hCG-Rezeptor LHCGR ist bekannt, dass er über das gekoppelte $G\alpha_s$ G-Protein die Adenylatcyclase ansteuert, welche dann wiederum cAMP generiert (Tapia-Pizarro et al. 2017; Mann et al. 2022). Der Relaxinrezeptor LGR7 wird ebenfalls mit einem $G\alpha_s$ gekoppeltem G-Protein beschrieben, da er in dauerhaft aktiven LGR7-Mutanten auch Liganden-unabhängig die cAMP-Produktion erhöht (Bartsch et al. 2004; Hsu et al. 2002). Auch wenn die Rezeptoren für hCG und Relaxin in hESCs exprimiert werden (Morelli et al. 2010; Dimitriadis et al. 2005; Bond et al. 2004; Hudelist et al. 2008; Tapia-Pizarro et al. 2017), kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die Rezeptormenge in den in der vorliegenden Studie verwendeten hESCs nicht ausreichte, um eine funktionelle Dezidualisierung auszulösen.

4.7. Induktion der Dezidualisierung im humanisierten Endometriose Mausmodell *in vivo*

Die Verwendung von *in vitro* Systemen ermöglicht einfache und schnelle Analysen der zellulären und molekularen Mechanismen im Zusammenhang mit einer Endometrioseerkrankung (Fan 2020; Grümmner 2012). Jedoch decken die *in vitro* Studien nicht die Komplexität von Organismen mit ihren systemischen Effekten von Substanzen ab (Grümmner 2012). Im Folgenden sollte daher die Wirkung der *in vitro* effektivsten Substanzkombinationen *in vivo* überprüft werden. Da die spontane peritoneale Endometriose überwiegend durch die Menstruation initiiert wird, ist das physiologische Vorkommen dieser Erkrankung auf Menschen und einige nicht-menschliche Primaten beschränkt (Grümmner et al. 2001). Zur Entwicklung von im Labor verfügbaren Tiermodellen wurden daher vor allem induzierte Endometriose Mausmodelle etabliert. Hierbei stellte das heterologe Mausmodell, in dem humanes endometriales Gewebe in die Bauchhöhle transplantiert wird, eine etablierte Methode zur Analyse von therapeutischen Strategien dar (Grümmner 2006). Dieses Modell wurde bereits in anderen Studien der Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt (Fechner et

al. 2007; Mönckedieck et al. 2009; Söhngen et al. 2014; Koch et al. 2018) und fand ebenfalls in der vorliegenden Arbeit Anwendung. Das humane endometriale Gewebe wurde in athymische Nacktmäuse (NMRI nude) transplantiert und die Mäuse systemisch mit den Substanzen behandelt, die sich zuvor in den *in vitro* Versuchen als geeignet erwiesen hatten. Bereits Koch et al. zeigten, dass die Dezidualisierung durch eine systemische Behandlung in ektopen humanen endometrialen Geweben erfolgreich im *in vivo* Endometriose Mausmodell ausgelöst werden kann. Dabei konnten sie eine gut erhaltene Morphologie in den transplantierten Fragmenten mit typischen von Stroma umgebene endometrialen Drüsen vorfinden (Koch et al. 2018). Das lässt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls erkennen. Die Morphologie der entnommenen transplantierten Gewebe war nach 7 Tagen mit gut erkennbarem Stroma, Drüsen und Drüsenepithel sowie teilweise sezernierenden Drüsen intakt. Obwohl zum Teil eine Erhöhung der untersuchten am Dezidualisierungsprozess beteiligten Transkriptionsfaktoren beobachtet wurde, ließen sich jedoch keine histomorphologisch deutlich identifizierbaren dezidualisierten Bereiche in den Geweben nach Behandlung mit den Testsubstanzen erkennen. Koch et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass eine Kombination von Forskolin und Progesteron zu einer Erhöhung des Transkriptionsfaktors FOXO1 und zu einer veränderten Morphologie mit dezidualisierten Bereichen und einer Erhöhung der Dezidualisierungsmarker Prolaktin und IGFBP-1 nach 7 Tagen führt. Zudem zeigten sie, dass die Induktion der Dezidualisierung nach Behandlung mit hCG und Progesteron signifikant stärker war als mit Forskolin und Progesteron (Koch et al. 2018). Diese Dezidualisierungsreaktion hielt auch nach 10 Tagen Behandlung mit hCG und Progesteron mit anschließendem Entzug der Substanzen für weitere 7 Tage an (Koch et al. 2018). Somit zeigte in dieser Arbeit Forskolin im Vergleich zu hCG eine geringere Induktion der Dezidualisierung *in vivo* (Koch et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Verstärkung des Dezidualisierungseffektes von Forskolin untersucht. Hier führte die kombinierte Behandlung mit Forskolin, Rolipram und MPA zu tendenziell stärkeren Erhöhungen Dezidualisierung-spezifischer Faktoren in dem transplantierten humanen Endometrium als eine alleinige Behandlung mit Forskolin. Dieser Effekt war *in vivo* jedoch deutlich schwächer als der zuvor *in vitro* beobachtete Effekt für diese Substanzkombination. Dies könnte darin begründet sein, dass die Substanzen *in vitro* unmittelbar auf die Stromazellen einwirken, für die systemische Wirkung im *in vivo* Modell der gewählte Zeitraum jedoch möglicherweise nicht ausreichend und hier eine längere Behandlungsdauer notwendig sein könnte, um eine funktionelle

Dezidualisierung zu induzieren. Zudem könnte die Versorgung der transplantierten Gewebe eine Rolle spielen. Auch wenn bereits nach 4 Tagen ein Einwachsen von murinen Blutgefäßen in die ektop transplantierten Fragmente erfolgt (Grümmer et al. 2001), könnte im hier durchgeführten Versuchszeitraum von 7 Tagen die Angiogenese noch nicht weit genug fortgeschritten gewesen sein, um eine ausreichende Versorgung der endometrialen Fragmente mit den Testsubstanzen zu gewährleisten. Darüber hinaus könnte es eine Rolle spielen, dass *in vitro* lediglich isolierte hESCs in einem zweidimensionalen Kultursystem verwendet wurden, während es sich *in vivo* um dreidimensionale Gewebefragmente handelte, die sowohl aus Stroma- als auch aus Epithelzellen bestehen. Aus der Literatur ist bekannt, dass in einem humanen Endometrium-ähnlichen 3D-Kultursystem der direkte Kontakt von Stroma- und Epithelzellen einen positiven Einfluss auf die Dezidualisierung haben kann (Wang et al. 2013). 2D-Zellkulturstudien in der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass Epithelzell-konditioniertes Medium einen tendenziell eher hemmenden Effekt auf die Dezidualisierung primärer hESCs von Patientinnen mit Endometriose hat (Schmidt 2022). Hierbei verwendeten Wang et al. eine immortalisierte Stromazelllinie für ihre Analysen (Wang et al. 2013), sodass der möglicherweise veränderte Metabolismus der Zelllinie zu diesen abweichenden Befunden beigetragen haben könnte. Da in unseren vorangegangenen 2D-Kulturen die Epithelzellen eher einen negativen Effekt auf die Dezidualisierung von hESCs hatten (Schmidt 2022), könnte in der vorliegenden Arbeit ein hemmender Effekt der Epithelzellen auch in den Geweben im *in vivo* Mausmodell, in denen sowohl Stroma als auch Epithelzellen vorhanden waren, eine Rolle spielen.

Koch et al. konnten in ihrer Arbeit einen stärkeren Anstieg der relativen Prolaktin- und FOXO1-Expression durch die kombinierte Behandlung mit Forskolin und Progesteron zeigen. Die in der Arbeit von Koch et al. verwendeten Mengen an Forskolin entsprach der in dieser Arbeit verwendeten Menge, jedoch verwendeten Koch et al. NOD/SCID Mäuse, während hier Nacktmäuse verwendet wurden (Koch et al. 2018). Nacktmäuse sind T-Zell defizient, wohingegen NOD/SCID Mäuse ein B-, T- und NK-Zell Defizit aufweisen (Belizario 2009). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in den Ergebnissen dieser Arbeit mit denen von Koch et al. im verwendeten Maussystem begründet liegen.

Auch in dem humanisierten *in vivo* Modell zeigten die implantierten ektopen Endometriumgewebe tendenziell eine beginnende Dezidualisierung, jedoch mit einer

starken Streuung in der Reaktion zwischen den Geweben der verschiedenen Patientinnen. Die Transkription der Dezidualisierungs-assoziierten Faktoren zeigte in den *in vivo* Versuchen deutlich stärkere inter-individuelle Unterschiede als in den *in vitro* Versuchen. Die Behandlungen wiesen für einzelne Patientinnengewebe ein Anstieg von Prolaktin auf, während für andere Patientinnen erhöhte Transkriptionen von FOXO1 und HAND2 erkennbar waren. Somit reagierten die Gewebe der verschiedenen Patientinnen unterschiedlich und zudem reagierte das Gewebe derselben Patientin nicht für alle untersuchten Faktoren gleich. Da anhand der histomorphologischen Kriterien alle transplantierten Ausgangsgewebe der sekretorischen Zyklusphase zugeordnet werden konnten, war die Zyklusphase des Endometriums zum Entnahmezeitpunkt nicht die Ursache für diese starken inter-individuellen Unterschiede bei den Analysen des humanen Endometriums. Die Überprüfung des Rezeptorstatus für den PR sowie GR ergab deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den einzelnen Patientinnen, jedoch ließ sich hier kein Zusammenhang der Stärke der Rezeptorexpression vor sowie der analysierten Faktoren nach der Transplantation erkennen. Insgesamt verdeutlichen die starken inter-individuellen Reaktionen das eine größere Fallzahl von primärem Patientinnengewebe untersucht werden muss, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Als *proof-of-principle* konnte hier jedoch demonstriert werden, dass die zuvor *in vitro* effektiven Testsubstanzen die Dezidualisierungsreaktion der hESCs auch *in vivo* einleiten können. Somit kann der synergistische Effekt unterschiedlicher Substanzen, die in die Induktionskaskade der Dezidualisierung eingreifen, zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen. Zudem kann die Analyse der Reaktion der Gewebe einzelner Patientinnen die Entwicklung individuell angepasster Therapien unterstützen.

4.8. Schlussfolgerung

Endometriale Stromazellen unterlaufen in der Lutealphase des Menstruationszyklus eine durch Progesteron-gesteuerte Differenzierung zu Deziduazellen. Eine zu schwache Dezidualisierungsreaktion könnte ein ursächlicher Faktor bei der Entstehung der Endometriose sein. Da dies bei Endometriosepatientinnen durch eine Progesteronresistenz verursacht werden könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit zur

Verstärkung der Dezidualisierungsreaktion zusätzlich der cAMP-Signalweg vergleichend in endometrialen Stromazellen von Patientinnen mit und ohne Endometriose angesteuert. In *in vitro* Versuchen mit aus dem Endometrium beider Patientinnenkohorten isolierten Stromazellen (hESCs) konnte gezeigt werden, dass die Dezidualisierung in beiden Versuchsgruppen kaum durch Progestine oder Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, aber erfolgreich durch die Inkubation mit 8-Br-cAMP und in deutlich geringerem Maße durch den Adenylatcyclaseaktivator Forskolin induziert werden konnte. Es konnte hier jedoch gezeigt werden, dass die Wirkung des Forskolins durch die zusätzliche Gabe von PDE-Inhibitoren signifikant und durch das Progestin MPA noch weiter erhöht werden konnte. Die hESCs von Patientinnen mit Endometriose zeigten hierbei sogar eine höhere Prolaktinsekretion als Marker für eine funktionelle Dezidualisierung als die der Patientinnen ohne Endometriose. Die Steigerung der Prolaktinsekretion ging für beide Patientinnenkohorten mit einem simultanen Anstieg Dezidualisierungs-assoziiierter Transkriptionsfaktoren einher. Die *in vitro* effektivste Substanzkombination aus Forskolin, Rolipram und MPA zeigte in einem humanisierten Endometriose Mausmodell *in vivo* nach 6 Tagen Behandlung eine schwache Induktion der am Dezidualisierungsprozess beteiligten Transkriptionsfaktoren mit starken individuellen Unterschieden. Für eine Induktion der Dezidualisierung bereits existenter ektopter Läsionen *in vivo* ist möglicherweise eine längere Behandlungsdauer notwendig. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen von Patientinnen mit Endometriose erfolgreich durch die Aktivierung des cAMP-Signalweges induziert werden und dass man sich Synergien unterschiedlicher Substanzen zunutze machen kann, die auf unterschiedlichen Wegen den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen. Das kann zur Entwicklung personalisierter Therapieansätze für die Endometriose genutzt werden, indem zum einen die Dezidualisierung während der Lutealphase gefördert werden kann, sodass nur differenzierte Endometriumzellen durch eine retrograde Menstruation in die Bauchhöhle gelangen, zum anderen könnten bereits existente Läsionen zur Differenzierung angeregt werden. Ziel wäre es, dass die in den Läsionen ausgelöste Dezidualisierung letztlich zum Absterben des ektopten Endometriumgewebes führen würde.

Literaturverzeichnis

Ahn, Soo Hyun; Monsanto, Stephany P.; Miller, Caragh; Singh, Sukhbir S.; Thomas, Richard; Tayade, Chandrakant (2015): Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. In: *BioMed research international* 2015, S. 795976. DOI: 10.1155/2015/795976.

Ahn, Soo Hyun; Singh, Vinay; Tayade, Chandrakant (2017): Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. In: *Fertility and sterility* 107 (3), S. 523–532. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.009.

American Society for Reproductive Medicine (1997): Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. In: *Fertility and sterility* 67 (5), S. 817–821. DOI: 10.1016/s0015-0282(97)81391-x.

Andrews, Mason C.; Andrews, William C.; Strauss, Arnold F. (1959): Effects of Progestin-Induced Pseudopregnancy on Endometriosis: Clinical and Microscopic Studies**Presented at the Twenty-first Annual Meeting of the South Atlantic Association of Obstetricians and Gynecologists, Roanoke, Va., Feb. 4-7, 1959. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 78 (4), S. 776–785. DOI: 10.1016/S0002-9378(16)36574-7.

Attia, G. R. (2000): Progesterone Receptor Isoform A But Not B Is Expressed in Endometriosis. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (8), S. 2897–2902. DOI: 10.1210/jc.85.8.2897.

Azevedo, Monalisa F.; Faucz, Fabio R.; Bimpaki, Eirini; Horvath, Anelia; Levy, Isaac; Alexandre, Rodrigo B. de et al. (2014): Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). In: *Endocrine reviews* 35 (2), S. 195–233. DOI: 10.1210/er.2013-1053.

Bamberger, A. M.; Milde-Langosch, K.; Löning, T.; Bamberger, C. M. (2001): The glucocorticoid receptor is specifically expressed in the stromal compartment of the human endometrium. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (10), S. 5071–5074. DOI: 10.1210/jcem.86.10.8101.

Banner, Katharine H.; Press, Neil J. (2009): Dual PDE3/4 inhibitors as therapeutic agents for chronic obstructive pulmonary disease. In: *British journal of pharmacology* 157 (6), S. 892–906. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00170.x.

Bartsch, Olaf; Bartlick, Bettina; Ivell, Richard (2004): Phosphodiesterase 4 inhibition synergizes with relaxin signaling to promote decidualization of human endometrial stromal cells. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (1), S. 324–334. DOI: 10.1210/jc.2003-030498.

Bartsch, Olaf; Ivell, Richard (2004): Relaxin and phosphodiesterases collaborate during decidualization. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030, S. 479–492. DOI: 10.1196/annals.1329.060.

Becker, Christian M.; Bokor, Attila; Heikinheimo, Oskari; Horne, Andrew; Jansen, Femke; Kiesel, Ludwig et al. (2022): ESHRE guideline: endometriosis. In: *Human reproduction open* 2022 (2), hoac009. DOI: 10.1093/hropen/hoac009.

- Belizario**, Jose E. (2009): Immunodeficient Mouse Models: An Overview. In: *TOIJ* 2 (1), S. 79–85. DOI: 10.2174/1874226200902010079.
- Bender**, Andrew T.; Beavo, Joseph A. (2006): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. In: *Pharmacol Rev* 58 (3), S. 488–520. DOI: 10.1124/pr.58.3.5.
- Berthois**, Y.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. (1986): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (8), S. 2496–2500. DOI: 10.1073/pnas.83.8.2496.
- Bielekova**, Bibiana; Richert, Nancy; Howard, Thomas; Packer, Amy N.; Blevins, Gregg; Ohayon, Joan et al. (2009): Treatment with the phosphodiesterase type-4 inhibitor rolipram fails to inhibit blood--brain barrier disruption in multiple sclerosis. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 15 (10), S. 1206–1214. DOI: 10.1177/1352458509345903.
- Bond**, Courtney P.; Parry, Laura J.; Samuel, Chrishan S.; Gehring, Helen M.; Lederman, Fiona L.; Rogers, Peter A. W.; Summers, Roger J. (2004): Increased expression of the relaxin receptor (LGR7) in human endometrium during the secretory phase of the menstrual cycle. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (7), S. 3477–3485. DOI: 10.1210/jc.2003-030798.
- Brar**, A. K.; Frank, G. R.; Kessler, C. A.; Cedars, M. I.; Handwerger, S. (1997): Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. In: *Endocrine* 6 (3), S. 301–307. DOI: 10.1007/BF02820507.
- Brichant**, Geraldine; Laraki, Ines; Henry, Laurie; Munaut, Carine; Nisolle, Michelle (2021): New Therapeutics in Endometriosis: A Review of Hormonal, Non-Hormonal, and Non-Coding RNA Treatments. In: *International journal of molecular sciences* 22 (19). DOI: 10.3390/ijms221910498.
- Brosens**, J. J.; Gellersen, B. (2006): Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. In: *Journal of molecular endocrinology* 36 (3), S. 389–398. DOI: 10.1677/jme.1.02060.
- Brosens**, J. J.; Hayashi, N.; White, J. O. (1999): Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. In: *Endocrinology* 140 (10), S. 4809–4820. DOI: 10.1210/endo.140.10.7070.
- Brown**, Julie; Crawford, Tineke J.; Allen, Claire; Hopewell, Sally; Prentice, Andrew (2017): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 1, CD004753. DOI: 10.1002/14651858.CD004753.pub4.
- Bulletti**, Carlo; Coccia, Maria Elisabetta; Battistoni, Silvia; Borini, Andrea (2010): Endometriosis and infertility. In: *Journal of assisted reproduction and genetics* 27 (8), S. 441–447. DOI: 10.1007/s10815-010-9436-1.
- Bulun**, Serdar E. (2009): Endometriosis. In: *The New England journal of medicine* 360 (3), S. 268–279. DOI: 10.1056/NEJMra0804690.

- Bulun**, Serdar E.; Monsavais, Diana; Pavone, Mary Ellen; Dyson, Matthew; Xue, Qing; Attar, Erkut et al. (2012): Role of estrogen receptor- β in endometriosis. In: *Seminars in reproductive medicine* 30 (1), S. 39–45. DOI: 10.1055/s-0031-1299596.
- Card**, Graeme L.; England, Bruce P.; Suzuki, Yoshihisa; Fong, Daniel; Powell, Ben; Lee, Byunghun et al. (2004): Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases. In: *Structure (London, England : 1993)* 12 (12), S. 2233–2247. DOI: 10.1016/j.str.2004.10.004.
- Chishima**, Fumihisa; Hayakawa, Satoshi; Sugita, Kenji; Kinukawa, Noriko; Aleemuzzaman, Sheike; Nemoto, Norimichi et al. (2002): Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 48 (1), S. 50–56. DOI: 10.1034/j.1600-0897.2002.01101.x.
- Cho**, Hisayuu; Okada, Hidetaka; Tsuzuki, Tomoko; Nishigaki, Akemi; Yasuda, Katsuhiko; Kanzaki, Hideharu (2013): Progesterin-induced heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 is associated with fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. In: *Fertility and sterility* 99 (1), 248-255.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.056.
- Christian**, Mark; Mak, Ian; White, John O.; Brosens, Jan J. (2002a): Mechanisms of decidualization. In: *Reproductive BioMedicine Online* 4, S. 24–30. DOI: 10.1016/S1472-6483(12)60112-6.
- Christian**, Mark; Zhang, Xiaohui; Schneider-Merck, Tanja; Unterman, Terry G.; Gellersen, Birgit; White, John O.; Brosens, Jan J. (2002b): Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (23), S. 20825–20832. DOI: 10.1074/jbc.M201018200.
- Cloke**, Brianna; Huhtinen, Kaisa; Fusi, Luca; Kajihara, Takeshi; Yliheikkilä, Maria; Ho, Ka-Kei et al. (2008): The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium. In: *Endocrinology* 149 (9), S. 4462–4474. DOI: 10.1210/en.2008-0356.
- Critchley**, Hilary O. D.; Saunders, Philippa T. K. (2009): Hormone receptor dynamics in a receptive human endometrium. In: *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 16 (2), S. 191–199. DOI: 10.1177/1933719108331121.
- D'Hooghe**, Thomas M.; Debrock, Sophie (2002): Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. In: *Human reproduction update* 8 (1), S. 84–88. DOI: 10.1093/humupd/8.1.84.
- D'Hooghe**, Thomas M.; Kyama, C.; Debrock, S.; Meuleman, C.; Mwenda, Jason M. (2004): Future directions in endometriosis research. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1034, S. 316–325. DOI: 10.1196/annals.1335.034.
- Dimitriadis**, E.; Stoikos, C.; Baca, M.; Fairlie, W. D.; McCoubrie, J. E.; Salamonsen, L. A. (2005): Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (6), S. 3458–3465. DOI: 10.1210/jc.2004-1014.

- Donnez**, Jacques; Dolmans, Marie-Madeleine (2021): GnRH Antagonists with or without Add-Back Therapy: A New Alternative in the Management of Endometriosis? In: *International journal of molecular sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222111342.
- Dunn**, Carolyn L.; Kelly, Rodney W.; Critchley, Hilary O. D. (2003): Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. In: *Reproductive BioMedicine Online* 7 (2), S. 151–161. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)61745-2.
- Fabi**, François; Asselin, Eric (2014): Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 148 (5), R85-95. DOI: 10.1530/REP-14-0270.
- Fabi**, François; Grenier, Kathy; Parent, Sophie; Adam, Pascal; Tardif, Laurence; Leblanc, Valérie; Asselin, Eric (2017): Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. In: *PloS one* 12 (5), e0177387. DOI: 10.1371/journal.pone.0177387.
- Falcone**, Tommaso; Flyckt, Rebecca (2018): Clinical Management of Endometriosis. In: *Obstetrics and gynecology* 131 (3), S. 557–571. DOI: 10.1097/AOG.0000000000002469.
- Fan**, Hongjie (2020): In-vitro models of human endometriosis. In: *Experimental and therapeutic medicine* 19 (3), S. 1617–1625. DOI: 10.3892/etm.2019.8363.
- Farage**, Miranda A.; Neill, Sallie; MacLean, Allan B. (2009): Physiological changes associated with the menstrual cycle: a review. In: *Obstetrical & gynecological survey* 64 (1), S. 58–72. DOI: 10.1097/OGX.0b013e3181932a37.
- Fechner**, Sabine; Husen, Bettina; Thole, Hubert; Schmidt, Markus; Gashaw, Isabella; Kimmig, Rainer et al. (2007): Expression and regulation of estrogen-converting enzymes in ectopic human endometrial tissue. In: *Fertility and sterility* 88 (4 Suppl), S. 1029–1038. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.153.
- Feil**, P. D.; Miljković, M.; Bardin, C. W. (1976): Medroxyprogesterone acetate: a steroid with potent progestational activity but low receptor affinity in the guinea pig uterus. In: *Endocrinology* 98 (6), S. 1508–1515. DOI: 10.1210/endo-98-6-1508.
- Fowler**, D. J.; Nicolaidis, K. H.; Miell, J. P. (2000): Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. In: *Human reproduction update* 6 (5), S. 495–504. DOI: 10.1093/humupd/6.5.495.
- Fraser**, Ian S. (2008): Recognising, understanding and managing endometriosis. In: *Journal of human reproductive sciences* 1 (2), S. 56–64. DOI: 10.4103/0974-1208.44112.
- Freeman**, M. E.; Kanyicska, B.; Lerant, A.; Nagy, G. (2000): Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. In: *Physiological reviews* 80 (4), S. 1523–1631. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.4.1523.
- Fukuda**, Tomohiko; Shirane, Akira; Wada-Hiraike, Osamu; Oda, Katsutoshi; Tanikawa, Michihiro; Sakuabashi, Ayako et al. (2015): HAND2-mediated proteolysis negatively regulates the function of estrogen receptor α . In: *Molecular medicine reports* 12 (4), S. 5538–5544. DOI: 10.3892/mmr.2015.4070.

- Gellersen, B.; Brosens, J. (2003):** Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. In: *The Journal of endocrinology* 178 (3), S. 357–372. DOI: 10.1677/joe.0.1780357.
- Gellersen, B.; Kempf, R.; Telgmann, R. (1997):** Human endometrial stromal cells express novel isoforms of the transcriptional modulator CREM and up-regulate ICER in the course of decidualization. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (1), S. 97–113. DOI: 10.1210/mend.11.1.9875.
- Gellersen, Birgit; Brosens, Ivo A.; Brosens, Jan J. (2007):** Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. In: *Seminars in reproductive medicine* 25 (6), S. 445–453. DOI: 10.1055/s-2007-991042.
- Gellersen, Birgit; Brosens, Jan J. (2014):** Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. In: *Endocrine reviews* 35 (6), S. 851–905. DOI: 10.1210/er.2014-1045.
- Gemmell, L. C.; Webster, K. E.; Kirtley, S.; Vincent, K.; Zondervan, K. T.; Becker, C. M. (2017):** The management of menopause in women with a history of endometriosis: a systematic review. In: *Human reproduction update* 23 (4), S. 481–500. DOI: 10.1093/humupd/dmx011.
- Ghatge, Radhika P.; Jacobsen, Britta M.; Schittone, Stephanie A.; Horwitz, Kathryn B. (2005):** The progestational and androgenic properties of medroxyprogesterone acetate: gene regulatory overlap with dihydrotestosterone in breast cancer cells. In: *Breast cancer research : BCR* 7 (6), R1036-50. DOI: 10.1186/bcr1340.
- Giudice, Linda C. (2010):** Clinical practice. Endometriosis. In: *The New England journal of medicine* 362 (25), S. 2389–2398. DOI: 10.1056/NEJMcp1000274.
- Giudice, Linda C.; Evers, Johannes L. H.; Healy, David Lindsay (Hg.) (2012):** Endometriosis. Science and practice. [Hoboken, New Jersey]: John Wiley & Sons.
- Greenbaum, Dov; Colangelo, Christopher; Williams, Kenneth; Gerstein, Mark (2003):** Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. In: *Genome biology* 4 (9), S. 117. DOI: 10.1186/gb-2003-4-9-117.
- Greene, Alexis D.; Lang, Stephanie A.; Kendzioriski, Jessica A.; Sroga-Rios, Julie M.; Herzog, Thomas J.; Burns, Katherine A. (2016):** Endometriosis: where are we and where are we going? In: *Reproduction (Cambridge, England)* 152 (3), R63-78. DOI: 10.1530/REP-16-0052.
- Grümmer (2006):** Animal models in endometriosis research. In: *undefined*. Online verfügbar unter <https://www.semanticscholar.org/paper/Animal-models-in-endometriosis-research.-Gr%C3%BCmmer/59ea132a4236ae4eab776912bfd14d4d3b2fe22e>.
- Grümmer, R.; Schwarzer, F.; Bainczyk, K.; Hess-Stumpp, H.; Regidor, P. A.; Schindler, A. E.; Winterhager, E. (2001):** Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 16 (8), S. 1736–1743. DOI: 10.1093/humrep/16.8.1736.
- Grümmer, Ruth (2012):** Models of Endometriosis: In vitro and In vivo Models. In: Linda C. Giudice, Johannes L. H. Evers und David Lindsay Healy (Hg.): Endometriosis. Science and practice. [Hoboken, New Jersey]: John Wiley & Sons, S. 263–269.

- Guo**, Sun-Wei (2009): Recurrence of endometriosis and its control. In: *Human reproduction update* 15 (4), S. 441–461. DOI: 10.1093/humupd/dmp007.
- Han**, S. W.; Lei, Z. M.; Rao, Ch.V. (1999): Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into decidua. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 147 (1-2), S. 7–16. DOI: 10.1016/S0303-7207(98)00240-8.
- Harris**, Don N.; Chasin, Mark; Phillips, Marie B.; Goldenberg, Harold; Samaniego, Sylvia; Hess, Sidney M. (1973): Effect of cyclic nucleotides on activity of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase. In: *Biochemical Pharmacology* 22 (2), S. 221–228. DOI: 10.1016/0006-2952(73)90275-X.
- Hassan**, Memy H.; Othman, Essam E.; Hornung, Daniela; Al-Hendy, Ayman (2009): Gene therapy of benign gynecological diseases. In: *Advanced drug delivery reviews* 61 (10), S. 822–835. DOI: 10.1016/j.addr.2009.04.023.
- Hawkins**, Shannon M.; Matzuk, Martin M. (2008): The menstrual cycle: basic biology. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1135, S. 10–18. DOI: 10.1196/annals.1429.018.
- Hirschberg**, Angelica Lindén; Jakson, Ivika; Graells Brugalla, Carlota; Salamon, Daniel; Ujvari, Dorina (2021): Interaction between insulin and androgen signalling in decidualization, cell migration and trophoblast invasion in vitro. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 25 (20), S. 9523–9532. DOI: 10.1111/jcmm.16892.
- Houerman**, V. L.; Todd, H.; Hertelendy, F. (1989): Progesterone treatment in vitro enhances prostaglandin E and forskolin-promoted cyclic AMP production in human endometrial stromal cells. In: *Journal of reproduction and fertility* 85 (1), S. 195–202. DOI: 10.1530/jrf.0.0850195.
- Hsu**, Sheau Yu; Nakabayashi, Koji; Nishi, Shinya; Kumagai, Jin; Kudo, Masataka; Sherwood, O. David; Hsueh, Aaron J. W. (2002): Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. In: *Science (New York, N.Y.)* 295 (5555), S. 671–674. DOI: 10.1126/science.1065654.
- Hudelist**, Gernot; Huber, Ambros; Knoefler, Martin; Haider, Sandra; Kolbus, Andrea; Czerwenka, Klaus et al. (2008): beta-HCG/LH receptor (beta-HCG/LH-R) expression in eutopic endometrium and endometriotic implants: evidence for beta-HCG sensitivity of endometriosis. In: *Reprod. Sci.* 15 (6), S. 543–551. DOI: 10.1177/1933719108316907.
- Hwang**, Jung Hye; Park, Moon Il; Hwang, Youn Young; Yoo, Hyung Jin; Mardon, Helen J. (2002): The characteristics of integrins expression in decidualized human endometrial stromal cell induced by 8-Br-cAMP in vitro. In: *Experimental & molecular medicine* 34 (3), S. 194–200. DOI: 10.1038/emm.2002.28.
- Isken**, Olaf; Maquat, Lynne E. (2007): Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. In: *Genes & development* 21 (15), S. 1833–1856. DOI: 10.1101/gad.1566807.
- Jain**, Varsha; Chodankar, Rohan R.; Maybin, Jacqueline A.; Critchley, Hilary O. D. (2022): Uterine bleeding: how understanding endometrial physiology underpins menstrual health. In: *Nature reviews. Endocrinology* 18 (5), S. 290–308. DOI: 10.1038/s41574-021-00629-4.

- Joshi**, Niraj; Su, Ren-Wei; Fazleabas, Asgerally (2020): Gene Expression in Endometriosis. In: Joanne Kwak-Kim (Hg.): Endometrial Gene Expression. Cham: Springer International Publishing, S. 159–180.
- Kajihara**, Takeshi; Brosens, Jan J.; Ishihara, Osamu (2013): The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. In: *Medical molecular morphology* 46 (2), S. 61–68. DOI: 10.1007/s00795-013-0018-z.
- Kajihara**, Takeshi; Tanaka, Kayoko; Oguro, Tatsuo; Tochigi, Hiden; Prechapanich, Japarath; Uchino, Satomi et al. (2014): Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. In: *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 21 (3), S. 372–380. DOI: 10.1177/1933719113497280.
- Kajihara**, Takeshi; Tochigi, Hiden; Prechapanich, Japarath; Uchino, Satomi; Itakura, Atsuo; Brosens, Jan J.; Ishihara, Osamu (2012): Androgen signaling in decidualizing human endometrial stromal cells enhances resistance to oxidative stress. In: *Fertility and sterility* 97 (1), S. 185–191. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.10.017.
- Kalaitzopoulos**, Dimitrios Rafail; Samartzis, Nicolas; Kolovos, Georgios N.; Mareti, Evangelia; Samartzis, Eleftherios Pierre; Eberhard, Markus et al. (2021): Treatment of endometriosis: a review with comparison of 8 guidelines. In: *BMC women's health* 21 (1), S. 397. DOI: 10.1186/s12905-021-01545-5.
- Kapoor**, Radhika; Stratopoulou, Christina Anna; Dolmans, Marie-Madeleine (2021): Pathogenesis of Endometriosis: New Insights into Prospective Therapies. In: *International journal of molecular sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222111700.
- Kasahara**, K.; Takakura, K.; Takebayashi, K.; Kimura, F.; Nakanishi, K.; Noda, Y. (2001): The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells in vitro. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (3), S. 1281–1286. DOI: 10.1210/jcem.86.3.7281.
- Kato**, Nao; Iwase, Akira; Ishida, Chiharu; Nagai, Takashi; Mori, Masahiko; Bayasula et al. (2019): Upregulation of Fibroblast Growth Factors Caused by Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2 Suppression in Endometriotic Cells: A Possible Therapeutic Target in Endometriosis. In: *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 26 (7), S. 979–987. DOI: 10.1177/1933719118802053.
- Kavitha**, C.; Rajamani, K.; Vadivel, E. (2010): *Coleus forskohlii* - a comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. In: *JMPR* 4, S. 278–285.
- Keravis**, Thérèse; Lugnier, Claire (2012): Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. In: *British journal of pharmacology* 165 (5), S. 1288–1305. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01729.x.
- Kim**, J. J.; Buzzio, O. L.; Li, S.; Lu, Z. (2005): Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. In: *Biology of reproduction* 73 (4), S. 833–839. DOI: 10.1095/biolreprod.105.043182.

- Klemmt**, Petra A. B.; Carver, Janet G.; Kennedy, Stephen H.; Koninckx, Philippe R.; Mardon, Helen J. (2006): Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. In: *Fertility and sterility* 85 (3), S. 564–572. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.046.
- Klotz**, Lars-Oliver; Sánchez-Ramos, Cristina; Prieto-Arroyo, Ignacio; Urbánek, Pavel; Steinbrenner, Holger; Monsalve, Maria (2015): Redox regulation of FoxO transcription factors. In: *Redox biology* 6, S. 51–72. DOI: 10.1016/j.redox.2015.06.019.
- Koch**, Yvonne; Wimberger, Pauline; Grümmer, Ruth (2018): Human chorionic gonadotropin induces decidualization of ectopic human endometrium more effectively than forskolin in an in-vivo endometriosis model. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 243 (11), S. 953–962. DOI: 10.1177/1535370218782658.
- Kuroda**, Keiji; Venkatakrisnan, Radha; Salker, Madhuri S.; Lucas, Emma S.; Shaheen, Fozia; Kuroda, Masako et al. (2013): Induction of 11 β -HSD 1 and activation of distinct mineralocorticoid receptor- and glucocorticoid receptor-dependent gene networks in decidualizing human endometrial stromal cells. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 27 (2), S. 192–202. DOI: 10.1210/me.2012-1247.
- Labied**, Soraya; Kajihara, Takeshi; Madureira, Patricia A.; Fusi, Luca; Jones, Marius C.; Higham, Jenny M. et al. (2006): Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. In: *Molecular Endocrinology* 20 (1), S. 35–44. DOI: 10.1210/me.2005-0275.
- Laemmli**, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Larsson**, Anders; Palm, Maria; Basu, Samar; Axelsson, Ove (2013): Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) during normal pregnancy. In: *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 29 (2), S. 129–132. DOI: 10.3109/09513590.2012.730574.
- Logan**, Philip C.; Steiner, Michael; Ponnampalam, Anna P.; Mitchell, Murray D. (2012): Cell cycle regulation of human endometrial stromal cells during decidualization. In: *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 19 (8), S. 883–894. DOI: 10.1177/1933719112438447.
- Louw-du Toit**, Renate; Hapgood, Janet P.; Africander, Donita (2020): A direct comparison of the transcriptional activities of progestins used in contraception and menopausal hormone therapy via the mineralocorticoid receptor. In: *Biochemical and biophysical research communications* 526 (2), S. 466–471. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.100.
- Macer**, Matthew Latham; Taylor, Hugh S. (2012): Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. In: *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 39 (4), S. 535–549. DOI: 10.1016/j.ogc.2012.10.002.
- Mahmood**, T. A.; Templeton, A. (1990): Pathophysiology of mild endometriosis: review of literature. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 5 (7), S. 765–784. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137184.
- Mak**, I. Y. H.; Brosens, J. J.; Christian, M.; Hills, F. A.; Chamley, L.; Regan, L.; White, J. O. (2002): Regulated expression of signal transducer and activator of transcription,

Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in vitro. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87 (6), S. 2581–2588. DOI: 10.1210/jcem.87.6.8576.

Malvezzi, Helena; Marengo, Eliana Blini; Podgaec, Sérgio; Piccinato, Carla de Azevedo (2020): Endometriosis: current challenges in modeling a multifactorial disease of unknown etiology. In: *Journal of translational medicine* 18 (1), S. 311. DOI: 10.1186/s12967-020-02471-0.

Mann, O. N.; Kong, C-S; Lucas, E. S.; Brosens, J. J.; Hanyaloglu, A. C.; Brighton, P. J. (2022): Expression and function of the luteinizing hormone choriogonadotropin receptor in human endometrial stromal cells. In: *Scientific reports* 12 (1), S. 8624. DOI: 10.1038/s41598-022-12495-9.

Marquardt, Ryan M.; Kim, Tae Hoon; Shin, Jung-Ho; Jeong, Jae-Wook (2019): Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? In: *International journal of molecular sciences* 20 (15). DOI: 10.3390/ijms20153822.

Martins, R.; Queiroz, J. A.; Sousa, F. (2013): New approach in RNA quantification using arginine-affinity chromatography: potential application in eukaryotic and chemically synthesized RNA. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (27), S. 8849–8858. DOI: 10.1007/s00216-013-7334-y.

Maruyama, Tetsuo; Yoshimura, Yasunori (2008): Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. In: *Endocrine journal* 55 (5), S. 795–810. DOI: 10.1507/endocrj.k08e-067.

Matsuoka, Aki; Kizuka, Fumie; Lee, Lifa; Tamura, Isao; Taniguchi, Ken; Asada, Hiromi et al. (2010): Progesterone Increases Manganese Superoxide Dismutase Expression via a cAMP-Dependent Signaling Mediated by Noncanonical Wnt5a Pathway in Human Endometrial Stromal Cells. In: *Endocrinology* 151 (9), S. 4594–4595. DOI: 10.1210/endo.151.9.9995.

Matsuura, K.; Ohtake, H.; Katabuchi, H.; Okamura, H. (1999): Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. In: *Gynecologic and obstetric investigation* 47 Suppl 1, 18-20; discussion 20-2. DOI: 10.1159/000052855.

Maybin, Jacqueline A.; Critchley, Hilary O. D. (2015): Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. In: *Human reproduction update* 21 (6), S. 748–761. DOI: 10.1093/humupd/dmv038.

McLaren, J.; Prentice, A.; Charnock-Jones, D. S.; Smith, S. K. (1996): Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 11 (1), S. 220–223. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019023.

Mehedintu, C.; Plotogea, M. N.; Ionescu, S.; Antonovici, M. (2014): Endometriosis still a challenge. In: *Journal of medicine and life* 7 (3), S. 349–357.

Mönckedieck, Verena; Sannecke, Carolin; Husen, Bettina; Kumbartski, Michael; Kimmig, Rainer; Tötsch, Martin et al. (2009): Progestins inhibit expression of MMPs and of angiogenic factors in human ectopic endometrial lesions in a mouse model. In: *Molecular human reproduction* 15 (10), S. 633–643. DOI: 10.1093/molehr/gap063.

- Moore**, Nicole L.; Hickey, Theresa E.; Butler, Lisa M.; Tilley, Wayne D. (2012): Multiple nuclear receptor signaling pathways mediate the actions of synthetic progestins in target cells. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 357 (1-2), S. 60–70. DOI: 10.1016/j.mce.2011.09.019.
- Morelli**, Sara S.; Petraglia, Felice; Weiss, Gerson; Luisi, Stefano; Florio, Pasquale; Wojtczuk, Andrea; Goldsmith, Laura T. (2010): Endometrial expression of relaxin and relaxin receptor in endometriosis. In: *Fertility and sterility* 94 (7), S. 2885–2887. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.06.051.
- Moutsatsou**, P.; Sekeris, C. E. (2003): Steroid receptors in the uterus: implications in endometriosis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 997, S. 209–222. DOI: 10.1196/annals.1290.024.
- Muneyama**, K.; Bauer, R. J.; Shuman, D. A.; Robins, R. K.; Simon, L. N. (1971): Chemical synthesis and biological activity of 8-substituted adenosine 3',5'-cyclic monophosphate derivatives. In: *Biochemistry* 10 (12), S. 2390–2395. DOI: 10.1021/bi00788a033.
- Murata**, Hiromi; Tanaka, Susumu; Okada, Hidetaka (2022): The Regulators of Human Endometrial Stromal Cell Decidualization. In: *Biomolecules* 12 (9). DOI: 10.3390/biom12091275.
- Murata**, Hiromi; Tsuzuki, Tomoko; Kido, Takeharu; Kakita-Kobayashi, Maiko; Kida, Naoko; Hisamatsu, Yoji; Okada, Hidetaka (2019): Progesterin-induced heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 inhibits angiopoietin 2 via fibroblast growth factor 9 in human endometrial stromal cells. In: *Reproductive biology* 19 (1), S. 14–21. DOI: 10.1016/j.repbio.2019.02.005.
- Nisolle**, Michelle; Casanas-Roux, Françoise; Donnez, Jacques (2000): Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. In: *Fertility and sterility* 74 (2), S. 306–312. DOI: 10.1016/s0015-0282(00)00601-4.
- Nisolle**, Michelle; Donnez, Jacques (1997): Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. In: *Fertility and sterility* 68 (4), S. 585–596. DOI: 10.1016/S0015-0282(97)00191-X.
- Nnoaham**, Kelechi E.; Hummelshoj, Lone; Webster, Premila; d'Hooghe, Thomas; Cicco Nardone, Fiorenzo de; Cicco Nardone, Carlo de et al. (2011): Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. In: *Fertility and sterility* 96 (2), 366-373.e8. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.090.
- Noyes**, R. W.; Hertig, A. T.; Rock, J. (1950): Dating the Endometrial Biopsy. In: *Fertility and sterility* 1 (1), S. 3–25. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)30062-0.
- Ogara**, Maria F.; Rodríguez-Seguí, Santiago A.; Marini, Melisa; Nacht, Ana Silvina; Stortz, Martin; Levi, Valeria et al. (2019): The glucocorticoid receptor interferes with progesterone receptor-dependent genomic regulation in breast cancer cells. In: *Nucleic acids research* 47 (20), S. 10645–10661. DOI: 10.1093/nar/gkz857.
- Okada**, Hidetaka; Tsuzuki, Tomoko; Murata, Hiromi (2018): Decidualization of the human endometrium. In: *Reproductive Medicine and Biology* 17 (3), S. 220–227. DOI: 10.1002/rmb2.12088.

- Olive**, D. L.; Haney, A. F. (1986): Endometriosis--associated infertility: a critical review of therapeutic approaches. In: *Obstetrical & gynecological survey* 41 (9), S. 538–555.
- Pamies**, David; Bal-Price, Anna; Chesné, Christophe; Coecke, Sandra; Dinnyes, Andras; Eskes, Chantra et al. (2018): Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems. In: *ALTEX* 35 (3), S. 353–378. DOI: 10.14573/altex.1710081.
- Pan-Castillo**, Belen; Gazze, Salvatore A.; Thomas, Samantha; Lucas, Christopher; Margarit, Lavinia; Gonzalez, Deyarina et al. (2018): Morphophysical dynamics of human endometrial cells during decidualization. In: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 14 (7), S. 2235–2245. DOI: 10.1016/j.nano.2018.07.004.
- Patel**, Bansari G.; Rudnicki, Martin; Yu, Jie; Shu, Yimin; Taylor, Robert N. (2017): Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. In: *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 96 (6), S. 623–632. DOI: 10.1111/aogs.13156.
- Petta**, Ioanna; Dejager, Lien; Ballegeer, Marlies; Lievens, Sam; Tavernier, Jan; Bosscher, Karolien de; Libert, Claude (2016): The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combatting Inflammatory and Infectious Diseases. In: *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 80 (2), S. 495–522. DOI: 10.1128/MMBR.00064-15.
- Pfaffl**, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pfisterer**, J.; Ludwig, M.; Vollersen, E. (2006): Funktionelle Anatomie der weiblichen Genitalorgane. In: Wolfgang Holzgreve, Walter Jonat, Karl-Theo M. Schneider, Jürgen M. Weiss und Klaus Diedrich (Hg.): *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Aufl. 2007. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 3–18.
- Pinkert**, Ted C.; Catlow, Charles E.; Straus, Reuben (1979): Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. In: *Cancer* 43 (4), S. 1562–1567. DOI: 10.1002/1097-0142(197904)43:4<1562::AID-CNCR2820430451>3.0.CO;2-W.
- Plaisier**, Margreet (2011): Decidualisation and angiogenesis. In: *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 25 (3), S. 259–271. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.011.
- Pohnke**, Y.; Kempf, R.; Gellersen, B. (1999): CCAAT/enhancer-binding proteins are mediators in the protein kinase A-dependent activation of the decidual prolactin promoter. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (35), S. 24808–24818. DOI: 10.1074/jbc.274.35.24808.
- Queckbörner**, Suzanna; Syk Lundberg, Elisabeth; Gemzell-Danielsson, Kristina; Davies, Lindsay C. (2020): Endometrial stromal cells exhibit a distinct phenotypic and immunomodulatory profile. In: *Stem cell research & therapy* 11 (1), S. 15. DOI: 10.1186/s13287-019-1496-2.
- Rehm**, Hubert; Letzel, Thomas (2016): *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7. Aufl. 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Experimentator). Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1622697>.

- Rosselli**, Marinella; Cometti, Barbara P. S.; Leeners, Brigitte; Szutkowska, Marta Ewa; Jackson, Edwin K.; Dubey, Raghendra K. (2021): Modulation of Cyclic AMP Levels in Fallopian Tube Cells by Natural and Environmental Estrogens. In: *Cells* 10 (5). DOI: 10.3390/cells10051250.
- Rowan**, B. (2000): Progesterone receptor coactivators. In: *Steroids* 65 (10-11), S. 545–549. DOI: 10.1016/S0039-128X(00)00112-4.
- Sacchi**, Sandro; Sena, Paola; Degli Esposti, Chiara; Lui, Jessica; La Marca, Antonio (2018): Evidence for expression and functionality of FSH and LH/hCG receptors in human endometrium. In: *Journal of assisted reproduction and genetics* 35 (9), S. 1703–1712. DOI: 10.1007/s10815-018-1248-8.
- Saha**, Rama; Pettersson, Hans Järnbert; Svedberg, Pia; Olovsson, Matts; Bergqvist, Agneta; Marions, Lena et al. (2015): Heritability of endometriosis. In: *Fertility and sterility* 104 (4), S. 947–952. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.035.
- Sampson**, J. A. (1927): Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. In: *The American journal of pathology* 3 (2), 93-110.43.
- Sapio**, Luigi; Gallo, Monica; Illiano, Michela; Chiosi, Emilio; Naviglio, Daniele; Spina, Annamaria; Naviglio, Silvio (2017): The Natural cAMP Elevating Compound Forskolin in Cancer Therapy: Is It Time? In: *J. Cell. Physiol.* 232 (5), S. 922–927. DOI: 10.1002/jcp.25650.
- Schaal**, Sandra Marie; Garg, Maneesh Sen; Ghosh, Mousumi; Lovera, Lillie; Lopez, Michael; Patel, Monal et al. (2012): The therapeutic profile of rolipram, PDE target and mechanism of action as a neuroprotectant following spinal cord injury. In: *PloS one* 7 (9), e43634. DOI: 10.1371/journal.pone.0043634.
- Schägger**, Hermann (2006): Tricine-SDS-PAGE. In: *Nature protocols* 1 (1), S. 16–22. DOI: 10.1038/nprot.2006.4.
- Schindler**, Adolf E.; Campagnoli, Carlo; Druckmann, René; Huber, Johannes; Pasqualini, Jorge R.; Schweppe, Karl W.; Thijssen, Jos H. H. (2008): Classification and pharmacology of progestins. In: *Maturitas* 61 (1-2), S. 171–180. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.11.013.
- Schmidt**, Jörn (2022): Einfluss von durch endometriale Epithel- sowie durch Trophoblastzellen sezernierten Faktoren auf die Dezidualisierung humaner endometrialer Stromazellen von Patientinnen mit und ohne Endometriose. unveröffentlichte Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen
- Shindoh**, Hisayuu; Okada, Hidetaka; Tsuzuki, Tomoko; Nishigaki, Akemi; Kanzaki, Hideharu (2014): Requirement of heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 during decidualization of human endometrial stromal cells in vitro. In: *Fertility and sterility* 101 (6), 1781-90.e1-5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.013.
- Simoens**, S.; Hummelshoj, L.; D'Hooghe, T. (2007): Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. In: *Human reproduction update* 13 (4), S. 395–404. DOI: 10.1093/humupd/dmm010.
- Simoens**, Steven; Dunselman, Gerard; Dirksen, Carmen; Hummelshoj, Lone; Bokor, Attila; Brandes, Iris et al. (2012): The burden of endometriosis: costs and quality of life

of women with endometriosis and treated in referral centres. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 27 (5), S. 1292–1299. DOI: 10.1093/humrep/des073.

Smolarz, Beata; Szyłło, Krzysztof; Romanowicz, Hanna (2021): Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature). In: *International journal of molecular sciences* 22 (19). DOI: 10.3390/ijms221910554.

Söhngen, Linda; Schmidt, Markus; Wimberger, Pauline; Kimmig, Rainer; Grümmer, Ruth (2014): Additional B-cell deficiency does not affect growth and angiogenesis of ectopic human endometrium in T-cell-deficient endometriosis mouse models during long-term culture. In: *Journal of reproductive immunology* 106, S. 50–57. DOI: 10.1016/j.jri.2014.08.004.

Suda, Kazuaki; Nakaoka, Hirofumi; Yoshihara, Kosuke; Ishiguro, Tatsuya; Tamura, Ryo; Mori, Yutaro et al. (2018): Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. In: *Cell reports* 24 (7), S. 1777–1789. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.037.

Tamura, Kazuhiro; Yoshie, Mikihiro; Hara, Takahiko; Isaka, Keiichi; Kogo, Hiroshi (2007): Involvement of stathmin in proliferation and differentiation of immortalized human endometrial stromal cells. In: *The Journal of reproduction and development* 53 (3), S. 525–533. DOI: 10.1262/jrd.18129.

Tang, B.; Guller, S.; Gurside, E. (1993): Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. In: *Endocrinology* 133 (5), S. 2197–2203. DOI: 10.1210/endo.133.5.8404671.

Tang, Baiqing; Gurside, Erlie (1993): Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 47 (1-6), S. 115–121. DOI: 10.1016/0960-0760(93)90064-4.

Tang, Meiyi; Mazella, James; Zhu, Hui Hui; Tseng, Linda (2005): Ligand activated relaxin receptor increases the transcription of IGFBP-1 and prolactin in human decidual and endometrial stromal cells. In: *Molecular human reproduction* 11 (4), S. 237–243. DOI: 10.1093/molehr/gah149.

Tang, Zhi-Jing; Guan, Hai-Yun; Wang, Lu; Zhang, Wei (2021): Research Progress on Human Endometrium Decidualization In vitro Cell Models. In: *Reproductive and Developmental Medicine* 5 (2), S. 119–127. DOI: 10.4103/2096-2924.320882.

Tapia-Pizarro, Alejandro; Archiles, Sebastián; Argandoña, Felipe; Valencia, Cecilia; Zavaleta, Keyla; Cecilia Johnson, M. et al. (2017): hCG activates Epac-Erk1/2 signaling regulating Progesterone Receptor expression and function in human endometrial stromal cells. In: *Molecular human reproduction* 23 (6), S. 393–405. DOI: 10.1093/molehr/gax015.

Telgmann, R.; Gellersen, B. (1998): Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. In: *Human reproduction update* 4 (5), S. 472–479. DOI: 10.1093/humupd/4.5.472.

Telgmann, R.; Maronde, E.; Taskén, K.; Gellersen, B. (1997): Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene

in human endometrial stromal cells. In: *Endocrinology* 138 (3), S. 929–937. DOI: 10.1210/endo.138.3.5004.

Tenor, Hermann; Hatzelmann, Armin; Beume, Rolf; Lahu, Gezim; Zech, Karl; Bethke, Thomas D. (2011): Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. In: *Handbook of experimental pharmacology* (204), S. 85–119. DOI: 10.1007/978-3-642-17969-3_3.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2014): Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a committee opinion. In: *Fertility and sterility* 101 (4), S. 927–935. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.012.

Ulfig, Norbert (2019): Kurzlehrbuch Histologie. 5., unveränderte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Kurzlehrbuch).

Wang, Hai; Bocca, Silvina; Anderson, Sandra; Yu, Liang; Rhavi, Bhaskara S.; Horcajadas, José; Oehninger, Sergio (2013): Sex steroids regulate epithelial-stromal cell cross talk and trophoblast attachment invasion in a three-dimensional human endometrial culture system. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 19 (9), S. 676–687. DOI: 10.1089/ten.TEC.2012.0616.

Werner, Katharina; Schwede, Frank; Genieser, Hans-Gottfried; Geiger, Jörg; Butt, Elke (2011): Quantification of cAMP and cGMP analogs in intact cells: pitfalls in enzyme immunoassays for cyclic nucleotides. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 384 (2), S. 169–176. DOI: 10.1007/s00210-011-0662-6.

Weston, Gareth; Rogers, Peter A.W (2000): Endometrial angiogenesis. In: *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 14 (6), S. 919–936. DOI: 10.1053/beog.2000.0135.

Wheeler, Karen C.; Jena, Manoj K.; Pradhan, Bhola S.; Nayak, Neha; Das, Subhendu; Hsu, Chaur-Dong et al. (2018): VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. In: *PloS one* 13 (1), e0191040. DOI: 10.1371/journal.pone.0191040.

Wölfler, Monika Martina; Küppers, Mareike; Rath, Werner; Buck, Volker Uwe; Meinhold-Heerlein, Ivo; Classen-Linke, Irmgard (2016): Altered expression of progesterone receptor isoforms A and B in human eutopic endometrium in endometriosis patients. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 206, S. 1–6. DOI: 10.1016/j.aanat.2016.03.004.

Wu, W. X.; Brooks, J.; Glasier, A. F.; McNeilly, A. S. (1995): The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. In: *Journal of molecular endocrinology* 14 (2), S. 255–261. DOI: 10.1677/jme.0.0140255.

Wynn, Ralph M. (1974): Ultrastructural development of the human decidua. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 118 (5), S. 652–670. DOI: 10.1016/S0002-9378(16)33740-1.

Xu, Robert X.; Rocque, Warren J.; Lambert, Millard H.; Vanderwall, Dana E.; Luther, Michael A.; Nolte, Robert T. (2004): Crystal structures of the catalytic domain of phosphodiesterase 4B complexed with AMP, 8-Br-AMP, and rolipram. In: *Journal of molecular biology* 337 (2), S. 355–365. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.01.040.

Yan, Kuo; Gao, Li-Na; Cui, Yuan-Lu; Zhang, Yi; Zhou, Xin (2016): The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). In: *Molecular medicine reports* 13 (5), S. 3715–3723. DOI: 10.3892/mmr.2016.5005.

Yang, S. (2002): Regulation of Aromatase P450 Expression in Endometriotic and Endometrial Stromal Cells by CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs): Decreased C/EBP in Endometriosis Is Associated with Overexpression of Aromatase. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87 (5), S. 2336–2345. DOI: 10.1210/jc.87.5.2336.

Zakhari, Andrew; Delpero, Emily; McKeown, Sandra; Tomlinson, George; Bougie, Olga; Murji, Ally (2021): Endometriosis recurrence following post-operative hormonal suppression: a systematic review and meta-analysis. In: *Human reproduction update* 27 (1), S. 96–107. DOI: 10.1093/humupd/dmaa033.

Zeller, E.; Stief, H. J.; Pflug, B.; Sastre-y-Hernández, M. (1984): Results of a phase II study of the antidepressant effect of rolipram. In: *Pharmacopsychiatry* 17 (6), S. 188–190. DOI: 10.1055/s-2007-1017435.

Zondervan, Krina T.; Becker, Christian M.; Koga, Kaori; Missmer, Stacey A.; Taylor, Robert N.; Viganò, Paola (2018): Endometriosis. In: *Nature reviews. Disease primers* 4 (1), S. 9. DOI: 10.1038/s41572-018-0008-5.

Zondervan, Krina T.; Becker, Christian M.; Missmer, Stacey A. (2020): Endometriosis. In: *The New England journal of medicine* 382 (13), S. 1244–1256. DOI: 10.1056/NEJMra1810764.

Internetadressen:

www.endometriose-vereinigung.de Stand: November 2022

www.endometriose-sef.de Stand: November 2022

<https://librepathology.org/wiki/Endometrium> Stand November 2022

Danksagung

An dieser möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die maßgeblich zu dem Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein Dank geht an erster Stelle an Prof. Dr. Ruth Grümmer. Ich danke Dir, dass Du mich ausgesucht und Dein Vertrauen in mich gesetzt hast, um dieses spannende Thema zu bearbeiten. Ich danke Dir, dass ich so unfassbar viel von Dir lernen durfte. Ich möchte mich auch für Deine unermüdliche Unterstützung in allen fachlichen, aber auch privaten Fragen bedanken. Außerdem danke ich Dir für jedes aufbauende Wort, für jedes Teilen Deiner Erfahrungen und für Dein unentwegtes Engagement. Danke, dass Du mir Mut zu all meinen Science Slam Auftritten zugesprochen hast, ohne Dich wäre ich nicht die Deutsche Science Slam Meisterin 2021 geworden. Außerdem danke ich Dir für Deine Hilfe als ich vor der Mammutaufgabe stand, Anatomie zu lernen und zu lehren. Ich hätte mir keine bessere Doktormutter vorstellen können.

Ich bedanke mich auch bei unserer Kooperationspartnerin Prof. Dr. Alexandra Bielfeld, die stets für neue Endometriumproben gesorgt hat. Ohne Dein Engagement hätte ich meine Experimente nicht durchführen können. Vielen Dank.

Ich möchte Prof. Dr. Gunther Wennemuth danken, dass ich die Möglichkeit hatte im Institut für Anatomie diese Arbeit durchzuführen. Ich danke Dir auch, dass du Dein Vertrauen in mich gesetzt, weiterhin angestellt hast und mir die Möglichkeit gibst von Dir und allen anderen weiterhin zu lernen und mit euch gemeinsam Anatomie zu lehren.

Ein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Bernhard B. Singer. Dein unendliches theoretisches und praktisches Wissen hat mich unfassbar viel gelehrt. Danke für jedes Deiner motivierenden und aufbauenden Worte. Ich danke Dir für Deinen Glauben an mich und Deine fortwährende Unterstützung. Ich werde nie vergessen, was du alles für mich getan hast. Ruhe in Frieden.

Ich möchte mich auch herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie bedanken. Hierbei gilt mein Dank in erster Linie Natalie Knipp. Vom ersten Tag an hast Du mich unterstützt und mir geholfen. Ohne Dich hätte ich das nicht geschafft. Danke, dass du mir so viel geholfen hast. Auch möchte ich mich bei Christian von Massow bedanken. Deine Hilfsbereitschaft, Deine Freundschaft, unsere gemeinsame Vorliebe für Stand-up Shows und DDA hat mich in der ganzen Zeit Halt gebend begleitet. Außerdem bedanke ich mich bei Ulrike Trottenberg. Wenn ich Deine Hilfe nicht gehabt hätte, dann würde ich jetzt noch am Mikrotom sitzen und scheiden. Ich danke auch Birgit Maranca-Hüwel und Bärbel Gobs-Hevelke. Ohne Eure offenen Ohren, ohne Eure Unterstützung und ohne Eure unermüdliche Bereitschaft den Vorrat zu überblicken und alles zu bestellen, was ich gebraucht und verbraucht habe, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte auch Peter Babioch danken. Du bist ein Retter in der Not, wenn die technischen Probleme mich verzweifeln lassen. Mein ganz besonderer Dank gilt Gudrun Mikus. Deine Unterstützung, Dein Zuhören, Dein Dasein hat mich durchhalten lassen. Ich bin unfassbar froh Dich mit in meiner Nähe zu haben.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Verena Schmitt. Danke, dass wir Frustration und Freude miteinander teilen durften. Danke auch für deine methodischen Tipps und Deine Hilfsbereitschaft. Auch möchte ich Dr. Elena Czynnik danken. Mein kleiner Fels mit großer Inspiration. Danke, für Deinen Beistand in all dieser Zeit. Danke, dass wir so vieles miteinander teilen können. Ich danke auch Dr. Susanne Grund. Wir haben ein Büro und vieles anderes miteinander geteilt. Deine Hilfe und aufbauenden Worte in den letzten Wochen haben mich bis zu dieser Zeile hier gebracht. Danke, dass du diese Arbeit gelesen und korrigiert hast.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Auf vielfältige Weisen unterstützt ihr und glaubt an mich. Danke für Eure Anerkennung und Unterstützung.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Induktion der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen: Vergleichende Analysen bei Frauen mit und ohne Endometriose“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Janine Moyer befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Prof. Dr. rer. nat. Ruth Grümmer

Name des Betreuers an der Universität Duisburg-Essen

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Janine Moyer

Unterschrift der Doktorandin

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Janine Moyer

Unterschrift der Doktorandin