

Dedifferenzierungsprozesse während der Pathogenese der peritonealen Endometriose

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität GH Essen

vorgelegt von

Simone Scotti

aus Essen

Januar 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie in Kooperation mit der Abteilung für Gynäkologie der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. Esche

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2001

Danksagung:

Frau Professorin Dr. Elke Winterhager möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung dieser Arbeit, sowie für die wertvollen Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft ganz herzlich danken.

Der Abteilung für Gynäkologie, insbesondere Herrn Professor Dr. A.E. Schindler und Herrn PD Dr. Regidor, danke ich für die Bereitstellung des Gewebematerials sowie der dazugehörigen Hormonwerte.

Ich bedanke mich bei Dave Kittel für die Unterstützung bei der Bildbearbeitung, bei Bärbel Gobs-Hevelke für die REM-Aufnahmen und J. Huesing für die statistischen Analysen.

Allen Mitgliedern der AG Winterhager danke ich für den wissenschaftlichen Diskurs im Dienstagsseminar.

Mein besondere Dank gilt Dr. Birgit Hülseweh und Isabell Kromberg für die Unterstützung und Ermutigung im Verlauf meiner Promotion.

Abschließend ein besonders herzliches Dankeschön an meine Eltern und Großeltern, die mir den Weg zur Promotion geebnet haben, und an Holger Scotti, der mich während meiner Promotion in allen Belangen unterstützt und mich in den schwierigen Phasen immer wieder aufgebaut hat.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Projekt RE 1318/1-2, und durch die Schering AG gefördert

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Endometriose	1
1.2	Lokalisation und Morphologie der Endometrioseherde	2
1.3	Symptome der Endometriose und Therapieansätze	4
1.4	Klassifikation der Endometriose	5
1.5	Molekularbiologische und immunhistochemische Charakterisierung der ektopen Endometrien und die Suche nach der Entstehungsursache	5
1.5.1	Infertilität	6
1.5.2	Genetische Ursachen	7
1.6	Dedifferenzierungsprozesse während der Pathogenese der Endometriose	8
1.6.1	Hormonelle Regulation der Endometrioseherde	8
1.6.2	EGF und sein Rezeptor	9
1.6.3	Proliferation und Apoptose	10
1.6.4	Zell-Zell-Kommunikation	10
1.6.5	Adhäsionseigenschaften	11
1.6.5.1	Cadherine	11
1.6.5.2	Integrine	13
1.7	Marker der inflammatorischen Kaskade	15
1.7.1	Selektine	15
1.7.2	Stickstoffmonoxid-Synthasen und Cyclooxygenasen	15
1.7.2.1	NO und NO-Synthasen	15
1.7.2.2	Prostaglandine und Cyclooxygenasen	16
1.7.2.3	Das Zusammenspiel von iNOS und COX-2 bei Entzündungs- reaktionen.	17
2	Zielsetzung	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Feinchemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	20
3.2	Lösungen und Puffer	21
3.3	Humane Gewebeproben	22
3.3.1	Endometrium	22
3.3.2	Endometriotische Läsionen	23
3.4	Immunhistochemie	23
3.4.1	Primär- und Sekundärantikörper	23
3.4.2	Herstellung und Fixierung von immunhistochemischen Präparaten	23
3.4.2.1	Kryostatschnitte	23
3.4.2.2	Zellkulturpräparate	25
3.4.3	Immunhistochemische Nachweisverfahren	25
3.4.3.1	Fluoreszenzmarkierung	25

3.4.3.2	LSAB-Methode	26
3.5	Molekularbiologische Arbeiten	27
3.5.1	Transformation kompetenter Bakterien	27
3.5.2	Endotoxin-freie Isolierung von Plasmid-DNA	27
3.5.3	Restriktionsanalyse	28
3.5.4	Isolierung von Gesamt-RNA	28
3.5.5	Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA	29
3.5.6	DNase-Behandlung von Gesamt-RNA	29
3.5.7	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	29
3.5.8	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen im	29
3.5.9	Fällung von Nukleinsäuren	30
3.6	cDNA-Expressionsanalysen	30
3.6.1	Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden	30
3.6.2	Säulenchromatographie (CHROMA-Spin 200 Säulen)	31
3.6.3	Bestimmung der Einbaurate radioaktiv-markierter Nukleotide nach Verwendung der CHROMA-Spin 200-Säulen	31
3.6.4	Säulenchromatographie (Atlas NucleoSpin® Extraction Kit)	31
3.6.5	Ammoniumacetat-Fällung	32
3.6.6	Hybridisierung der Atlas Arrays	32
3.6.7	Densitometrische Auswertung der cDNA-Expression-Arrays	33
3.7	Polymerase-Kettenreaktion	33
3.7.1	Oligonukleotide und PCR-Bedingungen	33
3.7.2	RT-PCR	33
3.7.2.1	Reverse Transkription	33
3.7.2.2	PCR	35
3.7.3	Semiquantitative RT-PCR	35
3.8	Isolierung, Kultivierung und Transfektion endometrialer Zellen	36
3.8.1	Kulturbedingungen	36
3.8.2	Zellkulturmedien	37
3.8.3	Trypsinieren von Zellen	37
3.8.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
3.8.5	Isolierung von Drüsenepithel-Aggregaten und Stromazellen aus humanem Endometrium durch Filtration	38
3.8.6	Isolierung von endometrialen Epithel-Zellaggregaten und Stromazellen durch Sedimentation	38
3.8.7	Immunomagnetische Aufreinigung der isolierten endometrialen Epithel- aggregate und Stromazellen	39
3.8.8	Vitalitätstest	41
3.8.9	Etablierung stabiler endometrialer Zelllinien	41
3.8.10	Optimierung der Antibiotika-Konzentration für die Selektion transfizierter Zellen	42
3.8.11	Transfektionstechniken	42
3.8.11.1	Transfektion mit Effectene	42

3.8.11.2	Lipofektion	43
3.8.11.3	Transfektion mit SuperFect	43
3.8.11.4	<i>In situ</i> -Elektroporation	44
3.8.12	Vektoren	44
3.8.13	Präparation von Zellen für Rasterelektronenmikroskopie (REM)	45
3.8.14	<i>In vitro</i> -Dezidualisierung	46
3.8.15	Isolierung genomischer DNA aus Zellen	46
3.9	Statistische Auswertung	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen eutoper und ektooper Endometrien	48
4.1.1	Proliferation	48
4.1.2	EGF und EGF-R	49
4.1.3	Zell-Zell-Adhäsion	51
4.1.3.1	E-Cadherin	51
4.1.3.2	α - und β -Catenin	51
4.1.4	Korrelation der Expression des Cadherin-Catenin-Komplexes, von EGF und EGF-R zu den Östradiol-Serumwerten	54
4.1.5	Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) und Cyclooxygenasen (COX)	55
4.1.5.1	eNOS und iNOS	55
4.1.5.2	COX-1 und COX-2	56
4.1.6	Korrelation der NOS-/COX-Expression zum Schweregrad der	57
4.1.7	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	58
4.2	Vergleichende Analyse des endometrialen Expressionsmusters von Frauen mit und ohne Endometriose	59
4.2.1	cDNA Expression Arrays	59
4.2.2	Expressionsmuster humaner Endometrien	61
4.2.3	Validierung der Ergebnisse des cDNA-Expressionsanalysen	65
4.3	Etablierung und Charakterisierung endometrialer Primärkulturen und Herstellung endometrialer Zelllinien	69
4.3.1	Isolierung von Epithelaggregaten und Stromazellen aus humanem Endometrium	69
4.3.2	Immunomagnetische Aufreinigung der Primärzellen	71
4.3.3	Proliferationsaktivität der Primärzellkulturen	71
4.3.4	Etablierung permanenter endometrialer Zelllinien	73
4.3.5	Analyse der Effizienz unterschiedlicher Transfektionsverfahren	73
4.3.6	Immortalisierung von primären endometrialen Zellen	76
4.3.7	Stabilität der transfizierten Gene und Eintritt in die replikative Seneszenz	77
4.4	Charakterisierung endometrialer Epithel- und Stromazelllinien	80
4.4.1	Analyse der Cytokeratin-Expression epithelialer Zelllinien	80
4.4.2	Morphologie primärer Epithelkulturen und epithelialer Zelllinien	81
4.4.3	Teilungsaktivität der Epithelzelllinien im Vergleich zur Primärkultur	83

4.4.4	Immunhistochemische Untersuchung unterschiedlicher Differenzierungs- marker in Epithelzellen	83
4.4.4.1	Intermediärfilamente	84
4.4.4.2	Hormonrezeptoren	85
4.4.4.3	Wachstumsfaktoren	85
4.4.4.4	Zelladhäsion	85
4.4.4.5	Integrine	86
4.4.5	Charakterisierung endometrialer Stromazelllinien	88
4.4.6	Morphologischer Vergleich permanenter Stromazelllinien und primärer Stromakulturen	88
4.4.7	Proliferationsaktivität der stromalen Zelllinien	91
4.4.8	Immunhistochemische Untersuchung der Expression verschiedener Differenzierungsmarker in Stromazellen	92
4.4.8.1	Intermediärfilamente	92
4.4.8.2	Hormonrezeptoren	92
4.4.8.3	Wachstumsfaktoren	93
4.4.8.4	Integrine	94
4.4.9	<i>In vitro</i> -Dezidualisierung	94
5	Diskussion	98
5.1	Dedifferenzierungen der peritonealen Endometrioseherde im Vergleich zum eutopen Endometrium	98
5.2	Vergleichende Analyse der endometrialen Genexpression	103
5.2.1	Unterschiede im endometrialen Expressionsmuster von Frauen mit und ohne Endometriose	104
5.2.2	Validierung der endometrialen Expressionsunterschiede mittels semi- quantitative RT-PCR	108
5.3	Endometriale Zelllinien: Werkzeuge zur Charakterisierung der Endometriose und für die Entwicklung von Therapieschemata ?	110
6	Ausblick	118
7	Zusammenfassung	118
8	Literatur	122
9	Anhang	143

Abkürzungen

Abb	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Rinder- ('bovine'-) Serumalbumin
CAM	‚cell adhesion molecule‘
cDNA	komplementäre (‚complementary‘) DNA
COX	Cyclooxygenasen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'Triphosphat
DTT	5'5'-dithiobis-2-nitrobenzoesäure
E ₂	Östradiol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	‚epidermal growth factor‘
EGF-R	‚epidermal growth factor receptor‘
En	Endometrium von Frauen ohne Endometriose
EnEMT	Endometrium von Frauen mit Endometriose
ER	Östrogenrezeptor
FCS	fetales (‚calf‘) Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GFP	‚green fluorescence protein‘
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
h	Stunde/n
HMDS	Hexamethyldisilazan
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
IpM	Impulse pro Sekunde
Kb	Kilobasenpaare
LH	luteinisierendes Hormon
LHRH	luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon (Synonym für GnRH)

LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute/n
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MPK	Magnetpartikel-Konzentrator
mRNA	Boten- (,messenger'-)RNA
n.b.	nicht bekannt
n.d.	nicht durchgeführt
NOS	Stickstoffmonoxid- (NO-) Synthasen
P	Progesteron
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium- (,sodium'-) dodecylsulfat
Tab	Tabelle
TNF- α	,tumor necrosis factor- α '
U	unit
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	,vascular endothelial growth factor'

1 Einleitung

Die Endometriose ist eine benigne, gynäkologische Erkrankung, von der nach Schätzungen zwischen 2 % bis 3 % (Schweppe, 1989) bzw. 8 % bis 12 % aller Frauen (Mettler, 1995; Bühler, 1998; Giudice et al., 1998) im fortpflanzungsfähigen Alter betroffen sind.

Sie wurde bereits 1860 von von Rokitansky vorgestellt (von Rokitansky, 1860). Ihre Symptome und das Krankheitsbild sind aber schon im späten 17. Jahrhundert beschrieben worden (Knapp, 1999). Dennoch sind bis heute weder ihre Ätiologie noch Pathogenese aufgeklärt.

1.1 Endometriose

Die Endometriose ist charakterisiert durch das Auftreten von endometrialem Drüsenepithel und endometrialem Stroma an extrauterinen Lokalisationen (ektopes Endometrium) (Abb.1).

Es stellt sich die Frage, wie das Endometrium an diese unphysiologischen Orte gelangt.

Es werden unterschiedliche Theorien zur Entstehung der Endometriose in der Literatur beschrieben. Die derzeit am häufigsten vertretene Theorien ist die Transplantationstheorie, auch Sampson'sche Theorie genannt (Sampson, 1921). Sie postuliert, dass vitale endometriale Zellen und Gewebefragmente während der Menstruationsblutung retrograd über die Tuben in die Bauchhöhle transportiert werden, dort unter günstigen Bedingungen an das Peritoneum adhären, implantieren und Endometrioseherde, die aus Stroma und Drüsenepithel bestehen, bilden (Abb.2).

Es gibt verschiedene Aspekte, die für diese Theorie sprechen:

Ein wichtiger Aspekt ist, dass die retrograde Menstruation ein physiologisches Phänomen zu sein scheint (Blumenkrantz et al., 1981; Halme et al., 1984; Liu und Hitchcock, 1986). Es ist somit ein Transport von endometrialen Zellen und Gewebefragmenten über die Tuben in den Bauchraum möglich.

Im Menstruationssekret wurden, wie anhand von Gewebskulturen gezeigt wurde, vitale endometriale Drüsen und endometriales Stroma gefunden (Cron und Gey, 1927; Blumenkrantz et al., 1981; Halme et al., 1984). Endometriale Zellen sind in der Lage, zu implantieren und im Peritoneum zu wachsen. Das Wachstum der Implantate kann zudem durch ovarielle Hormone beeinflusst werden (DiZerega et al., 1980).

Nach Korrektur der Tubendurchgängigkeit konnte innerhalb eines kurzen Zeitraums bei 50 % der Patientinnen die Entwicklung einer Endometriose beobachtet werden (Schmeißer et al., 1996).

Es gibt aber auch Beobachtungen, die der Transplantationstheorie widersprechen. Zum einen spricht das Auftreten von extraabdominalen Endometrioseherden gegen diese Theorie. Sie entstehen vermutlich durch den Transport von endometrialen Zellen und Gewebefragmenten über die Blutgefäße und Lymphwege (Javert, 1949; Leyendecker et al., 1995). Desweiteren hat man in einzelnen Fällen bei Frauen mit primärer Amenorrhoe und ohne funktionelles uterines Endometrium (Mayer-Rokitansky-Küster-Syndrom) Endometriose gefunden (Kuhn et al., 1981; Mahboubi und Rostain, 1987; Malik et al., 1997).

Eine zweite Theorie zur Entstehung der Endometriose ist die Metaplasie-Theorie (Meyer, 1919; Novak, 1931). Durch wiederholte Irritation des Coelomepithels durch unterschiedliche Faktoren, wie Infektionen oder hormonelle Einflüsse (Novak, 1931), können metaplastische Veränderungen induziert werden, die zur Transformation des pluripotenten Coelomepithels führen.

Aufgrund der klinischen Vielfalt der Endometriose wurde von verschiedenen Autoren (Javert, 1949; Schweppe, 1984) postuliert, dass durch eine Kombination beider Theorien die Entstehung der Endometriose am besten erklärt werden kann.

1.2 Lokalisation und Morphologie der Endometrioseherde

Die peritonealen Endometrioseherde treten bei etwa 60 % der Endometriose-Patientinnen an den Ligamenta sacrouterina und bei 52 % der Fälle am Ovar auf. Häufig befallen sind aber auch der Douglas-Raum, die Harnblase (Abb.2), die Ligamenta lata und sowie das Rectum (Abb.1).

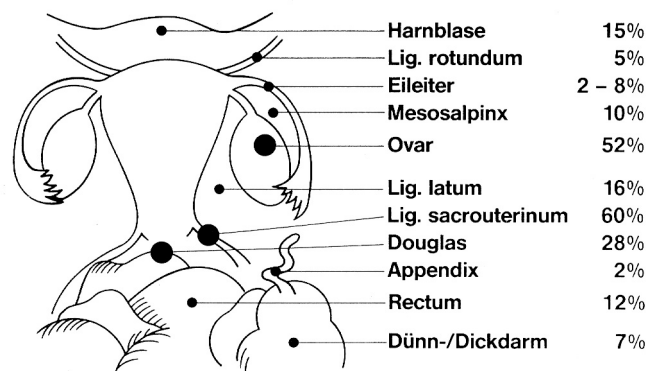


Abb. 1: Lokalisation peritonealer Endometrioseherde (nach Schweppe, 1989)

Die endometriotischen Läsionen zeigen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch ein sehr heterogenes Bild (zur Übersicht: Schweppe, 1989). Die Läsionen variieren in Form und Farbe. Sie können von hellbraun-gelblich, über dunkelbraun, dunkelrot bis blauschwarz gefärbt sein. Die Mehrzahl der peritonealen Endometrioseherde hat einen Durchmesser von etwa 1 bis 4 mm.

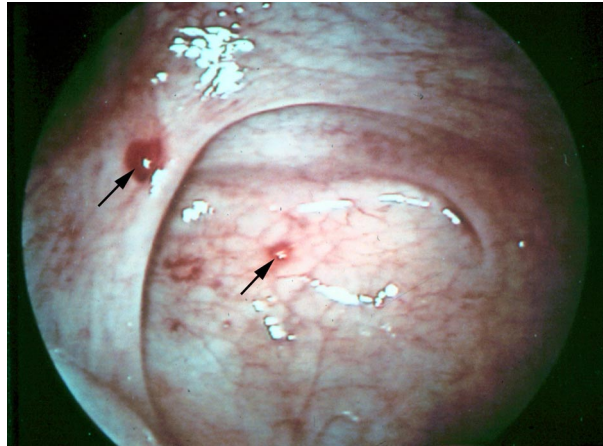


Abb. 2: Endoskopische Aufnahme von zwei rötlich gefärbten Endometrioseherden auf der Harnblase

Sie wachsen polypös vom Peritoneum ausgehend in die Bauchhöhle oder dringen in das umliegende Bindegewebe ein. An den Ovarien können sich zudem Zysten, die sogenannten Schokoladenzysten, entwickeln, die durch wiederholte Einblutungen mit einem schokoladenbreiartigen Inhalt gefüllt sind.

Die Herde können unterschiedlich differenziert sein. In einer Gruppe sind hochdifferenzierte Drüsen sowie hochdifferenziertes Stroma nachweisbar, die während des Menstruationszyklus ähnliche Veränderungen durchlaufen wie das eutope Endometrium.

In anderen Herden weist das Epithel unterschiedliche Differenzierungsgrade auf. Die Drüsen sind z.T. dilatiert. Die Zellen dieser Herde sind charakterisiert durch Organellenarmut, sowie niedrig differenziertes Cyto- und Karyoplasma.

In der dritten Gruppe der Endometrioseherde findet man hochdifferenziertes Drüsenepithel, das morphologisch dem Drüsenepithel der Cervixschleimhaut und dem Epithel der Tubenschleimhaut ähnelt.

In den letzten beiden Gruppen konnten keine zyklusabhängigen Veränderungen der Morphologie beobachtet werden.

1.3 Symptome der Endometriose und Therapieansätze

Die Endometriose ist mit unterschiedlichsten Symptomen assoziiert. Etwa 50-60 % der von Endometriose betroffenen Frauen leiden unter unerträglicher sekundärer Dysmenorrhoe (Menstruationsschmerzen) und 30-40 % der Frauen unter zyklischen und azyklischen Schmerzen im Beckenbereich. Aber auch Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (Dyspareunie; 15-30 %) und Zyklusunregelmäßigkeiten (5-15 %) können mit dieser Erkrankung einhergehen. Bei 60 % bis 80 % der Frauen mit primärer und / oder sekundärer Sterilität wird zudem Endometriose nachgewiesen (Kistner, 1979; Schindler, 1995; Christensen et al., 1995; Ledger, 1999).

Es gibt aber auch Frauen, die trotz Endometriose keinerlei Symptome zeigen, wodurch der prozentuale Anteil von Endometriose betroffener Frauen an der weiblichen Gesamtbevölkerung nicht exakt ermittelt, sondern nur geschätzt werden kann.

Neben der operativen Entfernung der endometriotischen Läsionen werden zahlreiche medikamentöse Therapien durchgeführt, die alle aufgrund der hormonelle Beeinflussbarkeit (1.6.1) der Endometrioseherde entwickelt worden sind. Zu den am häufigsten verabreichten Präparaten gehören u.a. GnRH-Agonisten, Danazol und Gestagene. Die Gestagentherapie beruht auf dem negativen Feedback und der Suppression des Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Systems, sowie der Hemmung der Proliferation. Die Hemmung der Proliferation beruht auf dem Prinzip, dass mit Östrogen vorbehandelte Endometrien durch Gelbkörperhormone in der Proliferation reduziert und sekretorisch transformiert werden. Durch die z.T. geringe Hormonrezeptordichte der endometriotischen Läsionen spielt der Wirkmechanismus für die Regression der Herde eine untergeordnete Rolle.

Danazol wirkt sich sowohl supprimierend auf Hypophyse und Hypothalamus als auch auf die Steroidhormonbiosynthese in Granulosazellen aus. Desweiteren beeinflusst Danazol das Immunsystem und bindet kompetitiv an Androgenrezeptoren u.a. in den endometriotischen Läsionen.

GnRH-Agonisten bewirken eine reversible medikamentöse ovarielle Suppression und somit einen kompletten Östrogenentzug. Nach anfänglicher Stimulation der Hypophyse unterbleibt durch die Bindung des Präparates an den GnRH-Rezeptor die Freisetzung von LH und FSH. Die Ovarien werden nicht mehr stimuliert und die Östrogenfreisetzung unterbleibt. Die Behandlung resultiert zum einen in einer Regression und Atrophie der Endometrioseherde und zum anderen im Ausbleiben der Menstruationsblutung (Amenorrhoe).

Unabhängig von der Art der medikamentösen Behandlung nehmen mit zunehmendem Schweregrad der Endometriose die Therapieerfolge ab und die Rezidivraten zu (Busacca et al., 1992; Waller und Shaw, 1993; Bühler, 1995). Die Erfolgsraten liegen unabhängig vom verwendeten Präparat zwischen 43 und 94 % und die Rezidivraten zwischen 20 und 65 % (Johnston, 1976; Schweppe, 1987; Zorn, 1990; de Wilde, 1991; Malinak et al., 1992).

Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert keine Therapiemöglichkeit, die zu einer vollständigen und andauernden Beseitigung der Endometrioseherde führt. Die Behandlungserfolge sind, wie man an den aufgeführten Rezidivraten erkennen kann, zeitlich limitiert.

1.4 Klassifikation der Endometriose

Es gibt zwei Möglichkeiten, den Schweregrad der Endometriose zu klassifizieren: mit Hilfe der „Endoscopic Endometriosis Classification“ (EEC) (Acosta et al., 1973; Semm, 1983) bzw. dem AFS-Score (American Fertility Society, 1979).

Die EEC unterteilt die Endometriosis genitalis externa / interna in drei Stufen. Als Stadium IV wird die extragenitale Endometriose definiert. Von Klasse I bis III nimmt sowohl die Anzahl der Herde als auch der Grad der Verwachsungen und Vernarbungen und die Größe der Herde zu.

Durch die Anwendung des AFS-Scores ist eine exaktere und differenziertere Auswertung der Lokalisation und des Schweregrades der Endometriose möglich. Sie wird vor allem bei klinisch-wissenschaftlichen Fragestellungen angewandt. Für die Routinediagnostik ist diese Klassifizierungsmethode zu komplex. Beim AFS-Score wird sowohl die Anzahl und die Größe der Herde als auch ihre Lokalisation und der Verwachsungsgrad berücksichtigt. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die extragenitale Endometriose nicht berücksichtigt wird.

1.5 Molekularbiologische und immunhistochemische Charakterisierung der ektopen Endometrien und die Suche nach der Entstehungsursache

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an Studien durchgeführt, um den Dedifferenzierungsprozess der endometriotischen Läsionen, wie auch der Endometrien von Endometriose-Patientinnen, durch molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu erfassen. Weitere Aspekte der Forschung waren, mögliche Defekte in der Immunabwehr der Patientinnen zu detektieren, um den Zusammenhang zwischen Endometriose und Infertilität aufzuklären und Hinweise auf genetische Ursachen der Endometriose zu bestätigen.

1.5.1 Infertilität

Bei etwa 60 bis 80 % der Frauen, die zur Sterilitätsabklärung laparoskopisch untersucht werden, werden endometriotische Läsionen gefunden.

Eine mögliche Erklärung für die Infertilität ist, dass durch die retrograd in die Bauchhöhle transportierten endometrialen Gewebefragmente anti-endometriale Antikörper bzw. Autoantikörper gebildet werden, und diese Antikörper den Implantationsprozess stören, was wiederum zur Infertilität führt. Die mögliche Verbindung zwischen Endometriose und der Ausbildung von anti-endometrialen Antikörpern wurde in verschiedenen Studien untersucht (Badawy et al., 1990; Kennedy et al., 1990 a,b; Wild et al., 1987, 1991; Fernandez-Shaw et al., 1993; Odukoya et al., 1995). Ein Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen, die sich mit dieser Hypothese befasst haben, zeigt keinerlei Übereinstimmungen. Zudem konnte keine Korrelation zwischen der Präsenz dieser Antikörper und Infertilität bei Endometriose-Patientinnen hergestellt werden (zur Übersicht: van Voorhis und Stovall, 1997).

Eine andere Ursache der Infertilität ist, dass bei 34 % der Frauen mit Tubenverschluss laparoskopisch Endometriosherde nachgewiesen werden konnten. Nach der operativen Korrektur der Tubenpassage entwickeln wiederum etwa 50 % der Patientinnen in der Bauchhöhle eine Endometriose (Schmeißer et al., 1996).

Leyendecker et al. stellten eine ganz andere Theorie zur Entstehung der Endometriose und mit ihr einhergehenden Infertilität auf (Leyendecker et al., 1996). Durch vaginale Sonographie konnte bei Endometriose-Patientinnen, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, während der frühen und mittleren Follikelphase, sowie der mittleren Lutealphase eine uterine Hyperperistaltik in Verbindung mit einem starken Anstieg des Transports von inerten Partikeln aus dem vaginalen Depot durch den Uterus in die Tuben und auch bis in die Bauchhöhle nachgewiesen werden. Die Dysperistaltik in der späten Follikelphase kann bei diesen Frauen zudem den Spermientransport beeinträchtigen.

Leyendecker et al. (Leyendecker et al., 1996) gehen aufgrund dieser Ergebnisse davon aus, dass die uterine Hyperperistaltik und Dysperistaltik sowohl für die reduzierte Fertilität als für die Entstehung der Endometriose verantwortlich sind.

1.5.2 Genetische Ursachen

Die Theorie, dass die Endometriose genetische Ursachen hat, hat in den letzten Jahren verstärkt an Bedeutung gewonnen (zur Übersicht: Kennedy, 1998). In verschiedenen epidemiologischen Studien wurde ein gehäuftes Auftreten von Endometriose bei Verwandten ersten Grades sowohl beim Menschen (Moen und Magnus, 1993; Kennedy et al., 1995; Kennedy, 1997; dos Reis et al., 1999) als auch nicht humanen Primaten (MacKenzie und Casey, 1975; Hadfield et al., 1997a) im Vergleich zu nicht von Endometriose betroffenen Kontrollgruppen beschrieben. Diese Beobachtungen wurden anhand von Zwillingsstudien bestätigt (Moen, 1994; Hadfield et al., 1997b).

Desweiteren unterschied sich die Prävalenzrate zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. Bei asiatischen Frauen (Miyazawa, 1976; Arumugam und Templeton, 1992, 1995) trat Endometriose häufiger auf als z.B. bei ultra-orthodoxen jüdischen Frauen (Bocker et al., 1994).

Bei all diesen Untersuchungen muss bedacht werden, dass die epidemiologischen Studien zumeist in selektierten Personenkreisen erfolgten, und nicht eine zufällige Auswahl von Personen aus der Bevölkerung in die Untersuchung einbezogen wurde.

Auch Umweltfaktoren scheinen, die Entstehung der Endometriose zu beeinflussen. Wie Untersuchungen an Rhesusaffen gezeigt haben, resultiert eine erhöhte Belastung durch radioaktive Strahlung (Fanton und Goldon, 1991) oder Dioxine (Rier et al., 1993) in ein verstärktes Auftreten von Endometriose. Untersuchungen in Belgien, einem Land mit hoher Dioxin-Belastung, haben gezeigt, dass hier die Häufigkeit und der Schweregrad der Endometriose größer ist als in anderen weniger Dioxin-belasteten Ländern (Koninckx et al., 1994). Auch die Studie von Mayani et al. lieferte Hinweise auf eine erhöhte Inzidenz bei Dioxin-belasteten Frauen (Mayani et al., 1997).

Es werden zudem genetische Abnormalitäten in Endometriosezellen festgestellt. Jiang et al. detektierten in 28 % der Endometrioseproben einen Verlust der Heterozygotie eines oder mehrerer Loci auf den Chromosomenarmen 9p, 11q und / oder 22q (Jiang et al., 1996).

Bei der Endometriose handelt es sich vermutlich, um eine multifaktoriell vererbte Erkrankung, deren Ursache sowohl auf genetische Prädisposition als auch auf Umwelteinflüsse zurückzuführen ist.

1.6 Dedifferenzierungsprozesse während der Pathogenese der Endometriose

Um die Pathogenesemechanismen besser zu verstehen, wurden verschiedene Faktoren, die für die Differenzierung der Endometriose von Bedeutung sind, bereits analysiert.

1.6.1 Hormonelle Regulation der Endometrioseherde

Um eine Aussage über die hormonelle Beeinflussbarkeit der Endometrioseherde und über die Auswirkung hormoneller Therapien treffen zu können, ist die Expression von Hormonrezeptoren in den ektopen Läsionen untersucht worden.

Ein Vergleich der Studien zeigt, dass die Verteilung und die Stärke der Expression von Progesteron- (PR) und Östrogen-Rezeptoren (ER) variieren. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wird beschrieben, dass die Rezeptordichte von Östrogen und Progesteron in den Herden geringer ist als im uterinen Endometrium (Prentice et al., 1992; Bergqvist und Ferno, 1993; Bergqvist, 1995). Bergqvist und Ferno (Bergqvist und Ferno, 1993) machen hierbei aber die Einschränkung, dass in wiederauftretenden Herden der PR-Level dem des Endometriums entspricht. Von Lessey et al. (Lessey et al., 1989) ist eine inhomogene Verteilung der beiden Rezeptoren in den endometriotischen Läsionen beobachtet worden. Eine Veränderung der Rezeptordichte in Abhängigkeit von den hormonellen Veränderungen im Verlauf des Zyklus konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Lessey et al., 1989; Fujishita et al., 1997), wohingegen Nisolle et al. (Nisolle et al., 1994) in den peritonealen Endometrioseherden Zyklusschwankungen beobachten konnte, die den Veränderungen des eutopen Endometriums ähnlich waren. Diese Gruppe detektierte lediglich eine Reduktion des Östrogen-, aber nicht des Progesteron-Rezeptors in den endometriotischen Läsionen, wohingegen Jones et al. (Jones et al., 1995) eine verstärkte Östrogenrezeptor-Expression in den Endometrioseherden beschrieb.

Auch das Verhältnis der beiden Isoformen des Östrogen-Rezeptors, ER- α und ER- β , sind in den eutopen und ektopen Endometrien unterschiedlich. Im Stroma der eutopen Endometrien ist das mRNA-Verhältnis von ER- α zu ER- β dreimal so hoch wie in den Endometrioseherden (Brandenberger et al., 1999). Eine ähnliche Verschiebung des ER- α : ER- β -Verhältnisse im Drüsenepithel von eutopen und ektopen Endometrien wurde von Fujimoto et al. dargestellt (Fujimoto et al., 1999).

Diese Daten verdeutlichen, warum die Erfolgsrate der hormonellen Therapie der Endometriose variiert und die medikamentösen Behandlungen z.T. nur geringe Erfolge aufweisen.

Die Veränderung im Verhältnis der Östrogen-Rezeptor-Isoformen könnte zudem ein Grund für die Unterschiede im Wachstum der eutopen und ektopen Endometrien sein (Brandenberger et al., 1999).

1.6.2 EGF und sein Rezeptor

Die zelluläre Proliferation spielt eine Schlüsselrolle in der endometrialen Physiologie. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass nicht Östrogen allein die Teilungsaktivität des Endometriums reguliert, sondern dass Wachstumsfaktoren an der Östrogen-induzierten Proliferation beteiligt sind (DiAugustine et al., 1988; Ignar-Trowbridge et al., 1992; Nelson et al., 1992).

Ein solcher Wachstumsfaktor ist EGF („epidermal growth factor“). Durch die Bindung an den EGF-Rezeptor (EGF-R), der sowohl Tyrosinkinase-Aktivität als auch eine Autophosphorylierungsstelle besitzt (Carpenter, 1987), stimuliert EGF die Differenzierung und Proliferation zahlreicher Zelltypen, wie Fibroblasten, Epithelzellen und Keratinozyten (Carpenter und Cohen, 1979), sowie endometrialer Zellen in Kultur (Haining et al., 1991; Chegini et al., 1992).

Die Expression von EGF sowie seines Rezeptors variiert, sowohl auf RNA- als auch Proteinebene, im Verlauf des Menstruationszyklus (Imai et al., 1995). Mit dem Anstieg der Östradiol-Serumkonzentration steigt auch der Expressionslevel von EGF und EGF-R im humanen Endometrium an (Bonaccorsi et al., 1989; Troche et al., 1991; Imai et al., 1995; McBean et al., 1997).

Wie anhand von Zellkulturstudien gezeigt wurde, wird die uterine Funktion durch die Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren und Steroidhormone reguliert (Irwin et al., 1991). Mit Hilfe von ER α knock out-Mäusen (ERKO-Mäusen) wurde gezeigt, dass der EGF- und ER α -Signalweg miteinander gekoppelt sind (Curtis et al., 1996).

Es wurde zudem untersucht, welche Rolle EGF und EGF-R in der Entstehung der Endometriose spielen. Der Expressionslevel von EGF und seines Rezeptors ist im eutopen Endometrium von Frauen ohne und mit Endometriose nahezu identisch (Prentice et al., 1992b). Über den Expressionslevel in den endometriotischen Läsionen im Vergleich zum eutopen Endometrium gibt es widersprüchliche Aussagen. Huang und Yeh konnten auf Proteinebene keine Unterschiede in der Immunreaktion gegen EGF-R detektieren. Allerdings wiesen sie eine signifikante Reduktion des mRNA-Niveaus in den Herden im Vergleich zum Endometrium nach (Huang und Yeh, 1994).

1.6.3 Proliferation und Apoptose

Die Zellzahl eines Gewebes kann durch die Balance zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod kontrolliert werden (Ellis et al., 1991; Raff, 1992). Für den Erhalt und das Wachstum der endometriotischen Läsionen sind nicht nur Hormonrezeptoren und Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren notwendig, sondern auch die Proliferation und Apoptose, eine Form des programmierten Zelltods (Wyllie et al., 1980; Walker et al., 1988), spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Weder über die Proliferationsaktivität noch über die Apoptoserate der endometriotischen Zellen konnte bisher eine eindeutige Aussage gemacht werden.

Klein et al. und Jones et al. beobachteten eine signifikante Reduktion der Proliferationsaktivität der ektopen im Vergleich zu den eutopen Endometrien, wohingegen Nisolle et al. keine auffallenden Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen endometriotischen Läsionen und uterinen Endometrien detektieren konnten (Klein et al., 1992; Jones et al., 1995; Nisolle et al., 1997). Lediglich in der Sekretionsphase, in der die Teilungsaktivität des Endometriums abnimmt, konnten in den Endometrioseherden weiterhin proliferierende Zellen nachgewiesen werden (Nisolle et al., 1997). Die Studie von Wingfield et al. (Wingfield et al., 1995) zeigte, im Gegensatz zu den anderen Studien, eine erhöhte Proliferationsaktivität in den Endometrien von Endometriose-Patientinnen. Li et al. (Li et al., 1993) wiesen eine erhöhte Proliferation in den ektopen im Vergleich zu den eutopen Endometrien nach.

Endometrioseherden weisen eine signifikant geringere Apoptoserate auf als die eutopen Endometrien. Auch im Endometrium von Frauen mit Endometriose konnten weniger apoptotische Zellen detektiert werden als in den Biopsien nicht betroffener Frauen (Dmowski et al., 1998; Gebel et al., 1998). Jones et al. (Jones et al., 1998) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gewebstypen detektieren. Harada et al. wiesen lediglich in 20 % der Endometrien aber in allen Endometrioseherden Apoptose nach (Harada et al., 1996).

1.6.4 Zell-Zell-Kommunikation

Für die Differenzierung des Endometriums spielt die Zell-Zell-Kommunikation über gap junctions eine entscheidende Rolle. Gap junctions sind Zell-Zell-Kanäle, die benachbarte Zellen miteinander verbinden und so den Austausch von Ionen und Molekülen bis 1 kDa zwischen diesen Zellen ermöglichen.

Typische endometriale Connexine sind Cx26 und Cx32, die im Epithel exprimiert werden, sowie Cx43, das im Stroma lokalisiert ist. Ihre Expression variiert im Verlauf des menstrualen Zyklus. Die Expression von Connexin 43 und 26 steigt in der östrogen-dominanten Follikelphase an und wird in der Progesteron-dominanten Lutealphase wieder supprimiert. Cx32 ist während der späten Proliferations- und der frühen Sekretionsphase detektierbar (Jahn et al., 1995).

Im Epithel der endometriotischen Läsionen kommt es zu einer aberranten Expression der Connexine. Cx43 wird in nahezu allen Endometrioseherden im Epithel exprimiert. Im Stroma hingegen ist Cx43 nicht mehr detektierbar. Cx26 wird nur noch in etwa 50 % der Herde im Epithel in Kombination mit Cx43 exprimiert. Cx32 ist nicht mehr nachweisbar.

Wie im uterinen Endometrium erfolgte ein Anstieg der Cx43-Expression in Abhängigkeit von einer erhöhten Östrogen-Konzentration im Serum. Eine zyklusabhängige Regulation der Cx26-Expression in den Endometrioseherden ist nicht nachweisbar (Regidor et al., 1997).

Das veränderte Connexin-Expressionsmuster in den ektopen Endometrien im Vergleich zum uterinen Endometrien belegt, dass die Endometrioseherde Dedifferenzierungen auf molekularer Ebene unterworfen sind.

1.6.5 Adhäsionseigenschaften

Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs = cell adhesion molecules) lassen sich in vier Gruppen unterteilen: Cadherine, Integrine, Selektine und die Immunglobulin-Superfamilie.

Die Domänenstruktur dieser Transmembranproteine ist sich sehr ähnlich. Der C-Terminus bildet die cytoplasmatische Domäne. Die Aminosäuresequenz setzt sich fort in eine membrandurchspannende und eine extrazelluläre Domäne mit dem N-Terminus.

Sie spielen eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion als auch der Bindung an Liganden in der Extrazelluläre Matrix (ECM). Dies wiederum resultiert in der Regulation unterschiedlicher zellulärer Prozesse. Hierzu gehören u.a. die Ausbildung von Zellform und -polarität, sowie die Zellmotilität und / oder Zelladhäsion und die invasiven Eigenschaften der Zellen.

In Zusammenhang mit der Endometriose wurde die Expression unterschiedlicher Zell-Adhäsionsmoleküle untersucht.

1.6.5.1 Cadherine

Cadherine sind integrale Membranglykoproteine, die in Gegenwart von Calcium eine homophile Bindung mit dem Partnermolekül der benachbarten Zelle eingehen. Über die

cytoplasmatische Domäne steht das Cadherin-Molekül über Catenine mit dem Cytoskelett in Verbindung. β -Catenin, bindet mit seinem C-Terminus an ein Serin-reiches Motiv in der cytoplasmatischen Domäne des Cadherins. α -Catenin, das wiederum am N-Terminus des β -Catenins gebunden ist, interagiert mit dem Aktin-Cytoskelett. Statt β -Catenin wurde auch γ -Catenin (Plakoglobin) als Verbindungselement zwischen dem Cadherin und α -Catenin beschrieben. p120^{cas}, das nahe der Transmembrandomäne des Cadherins lokalisiert ist, vermittelt vermutlich die Klusterung der Cadherine, was eine zusätzliche Stabilisierung der Zellverbindung verursacht (Yap et al., 1998).

Abweichungen in der E-Cadherin-Expression und der zellulären Lokalisation sowie Mutationen des E-Cadherins sind assoziiert mit Tumorgenität, infiltrativem Wachstum und Metastasierung in einer Vielzahl humaner Tumore (Umbas et al., 1992; Gamallo et al., 1993; Mayer et al., 1993; Pignatelli et al., 1994; Efstathiou et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass E-Cadherin in der Lage ist, die invasiven Eigenschaften von Tumoren zu unterdrücken (Behrens et al., 1989; Frixen et al., 1991; Vleminckx et al., 1991; Becker et al., 1994; Christofori und Semb, 1999; zur Übersicht: Birchmeier et al., 1995).

Im humanen Endometrium wird der Cadherin-Catenin-Komplex im luminalen und glandulären Epithel exprimiert. β -Catenin ist, im Gegensatz zu α -Catenin und E-Cadherin, auch im Stroma nachweisbar (Tabibzadeh et al., 1995). Tabibzadeh et al. konnten auf Proteinebene keine zyklusabhängige Regulation des Cadherin-Catenin-Expression im Endometrium nachweisen. Sowohl in der Proliferationsphase als auch in der Sekretionsphase und während der Menstruation ist der Expressionslevel unverändert. Allerdings erfolgt während der Menstruation eine Umorganisation der Zell-Zell-Verbindungen. Die Zellkontakte sind willkürlich, ohne erkennbares Muster in der Zelle verteilt. Bei einigen Zellen sind an den Zellgrenzen überhaupt keine Komponenten des Adhäsionskomplexes mehr auffindbar.

Im Gegensatz zu Tabibzadeh et al. detektierten Fujimoto et al. (Fujimoto et al., 1996) einen Anstieg des mRNA-Levels von E-Cadherin, α - und β -Catenin in der Sekretionsphase des Menstruationszyklus.

Auch in endometriotischen Läsionen kommt es zu einem Verlust von E-Cadherin. Die E-Cadherin-negativen aber Cytokeratin-positiven endometriotischen Epithelzellen wiesen, im Gegensatz zu endometrialen E-Cadherin-positiven Epithelzellen, ein erhöhtes invasives

Wachstum auf, dass metastasierenden Blasenkarzinom-Zelllinien entsprach (Gaetje et al., 1995, 1997; Starzinski-Powitz et al., 1998, 1999).

Eine Reduktion der Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes auf RNA-Ebene konnte zudem in ovariellen Endometriosen nachgewiesen werden (Fujimoto et al., 1996b).

1.6.5.2 Integrine

Integrine sind Heterodimere. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. Derzeit sind 17 α - und 8 β -Untereinheit identifiziert. Jede dieser Untereinheiten weist die typische Struktur der CAMs auf. Die Liganden-Spezifität der Integrine wird durch die Kombination der beiden Untereinheiten festgelegt.

Die β_1 -Subfamilie besteht aus bisher 10 identifizierten Heterodimeren. Sie erkennen Matrix-Proteine wie Fibronectin, Kollagene, Laminin, Vitonektin und Epiligrin.

Die Mitglieder der β_2 -Subfamilie werden auch als Leukozyten-Integrine bezeichnet. Sie vermitteln Zell-Zell-Interaktionen, die entscheidend für Entzündungsreaktionen und die Zell-vermittelte Immunantwort sind.

Die β_3 -Subfamilie besteht aus zwei Mitgliedern, $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$, den sogenannten Cytoadhäsinen, die u.a. bei Prozessen, wie der Wundheilung und Entzündungsreaktionen, durch Cytokine hochreguliert werden.

Durch die Integrin-vermittelte Zelladhäsion werden zahlreiche zelluläre Antworten ausgelöst (zur Übersicht: Brodt und Dedhar, 1996; Dedhar, 1999; Giancotti und Ruoslathi, 1999). Hierzu gehören sowohl die Regulation der Zell-Proliferation, des Zellzyklus und der Zell-Motilität als auch die Suppression der Apoptose, die Regulation der Genexpression, der Reorganisation des Aktin-Cytoskelett und die Polarisierung der Zelle.

Integrine stellen eine Verbindung zwischen der Extrazellulären Matrix und dem Cytoskelett, sowie Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion her. Die Signaltransduktion verläuft sowohl über Proteinkinasen wie FAK (,focal adhesion kinase') (Schaller et al., 1995), ILK (,integrin-linked kinase') (Cary et al., 1996) und MAPK (,mitogen-activated protein kinase') (Howe et al., 1998) als auch über Wachstumsfaktoren, wie PDGF (,platelet-derived growth factor'), EGF und VEGF (,vascular endothelial growth factor') (zur Übersicht: Giancotti und Ruoslathi, 1999). Zwischen β_1 -Integrin und EGF-R findet eine bidirektionale Interaktion über den MAPK-Signalweg statt (Wang et al., 1998).

Im humanen Endometrium werden unterschiedliche Integrin-Untereinheiten exprimiert. Eine zyklusunabhängige Expression zeigen α_2 , α_3 , β_1 und β_4 im endometrialen Epithel (Lessey et al., 1994; Albers et al., 1995). Eine zyklusabhängige Regulation konnte für α_1 , α_4 , α_6 und β_3 nachgewiesen werden. α_1 und α_4 sind, laut Lessey et al. (Lessey et al., 1994), nur in der Lutealphase nachweisbar. Albers et al., detektierten α_1 im Verlauf des gesamten Zyklus (Albers et al., 1995).

α_6 wird während der frühen bis mittleren Sekretionsphase stark, in den übrigen Zyklusphasen moderat exprimiert (Albers et al., 1995). Lessey et al. hingegen konnten keine Expressionsunterschiede im Verlauf des menstrualen Zyklus nachweisen (Lessey et al., 1994).

β_3 wird in der späten Sekretionsphase (Albers et al., 1995) bzw. während des Implantationsfensters, ebenso wie $\alpha_v\beta_3$, exprimiert (Lessey et al., 1994; Creus et al., 1998). Lessey et al. (Lessey et al., 1994b, 1995, 1996) zeigten zudem, dass eine Korrelation zwischen der aberranten Expression von $\alpha_v\beta_3$ und Infertilität als auch Endometriose besteht.

Ein Vergleich der Integrin-Expression eutoper Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose untereinander sowie mit ektopen Endometrien zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Regulation von α_6 , α_v , β_1 , β_2 und β_3 in den verschiedenen Gewebsarten und in Abhängigkeit von der Zyklusphase (Regidor et al., 1998). Ebenso wie Regidor et al. (Regidor et al., 1998) konnten auch Bridges et al. (Bridges et al., 1995) zeigen, dass β_3 in der Proliferationsphase exprimiert wird. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen von Lessey et al., die eine zyklusabhängige Regulation sowie eine veränderte Expression im Endometrium von Endometriose-Patientinnen von β_3 -Integrin beschreiben (Lessey et al., 1994, 1995).

Auch die Suppression von α_6 -Integrin in endometriotischen Läsionen (Rai et al., 1996) konnte von Regidor et al. (Regidor et al., 1998) nicht gezeigt werden.

Das detektierte Expressionsmuster von α_3 -Integrin variiert ebenso zwischen den einzelnen Studien. Regidor et al. konnten dieses Integrin in keiner endometrialen Probe von Endometriose-Patientinnen nachweisen (Regidor et al., 1998). Rai et al. beschreiben eine Abnahme der Expression in den Endometrioseherden (Rai et al., 1996).

1.7 Marker der inflammatorischen Kaskade

Die Endometriose ist assoziiert mit Entzündungsprozessen (Cirkel et al., 1993; Grosskinsky und Halme, 1993). Welche inflammatorischen Mediatoren hierbei eine Schlüsselrolle spielen, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

1.7.1 Selektine

Selektine gehören zu den Adhäsionsmolekülen. Sie vermitteln die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen, steuern die Einwanderung von T-Zellen in die peripheren Lymphknoten, und die Extravasation von Granulozyten in Entzündungsherde.

Man unterscheidet zwei Gruppen von Selektinen: die Leukozytenselektine (LECAM) und vaskuläre Selektine, wie E- und P-Selektin.

Um den Mechanismus, der an der Pathogenese von Endometriose-assoziierten Entzündungsreaktionen beteiligt ist, aufzuklären, wurde die Expression von E- und P-Selektin in endometriotischen Läsionen im Vergleich zum Endometrium analysiert.

Die Expression von E-Selektin im Endometrium variiert zelltypabhängig im Verlauf des Zyklus (Tabibzadeh et al., 1994). Epithelzellen exprimieren E-Selektin zyklusunabhängig, wohingegen in Endothelzellen und Stromazellen E-Selektin erst in der Sekretionsphase nachweisbar ist.

In 10 % der endometriotischen Läsionen konnte E-Selektin und in 20 % der Biopsien P-Selektin schwach detektiert werden. Weder die Zyklusphase noch die Stärke der peritonealen Entzündungsreaktion waren mit der Selektin-Expression korrelierbar (Schmidt et al., 2000).

1.7.2 Stickstoffmonoxid-Synthasen und Cyclooxygenasen

Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine sind beteiligt an der Induktion von Entzündungsreaktionen und Schmerz (zur Übersicht: Salvemini, 1997). Eine kontinuierliche Produktion dieser Moleküle bei chronischen Entzündungsprozessen wurde mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen der Herzkranzgefäße sowie Krebs in Verbindung gebracht.

1.7.2.1 NO und NO-Synthasen

NO ist ein wasserlösliches Radikal mit einer Halbwertszeit von etwa 4 s. Es ist in der Lage, Membranen durch Diffusion zu passieren. Es besitzt die Fähigkeit, mit Proteinen zu

assoziiieren, sie hierdurch zu modifizieren und letztendlich unterschiedliche Signalkaskaden auszulösen. NO spielt nicht nur bei den genannten Prozessen eine Rolle, sondern vermittelt u.a. auch die Endothel-abhängige Vasorelaxation (Palmer et al., 1987; Furchgott und Vanhoutten, 1987), Makrophagen-vermittelte Cytotoxizität (Moncada, 1992; Mulligan et al., 1992) und hemmt die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (Moncada, 1992). Zudem ist NO an allen wichtigen Prozessen der weiblichen Reproduktion beteiligt, wie dem Auslösen der Menstruation (Tseng et al., 1996; Tschuegguel et al., 1998), der Implantation, dem Erhalt der Schwangerschaft und dem Auslösen des Geburtsvorganges (Garfield et al., 1997; Tschuegguel et al., 1998b).

NO entsteht bei der durch NO-Synthasen katalysierten Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und NADPH. Derzeit sind drei Isoformen der NO-Synthasen (NOS) bekannt, das neuronale NOS (ncNOS, NOS I), das induzierbare NOS (iNOS, NOS II) und das endotheliale NOS (eNOS, NOS III) (zur Übersicht: Parkinson, 1997).

Das konstitutiv exprimierte eNOS kontrolliert vor allem über NO die Vasodilatation und Vasokonstriktion von Blutgefäßen (Knowles und Moncada, 1994). Das neuronale NOS ist vor allen Dingen im peripheren und zentralen Nervensystem aktiv (Huang et al., 1993).

Die Induktion von iNOS erfolgt durch Cytokine, wie IL-1 (Interleukin-1), TNF- α (tumor necrosis factor- α), Interferon- γ und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (Nathan, 1992). Die NO-Synthese durch die induzierbare Isoform der NO-Synthasen spielt vor allem bei Entzündungsreaktionen eine Rolle (zur Übersicht: Salvemini, 1997).

Sowohl eNOS als auch iNOS werden in Drüsenepithelzellen des humanen Endometriums exprimiert. eNOS konnte zudem in den endometrialen Endothelzellen und iNOS in den glatten Gefäßmuskulatur detektiert werden (Telfer et al., 1997; Cameron und Campbell, 1998).

1.7.2.2 Prostaglandine und Cyclooxygenasen

Prostaglandine sind Mediatoren, die zahlreiche physiologische Prozesse, wie Thrombozyten-Aggregation, Vasokonstriktion und Entzündungsprozessen beeinflussen. Aber auch während der Schwangerschaft und bei der Blastozysten-Implantation spielen die Prostaglandine eine Rolle (Asselin et al., 1997; Huang et al., 1998; Marions und Danielsson, 1999).

Als Ausgangssubstanz für die Prostaglandin-Synthese fungiert Arachidonsäure. Arachidonsäure wird mit Hilfe von Cyclooxygenasen (COX, Prostaglandin-

Endoperoxidsynthase, PGHS) zu Hydroperoxy-Endoperoxid (PGG₂) oxidiert und anschließend zu Hydroxy-Endoperoxid (PGH₂) reduziert. PGH₂ wiederum wird durch zahlreiche enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionen in unterschiedliche Prostaglandine (PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, u.a.) umgewandelt (Vane et al., 1998). Die von den Cyclooxygenasen katalysierten Reaktionen stellen die limitierenden Schritte der Prostaglandin-Synthese dar. Derzeit sind zwei Isoformen bekannt: COX-1 und COX-2.

COX-1, die in nahezu allen Zelltypen konstitutiv exprimierte Isoform, sorgt für die Aufrechterhaltung des basalen Prostaglandin-Niveaus in unterschiedlichen Geweben, z.B. in der Magenschleimhaut. Im humanen Endometrium wird COX-1 im luminalen und glandulären Epithel exprimiert (Marions und Danielsson, 1999).

COX-2, das bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielt, wird durch Cytokine, wie IL-1β, IL-2, TNF-α und LPS, stimuliert. Entzündungshemmende Cytokine, wie IL-4, IL-10 und IL-13, wirken sich negativ auf die COX-2-Induktion aus (zur Übersicht: Vane et al., 1998).

Im humanen Endometrium ist COX-2 sowohl in die Blutgefäße umgebenden Zellen als auch im Drüsenepithel und in der Dezidua detektierbar (Jones et al., 1997). Dass COX-2 eine wichtige Rolle während der Implantation und Dezidualisierung spielt, konnte durch Untersuchungen an COX-2 knock out-Mäusen gezeigt werden. Bei COX-2 knock out-Mäusen ist, im Gegensatz zu COX-1 knock out-Mäusen, die Implantation und der Dezidualisierungsprozess gestört (Lim et al., 1997).

1.7.2.3 Das Zusammenspiel von iNOS und COX-2 bei Entzündungsreaktionen

Sowohl iNOS als auch COX-2 spielen eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen.

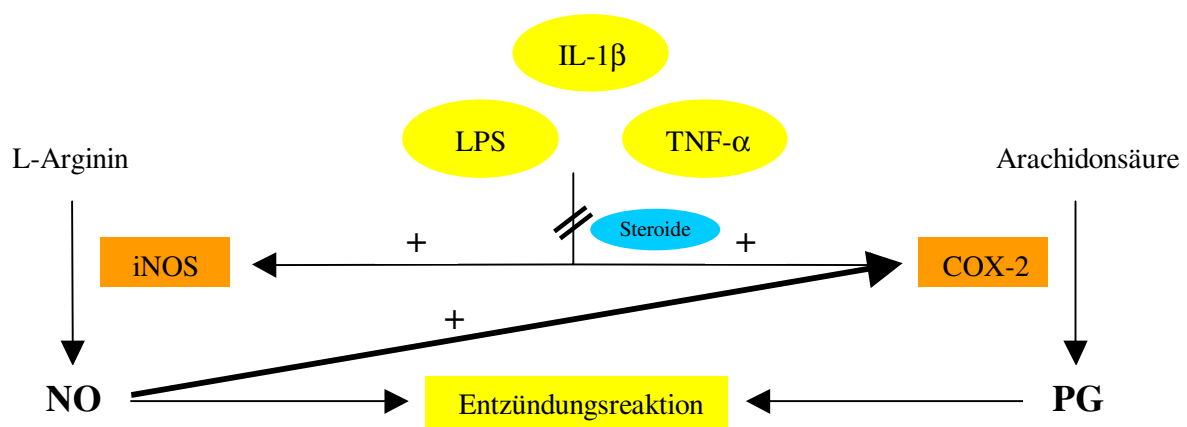


Abb. 3: Das Zusammenspiel von iNOS und COX-2 in Entzündungsprozessen (abgewandelt nach Salvemini, 1997)

Die Induktion der iNOS- bzw. COX-2-Aktivität durch Cytokine, wie IL-1β, TNF-α und LPS, resultiert in einer erhöhten NO- bzw. Prostaglandin (PG)-Produktion, was zu Entzündungsreaktionen führt. NO fördert die COX-2-Aktivität, was in einer gesteigerten PG Ausschüttung resultiert.

Beide Enzyme werden durch dieselben Cytokine, wie IL-1 β , TNF- α und LPS, induziert und durch entzündungshemmende Steroide, wie z.B. Dexamethason, blockiert (Moncada und Higgs, 1993; Masferrer und Seibert, 1994) (Abb.3).

NO ist in der Lage, durch die Bindung an die Häm-Gruppe im aktiven Zentrum der Cyclooxygenasen diese zu aktivieren und hierdurch die Prostaglandin-Synthese zu regulieren (Kanner et al., 1991; Salvemini et al., 1993).

Neben COX-2 beeinflusst NO auch die COX-1-Aktivität. Die COX-1-Aktivierung durch NO resultiert in einer erhöhten Freisetzung von PGE₂, was wiederum die Freisetzung von LHRH fördert (zur Übersicht: Salvemini, 1997). LHRH stimuliert die Freisetzung von LH und FSH aus dem Hypophysenvorderlappen und somit die Östrogenbildung.

Ob es einen Zusammenhang zwischen der COX und / oder NOS-Expression und der Endometriose und mit ihr einhergehenden Entzündungsreizen gibt, wurde bisher noch nicht untersucht.

2 Zielsetzung

Die molekularen Mechanismen, die als Ursache für die Pathogenese der Endometriose angesehen werden können, sind bis heute nicht aufgeklärt. Die zellbiologischen Untersuchungen zur Erfassung der Dedifferenzierung der Endometriose zeigen ein heterogenes Erscheinungsbild dieser Erkrankung. Dies lässt zum einen eine orts- und milieuspezifische Entwicklung der peritonealen Endometrioseherde vermuten, kann zum anderen auch ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei der Endometriose um eine multifaktorielle Erkrankung handelt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Dedifferenzierungsprozesse in peritonealen Endometrioseherden zu detektieren, die Hinweise auf die Pathogenese geben.

Zur gezielten Charakterisierung des Proliferations- und Invasionsverhaltens, sowie von Gefäß- und Entzündungsreaktionen der Endometrioseherde sollten vergleichende immunhistochemische Analysen von eutopen und ektopen Endometrien durchgeführt werden.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass bereits das Endometrium von Endometriose-Patientinnen Dedifferenzierungen aufweist, die verantwortlich für die Entstehung der Endometriose und mit ihr auftretenden Symptomen sein können.

Um diese Theorie zu bestätigen, sollten mit Hilfe von cDNA-Expressionsanalysen gezielt Veränderungen im endometrialen Genexpressionsmuster von Frauen ohne und mit Endometriose erfasst und mögliche Dedifferenzierung im Endometrium von Endometriose-Patientinnen detektiert werden.

Ein weiteres Ziel war die Etablierung von endometrialen Zelllinien, die es erlauben, die Bedeutung zell- und molekularbiologisch veränderter Parameter für die Entstehung der Endometriose und die Differenzierung des Endometriums zu testen, sowie neue Therapieansätze zu entwickeln. Zur Herstellung der endometrialen Zelllinien sollten die Primärzellen durch die Transformation mit verschiedenen Vektoren, die z.B. das SV40LT-Antigen und E1A kodierten, immortalisiert werden.

Sowohl die Zelllinien als auch die Primärkulturen sollten in bezug auf ihr Proliferationsverhalten, ihre Morphologie und die Expression verschiedener Differenzierungsmarker, die bereits in Zusammenhang mit der Endometriose untersucht wurden, charakterisiert und verglichen werden.

Die Erfassung des Dedifferenzierungsmusters sowohl der Endometrioseherde als auch der Endometrien von Endometriose-Patientinnen sollten Hinweise zum einen auf die Ursache der Endometriose, zum anderen auf neue Therapieansätze geben. Die Zellkulturmodelle stellen ein Werkzeug für Etablierung neuer Therapieansätze dar und ermöglichen es, den Einfluss von Mediatoren auf die endometriale Differenzierung zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Feinchemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem höchsten käuflichen Reinheitsgrad. Neben den gebräuchlichen Laborchemikalien wurden verwendet:

Albumin Bovine (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Atlas Human cDNA Expression Array	Clontech (Heidelberg)
Collagenase Typ I	Gibco BRL (Karlsruhe)
[α ³² P]dATP	Amersham Pharmacia (Freiburg)
DMEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
DMSO	Merck (Darmstadt)
100bp DNA Ladder	Gibco BRL (Karlsruhe)
1Kb DNA-Ladder	Gibco BRL (Karlsruhe)
DNaseI	Roche (Boehringer; Mannheim)
dNTP-Mix	Oncor (Heidelberg)
DTT	Gibco BRL (Karlsruhe)
Dynabeads anti-Epithelial Cell	Dynal (Hamburg)
Effectene	QIAGEN (Hilden)
EGF	ICN (Eschwege)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
EQUIBIO <i>In situ</i> -Küvetten	Peqlab (Erlangen)
EQUIBIO OptiMix-Medienkit	Peqlab (Erlangen)
β -Estradiol	ICN (Eschwege)
Eukitt	Kindler (Freiburg)
FCS	Gibco BRL (Karlsruhe)
Geneticin	Gibco BRL (Karlsruhe)
Ham's F-12	Biochrom KG (Berlin)
Heringssperma-DNA (DNA MB grade)	Roche (Boehringer; Mannheim)
Hygromycin	Roche (Boehringer; Mannheim)
LipofectAmin	Gibco BRL (Karlsruhe)
LSAB-Kit, DAB	DAKO (Hamburg)
Matrigel EHS solution	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)

Mineralöl für PCR	Sigma (Deisenhofen)
M-MLV Reverse Transcriptase + Puffer	Gibco BRL (Karlsruhe)
MOPS	Sigma (Deisenhofen)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	Gibco BRL (Karlsruhe)
Oligotex mRNA Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
One Shot-Kit (Top10F')	Invitrogen (Gronning, NL)
OptiMEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
PBS Dulbecco	Seromed (Berlin)
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	Roche (Boehringer; Mannheim)
RNaseOut	Gibco BRL (Karlsruhe)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
Siebewebe aus Polyamid 90 µm und 40 µm	neoLab (Heidelberg)
Superfect	QIAGEN (Hilden)
Taq Polymerase + Puffer + Magnesiumchlorid	Gibco BRL (Karlsruhe)
24mm-Transwell-Filter (Tissue Culture Treated Polyester Membrane, 24 mm, 0,4 µm)	Corning-Costar (Bodenheim)
1 x Trypsin /EDTA	Gibco BRL (Karlsruhe)
Vecta shield	Vector Laboratories (Peterborough, UK)
Zellkulturflaschen	Falcon
Zellkulturplatten	Falcon

3.2 Lösungen und Puffer

0,2 M Cacodylatpuffer	0,2 M Dimethylasinsäure-Natriumtrihydrat (Na-Cacodylat), 1,6 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O, 3,6 mM CaCl ₂ [pH 7,4]
10 x Denaturierungslösung	1 M NaOH, 10 mM EDTA
10 x DNaseI-Puffer	5 mM Tris/HCl [pH 7,5], 5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto Yeast Extract, 1 % NaCl
Lysispuffer	50 mM Tris/HCl [pH 7,5], 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS, 160 µg/ml, Proteinase K (frisch hinzugeben)
Moscona-Lösung	140 mM NaCl, 9 mM D-Glucose-Monohydrat, 4 mM KCl, 12 mM NaHCO ₃ , 0,4 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 0,2 mM KH ₂ PO ₄
10 x MOPS	0,2 M MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA
2 x Neutralisierungslösung	1 M NaH ₂ PO ₄ [pH 7,0]

2 x RNA-Probenpuffer	2 x MOPS, 1,6 M Formaldehyd, 50 % (v/v) entionisiertes Formamid, 20 % Glycerol, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylenxanol blau, 90 µg/ml Ethidiumbromid
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat
Waschpuffer (Dynabeads)	1x PBS, 0,1 % Casein
1 x TE	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

3.3 Humane Gewebeproben

3.3.1 Endometrium

Alle endometrialen Gewebeproben, die in den folgenden Versuchen eingesetzt wurden, wurde von Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter entnommen, die sich in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus befanden. Die Gewebentnahme erfolgte entweder aus ektomierten Uteri von Frauen mit Uterus myomatosus oder hysteroskopisch im Rahmen z.B. einer Sterilitätsabklärung. Die Gewebeproben stammten zudem von Patientinnen mit Menstruationsschmerzen, Unterbauchschmerzen und Verdacht auf Endometriose.

Alle operativen Gewebentnahmen erfolgten in der Abteilung für Gynäkologie am Universitätsklinikum Essen und die mit diesen Biopsien durchgeführten Experimente erfolgten im Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen. Die Gewebentnahme mit anschließender Bearbeitung wurde von der örtlich zuständigen Ethikkommission genehmigt.

Von allen Patientinnen wurden folgende periphere Serumhormonwerte ermittelt: Ethylestradiol (E₂), Progesteron (P), LH und FSH. LH und FSH sind Gonadotropinhormone, die die Östrogenbildung im reifen Follikel des Ovars induzieren.

Desweiteren wurde für die Untersuchungen berücksichtigt, ob die Patientinnen Hormon-Präparate bzw. Präparate, die den Hormonhaushalt beeinflussen, eingenommen haben.

Es wurde zudem zwischen Endometrien von Frauen ohne nachweisbarer Endometriose und solchen Patientinnen, bei denen laparoskopisch endometriotische Läsionen oder Schokoladenzysten nachgewiesen werden konnten, unterschieden.

Nach Entnahme der endometrialen Probe wurde diese in Moscona-Lösung gewaschen, um mögliche Verunreinigungen durch Blut zu vermeiden. Die Uterusschleimhaut, die für Kryostatschnitte oder RNA-Isolierung verwendet werden sollte, wurde direkt bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Von dem übrigen Gewebe, das für Zellkultur-Experimente eingesetzt werden sollte, wurden unter sterilen Bedingungen Epithelzell-Aggregate und Stromazellen isoliert und kultiviert.

3.3.2 Endometriotische Läsionen

Bei Patientinnen mit begründetem Endometriose-Verdacht wurde eine Bauchspiegelung durchgeführt.

Endometriotische Läsionen wurden laparoskopisch entnommen. Die in dieser Arbeit immunhistochemisch untersuchten Endometrioseherde waren vornehmlich im Douglas-Raum, an den Ligamenta sacrouterina, am Blasendach und an den Ligamenta lata lokalisiert.

Die Herde wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Primär- und Sekundärantikörper

Die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper wurden für immunhistochemische Untersuchungen an humanem Endometrium und Endometriosebiopsien sowie an primären endometrialen Zellen und im Rahmen dieser Arbeit etablierten Zelllinien eingesetzt. Die Verdünnungen wurden anhand von Verdünnungsreihen (Schachbrett-Titration) ausgetestet (Tab. 1, 2). Die Herstellerangaben wurden als Richtwert berücksichtigt.

3.4.2 Herstellung und Fixierung von immunhistochemischen Präparaten

3.4.2.1 Kryostatschnitte

Von den in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gewebeproben wurden an einem Kryostaten (Cryotom AS620, Shandon) $7\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitten wurden für 1 h bei RT getrocknet und anschließend mit bei -20°C gelagertem 96 % Ethanol für 10 min fixiert.

Von jeder Biopsie wurden jeweils zwei Präparate immunhistochemisch analysiert. Ein Schnitt diente jeweils als Negativ-Kontrolle.

Tab. 1 : Eingesetzte Primärantikörper

Primär-antikörper	Wirt	Antigenspezifität	Verdünnung	eingesetzte Konzentration [µg/ml]	Firma
E-Cadherin ¹	monoklonal Maus	Mensch	1:50	5	Transduction Laboratories [C20820]
E-Cadherin ²	monoklonal Maus	Mensch	1:50	7	Dianova [C37020-50]
Cox-1	polyklonal Ziege	Mensch	1:100	2	Santa Cruz [sc-1752]
Cox-2	polyklonal Ziege	Mensch	1:8	25	Santa Cruz [sc-1745]
Cytokeratin	monoklonal Maus	Mensch	1:100	1,3	DAKO [M0821]
Desmin	monoklonal Maus	Mensch	1:50	5	DAKO [M0760]
EGF	monoklonal Maus	Mensch	1:30	8	Dianova [GF07L]
EGF-R	monoklonal Maus	Mensch	1:7,5	30	DAKO [M0886]
ER α	polyklonal Kaninchen	Mensch	1:10	20	Santa Cruz [sc-543]
ER β	polyklonal Kaninchen	Mensch	1:500	2	ABR [PA1-311]
ER	monoklonal Maus	Mensch	DAKO ER/PR System ³		DAKO [K1900]
Integrin α_3	monoklonal Maus	Mensch	1:50	4	Chemicon [MAB2056]
Integrin α_6	monoklonal Ratte	Mensch	1:50	4	Chemicon MAB1972]
Integrin α_v	monoklonal Maus	Mensch	1:50	20	Chemicon [MAB1980]
Integrin β_1	monoklonal Ratte	Mensch	1:50	n.b.	Dr. C Damsky, University of California
Integrin β_2	monoklonal Maus	Mensch	1:50	20	Chemicon [MAB1962]
Integrin β_3	polyklonal Kaninchen	Mensch	1:50	4	Chemicon [MAB1932]
α E-Katenin	polyklonal Ziege	Mensch, Maus, Ratte	1:100	2	Santa Cruz [sc-1495]
β -Katenin	polyklonal Kaninchen	Mensch, Maus	1:2000	30	SIGMA [C-2206]
Ki67	monoklonal Maus	Mensch	1:100	0,5	NOVO CASTRA über Medac [NCLKi67MM1]
eNOS	polyklonal Kaninchen	Mensch	1:100	150	SIGMA [N3893]
iNOS	polyklonal Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	1:500	n.b.	CALBIOCHEM [482728]
PR	monoklonal Maus	Mensch	DAKO ER/PR System ³		DAKO [K1900]
Vimentin	monoklonal Maus	Mensch	1:25	12	DAKO [M0725]
ZO-1	polyklonal Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	1:200	5	Zymed [61-7300]

¹ verwendet für die immunhistochemischen Untersuchungen der Primärzellkulturen und Zelllinien

² verwendet für immunhistochemische Untersuchungen der Gewebeschnitte

³ gebrauchsfertig

n.b.: Konzentration des Antikörpers in der Stammlösung ist nicht bekannt

Tab. 2: Eingesetzte Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	konjugiert mit ...	Verdünnung	eingesetzte Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Firma
Schwein-anti-Kaninchen IgG	FITC	1:40	27,5	DAKO [F0205]
Kaninchen-anti-Ziege IgG	FITC	1:40	60	DAKO [F250]
Kaninchen-anti-Maus IgG	FITC	1:100	27	DAKO [F0232]
Kaninchen-anti-Ratte IgG	FITC	1:50	102	DAKO [F234]

3.4.2.2 Zellkulturpräparate

Zum Nachweis von Antigenen in primären endometrialen Epithel- und Stromazellen sowie in Zelllinien wurden die zu untersuchenden Zellen auf mit Matrigel-beschichteten Deckgläschen kultiviert. Das Matrigel wurde mit Kulturmedium 1:50 verdünnt. Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden diese zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen und in Ethanol-Aceton (1:1) für 15 min bei RT fixiert.

Neben den immunhistochemisch analysierten Zellpräparaten wurden für jede Zellkultur Negativ-Kontrollen durchgeführt.

3.4.3 Immunhistochemische Nachweisverfahren

Für immunhistochemische Untersuchungen von histologischen und zytologischen Präparaten wurden in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Antigen zwei unterschiedliche indirekte Nachweisverfahren angewandt, die LSAB-Methode („Labelled StreptAvidin-Biotin Staining“) und die Fluoreszenzmarkierung.

Bei indirekten Färbemethoden bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen im Präparat. Zur Lokalisation des Antigen-Antikörper-Komplexes wird ein zweiter Antikörper benötigt. Dieser Sekundärantikörper ist zum einen gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörper gerichtet und zum anderen mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem Enzym oder wie bei der LSAB-Methode mit Biotin konjugiert. Durch Anregung mit Licht spezifischer Wellenlänge im Falle des Fluoreszenzfarbstoffes oder chromogenen Reaktionen lässt sich dann der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar machen.

3.4.3.1 Fluoreszenzmarkierung

Der überwiegende Anteil der Gewebeproben und alle Zellkulturpräparate wurde immunhistochemisch mit der Fluoreszenztechnik untersucht.

Fixierte Kryostatschnitte bzw. Zellkulturpräparate wurden zweimal jeweils 5 min mit PBS gewaschen und danach 10 min mit 1-2 % PBS-BSA Lösung behandelt, um unspezifische

Bindungsstellen zu blockieren. Die PBS-BSA-Lösung wurde vorsichtig abgenommen und der erste Antikörper auf das Präparat gegeben. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte entweder 1 h bei RT oder üN bei 4°C in einer feuchten Kammer. Durch zweimaliges Waschen mit PBS-BSA über einen Zeitraum von 5 min wurden ungebundene Reste des ersten Antikörpers entfernt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Präparate mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper über einen Zeitraum von 45 min bei RT unter Lichtausschluß. Die Präparate wurden hiernach einmal 5 min und einmal 30 min mit PBS unter Lichtausschluß gewaschen und kurz mit Aqua dest. gespült. Die Präparate wurden in Vecta shield (Vector Laboratories) eingedeckt und im Dunkeln bei 4 °C bis zur Auswertung aufbewahrt.

Zur Auswertung wurde ein Axiophot mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Zeiss) benutzt. Die Auswertung der FITC-markierten Proben erfolgte unter Anregung durch Licht der Wellenlänge 450 – 490 nm.

3.4.3.2 LSAB-Methode

Die LSAB-Methode ist ein Drei-Schritt-Verfahren. Bei dieser Methode bindet der Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen (1. Schritt). Der biotinylierte Sekundärantikörper fungiert als Brückenantikörper (2.Schritt). An diesen Brückenantikörper wiederum bindet ein Komplex aus Streptavidin, das eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin besitzt, und der Meerrettich-Peroxidase (3. Schritt). Die Peroxidase bildet mit Wasserstoffperoxid bei Anwesenheit eines Elektronendonors, z.B. das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid), einen Komplex, der anschließend zu Wasser und atomarem Sauerstoff zerfällt. Das Chromogen wird oxidiert und durch Oxidation des DAB entsteht ein braunes Reaktionsprodukt.

Fixierte Kryostatschnitte wurden wie für die Fluoreszenztechnik beschrieben mit PBS gewaschen, mit BSA blockiert und mit dem Primärantikörper 1 h bei RT bzw. üN bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen in PBS-BSA wurden die Schnitte nun zuerst für 30 min bei RT mit dem biotinylierten Brückenantikörper und anschließend für 30 min mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex inkubiert. Anschließend wurde die Substrat-Chromogen-Lösung, bestehend aus Wasserstoffperoxid und DAB auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden mit Aqua dest. gespült und mit Eukitt, einem Xylol-haltigem Eindeckmittel, eingedeckt.

Unabhängig vom immunhistochemischen Nachweisverfahren wurden von jeder Biopsie zwei Präparate auf die Expression des zu analysierenden Antigens untersucht. Jeweils ein Präparat fungierte als Negativ-Kontrolle. Bei der Negativ-Kontrolle wurde der Primärantikörper durch PBS-BSA-Lösung ersetzt und das Präparat nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

Die Auswertung der Präparate erfolgte unabhängig voneinander an unterschiedlichen Tagen, um eine objektive Einschätzung der Fluoreszenzintensität bzw. Erhebung der Proliferationsaktivität zu gewährleisten.

3.5 Molekularbiologische Arbeiten

3.5.1 Transformation kompetenter Bakterien

50 µl kompetente Bakterien (Top10F', One Shot Kit, Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut und 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol hinzugegeben. 0,5 µg Plasmid-DNA wurden hinzupipettiert und durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze mit den Bakterien vermischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42°C und 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) zupipettiert. Die transformierten Bakterien wurden bei 37°C, 180 Upm 1 h geschüttelt. 100 µl der Bakterien wurden mit einem Drygalskispatel auf eine Agaroseplatte, die entweder 100 µg/ml Ampicillin oder im Falle von pEGFP-C1 30 µg/ml Kanamycin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Amplifizierung einer Bakterienkolonie wurde diese in Kompletmedium Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) üN bei 37°C im Schüttler kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) isoliert und anschließend mittels Restriktionsanalyse charakterisiert.

Zur dauerhaften Lagerung von transformierten Bakterien wurden 300 µl 50 %iges Glycerin, als Frostschutzmittel, und 700 µl Bakterienkultur gemischt und bei -80°C eingefroren.

3.5.2 Endotoxin-freie Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurde eine Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium angeimpft. Abhängig vom Resistenzgen wurden entweder 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin zum LB-Medium hinzugegeben.

Um endotoxin-freie Plasmid-DNA, Endotoxine können sich negativ auf die Transfektion auswirken, zu isolieren, wurde der „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus der Übernachtskultur wurde, wie im „EndoFree Plasmid

Maxi“ Protokoll beschrieben, durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 800 µl Aqua dest. gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.5.3 Restriktionsanalyse

Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse besteht die Möglichkeit, die Identität eines Plasmids zu überprüfen.

0,5 µg Plasmid-DNA wurden hierzu in 1 x Probenpuffer mit 2,5 U eines oder mehrere Restriktionsenzym(e) für 1,5 –3 h verdaut. Die durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente wurden auf einem 0,8 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Das auf dem Gel sichtbare Bandenmuster wurde mit den zu erwartenden Fragmentgrößen, sie wurden anhand der Restriktionskarte des Plasmids berechnet, verglichen.

3.5.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus humanem Endometrium wurde mit Hilfe des „RNeasy Midi-Kits“ (QIAGEN) isoliert. Das in flüssigem Stickstoff eingefrorene und bei –80°C gelagerte Endometrium wurde in 3,8 ml RLT-Puffer mit Hilfe eines Homogenisators (Polytron PT300, Kinematica AG) bei maximaler Umdrehungszahl 1,5 min auf Eis homogenisiert. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA aus endometrialem Gewebe erfolgte nach dem Protokoll „RNeasy Midi Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues“. Die Gesamt-RNA wurde insgesamt in 200 µl RNase-freiem Wasser eluiert

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde der „RNeasy Mini-Kit“ (QIAGEN) verwendet. Endometriale Primärzellen sowie die etablierten Zelllinien wurden trypsinisiert und in Moscona-Lösung resuspendiert. Nach 8-minütiger Zentrifugation bei 800 UpM (Labofuge M, Heraeus Sepatech) wurden die Zellen entweder direkt für die RNA-Isolierung verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurden diese in RLT-Puffer resuspendiert. Lysiert wurden die Zellen durch 2-minütiges vortexen und zudem mehrfachem Aufziehen durch eine Kanüle (Terumo 23G x 1'', 0,6x 25 mm, NEOLUS). Die Isolierung der RNA erfolgte gemäß dem Protokoll „RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells“. Die RNA wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.5.5 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA

Poly A⁺ RNA wurde mit Hilfe der „Oligotex mRNA Spin-Column“-Methode (QIAGEN) aus der endometrialen Gesamt-RNA, welche vorher DNaseI behandelt worden war, isoliert. Die mRNA wurde von den sogenannten Spin-Columns mit insgesamt 100 µl OEB-Puffer bei 70°C eluiert und anschließend zur Einengung des Volumens in Ethanol gefällt.

3.5.6 DNase-Behandlung von Gesamt-RNA

Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen in RNA-Proben wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden maximal 100 µg Gesamt-RNA in 1 x DNaseI-Puffer mit 20 U DNaseI für 1h bei 37°C behandelt. Zur Inaktivierung und Entfernung der DNase und anderer Proteine in der RNA-Probe erfolgte nach dem Verdau eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Die RNA wurde hiernach in Ethanol gefällt.

3.5.7 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

RNA kann auf denaturierenden Agarosegelen aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße der einzelnen Spezies aufgetrennt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. Zur Herstellung des Gel wird die Agarose in Wasser gelöst und anschließend 1/10 Volumen des Endvolumens 10 x MOPS hinzugegeben. Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen in der RNA enthielt das Agarosegel zudem 1 M Formaldehyd.

Die RNA-Probe wurden bei 65°C für 10 min denaturiert. Um die erneute Ausbildung von Sekundärstrukturen zu unterbinden, wurde zur RNA-Probe 1 Volumen 2 x RNA-Probenpuffer hinzugegeben, der u.a. 1,6 M Formaldehyd und 50 % (v/v) Formamid enthielt. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 55 V in 1 x MOPS. Unter UV-Licht, der Probenpuffer enthielt Ethidiumbromid, konnte nach der Auftrennung anhand der rRNA-Banden die Qualität der RNA überprüft und mögliche Degradationen, z.B. durch RNasen, ausgeschlossen werden.

3.5.8 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen im Photometer

DNA und RNA zeigen in Lösung eine Absorption von UV-Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei ist die Konzentration der Lösung proportional zur gemessenen Extinktion. Eine Extinktion von 1,0 entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml DNA. Zur Messung der Absorption im RNA / DNA Calculator Gene Quant II (Pharmacia Biotech) wurden Quarzküvetten verwendet.

3.5.9 Fällung von Nukleinsäuren

DNA bzw. RNA wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol mindestens 30 min bei -80°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 14000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand entfernt und das Nukleinsäure-Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Ethanol-Überstandes wurde die Nukleinsäure im Exikator unter Vakuum getrocknet und in Wasser gelöst.

3.6 cDNA-Expressionsanalysen (abgewandelt nach dem „Atlas cDNA Expression Arrays User Manual“ der Firma CLONTECH)

Für die cDNA-Expressionsanalysen wurden die „Atlas Human cDNA Expression Arrays“ von CLONTECH (#7740-1) verwendet.

Für die ersten Analysen wurde jeweils 1 μg endometriale mRNA, in späteren Versuchen 5 μg endometriale Gesamt-RNA eingesetzt. Die mRNA wurde, wie unter „Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA“ (3.5.5) bzw. „Isolierung von Gesamt-RNA“ (3.5.4) beschrieben, aufgearbeitet.

3.6.1 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

Zur Herstellung radioaktiv-markierter cDNA-Sonden wurde mRNA revers transkribiert. Hierzu wurden 1 μg mRNA bzw. 5 μg Gesamt-RNA mit 1 μl 10 x CDS Primer Mix gemischt und 2 min bei 70°C denaturiert. Nachdem die Probe anschließend 2 min auf 50°C abgekühlt worden war, wurden 8 μl Master-Mix, der radioaktiv-markiertes dATP enthielt, hinzupipettiert. Die Probe durfte währenddessen nicht aus dem Heizblock entnommen werden. Nach einer Inkubation von 25 min bei 50°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μl Terminationsmix gestoppt.

Master-Mix: 2 μl 5 x Reaktionspuffer
 1 μl 10 x dNTP-Mix
 3,5 μl 10 mCi/ml [α ^{32}P]dATP
 0,5 μl 100 mM DTT
 1 μl MMCV Reverse Transkriptase (keine Konzentrationsangabe !)

3.6.2 Säulenchromatographie (CHROMA-Spin 200 Säulen)

Zur Entfernung nicht-eingebauter Nukleotide und cDNA-Fragment von weniger als 100 bp-Länge wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt. Die sogenannte „CHROMA-Spin 200“-Säule wurde zuerst mindestens 1 h auf RT erwärmt. Nach dem Resuspendieren der Gelmatrix wurde das DEPC-Wasser aus der Säule gelassen, bis die Matrixkügelchen auf der Oberfläche sichtbar waren. Falls die Matrix nicht bis zur vorgegebenen 1 ml-Markierung reichte, musste Säulenmaterial nachgefüllt werden.

Die radioaktiv-markierte cDNA wurde nun auf das Zentrum der Matrixoberfläche gegeben. Nachdem die Probe von der Matrix absorbiert worden war, wurden zuerst 40 µl anschließend 250 µl Aqua dest. auf die Säule geben. In beiden Fällen wurde die am Ende der Säule aufgefangene Flüssigkeit verworfen.

Hiernach wurden 100 µl Aqua dest. auf die Säulen pipettiert und die durchgelaufene Flüssigkeit, die Matrixkügelchen mußten auf der Oberfläche sichtbar sein, als 1. Fraktion aufgefangen. Dieser Schritt wurde noch fünfmal wiederholt. Von den Fraktionen 1-6 wurde jeweils 1 µl entnommen und zur Bestimmung der Einbaurrate der radioaktiven Nukleotide in die cDNA eingesetzt.

3.6.3 Bestimmung der Einbaurrate radioaktiv-markierter Nukleotide nach Verwendung der CHROMA-Spin 200-Säulen

Die Bestimmung der Einbaurrate von ^{32}P in die cDNA-Sonden erfolgte nach der Cerenkov-Methode für Szintillationsmessungen. Jeweils 1 µl pro Fraktion wurde in einem Szintillationsröhrchen gegeben und die Einbaurrate über einen Zeitraum von 1 min im Tritiumkanal gemessen. Anhand der gemessenen Zerfallsrate [IpM] in den einzelnen Fraktionen wurde ein Elutionsprofil erstellt. Dieses Elutionsprofil sollte bei optimal verlaufener Markierung der cDNA in Fraktion 2 und 3 einen starken Anstieg der gemessenen Impulse zeigen. In diesen Fraktionen war die markierte cDNA enthalten. In den Fraktionen 5 und 6 befanden sich die nicht eingebauten Nukleotide.

Die Fraktionen 2 und 3, mit den markierten cDNA-Sonden, wurden zusammengegeben und für die Hybridisierung der Arrays vorbereitet.

3.6.4 Säulenchromatographie (Atlas NucleoSpin® Extraction Kit)

Im zweiten „Atlas Human cDNA Expression Array-Kit“ wurde statt der CHROMA-Spin 200-Säulen der „Atlas NucleoSpin® Extraction Kit“ zum Entfernen nicht-eingebauter Nukleotide und cDNA-Fragmente bis 100 bp-Länge mitgeliefert.

Nach Abstoppen der Reversen Transkription wurde die cDNA-Probe mit NT2 auf 200 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann auf „NucleoSpin® Extraction Spin Columns“ gegeben und 1 min bei 14000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Filtrat verworfen. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit 400 µl NT3 erfolgte die Elution der cDNA mit 100 µl NE. Nach 2-minütiger Inkubation bei RT wurde die Probe bei 14000 UpM 1 min zentrifugiert. 1 µl des Eluats wurde zur Messung der Einbaurate in ein Szintillationsröhrchen überführt. Die Bestimmung der Einbaurate erfolgte nach der Cerenkov-Methode im Tritiumkanal.

3.6.5 Ammoniumacetat-Fällung

Zum Entfernen der restlichen freien Nukleotide wurde zusätzlich zu den von CLONTECH vorgegebenen Aufreinigungsverfahren eine Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt. Hierzu wurden zu 100 µl Eluat 144 µl 7,5 M Ammoniumacetat sowie 300 µl 100 % Ethanol gegeben und die cDNA für 1 h bei -80°C gefällt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 14000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen. Das cDNA-Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei 56°C getrocknet. Die cDNA wurde hiernach in 100 µl TE (Tris/HCl-EDTA) gelöst. 1 µl der Probe sowie 1 µl des Ethanol-Überstandes wurden für Szintillationsmessung verwendet.

3.6.6 Hybridisierung der Atlas Arrays

Für die Vorhybridisierung wurden die Atlas Arrays vollständig mit Aqua dest. benetzt und zügig, ohne dass die Membran antrocknete, in eine Hybridisierungsröhre überführt. 5 ml 68°C -warme ExpressHyb-Lösung, die 0,5 mg denaturierte Heringssperma-DNA (DNA, MB grade, Boehringer Mannheim) enthielt, wurden hinzugegeben und die Nylonmembranen für mindestens 30 min bei 68°C bei 5-8 UpM („Micro-4“ Hybaid) vorhybridisiert.

Die für die Hybridisierung eingesetzte cDNA-Konzentration wurde anhand der Einbaurate festgelegt. Die gemessenen Impulse pro cDNA-Probe sollten in einem Bereich von 0,5 bis $2 \cdot 10^6$ IpM / ml Hybridisierungslösung liegen.

Die cDNA-Probe wurde auf 200 µl mit TE (Tris/HCl-EDTA) aufgefüllt und 1/10 Volumen 10 x Denaturierungslösung* hinzugegeben. Die cDNA wurde 20 min bei 68°C denaturiert. Anschließend wurden 5 µg C_{0t-1} DNA sowie 1 Volumen 2 x Neutralisierungslösung* hinzupipettiert und 10 min bei 68°C inkubiert. Die Sonde wurde nun mit 10 ml 68°C -warmer ExpressHyb-Lösung und 1 mg denaturierter Heringssperma-DNA gemischt. Die

Vorhybridisierungslösung wurde durch die Hybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte in 68°C bei 5-8 UpM (Micro-4 Hybaid).

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde wurde der Atlas Array mit Lösungen abnehmender Salzkonzentration und damit steigender Stringenz gewaschen. Die ersten vier Waschschriffe erfolgten in einer Lösung aus 2 x SSC und 1% SDS*, die letzten beiden in einer Lösung aus 0,1 x SSC und 0,5 % SDS*. Alle Waschschriffe wurden für einen Zeitraum von jeweils 30 min bei 68°C im Schüttelwasserbad durchgeführt.

Die Detektion der Signale erfolgte durch Auflegen des BioMax MS Röntgenfilms (Kodak) und der dazugehörigen Verstärkerfolie auf dem eingeschweißten Atlas Array. Die Exposition erfolgte, abhängig von der Signalstärke, über einen Zeitraum von 3 h bis 6 Tagen bei -80°C. Vor einer erneuten Hybridisierung des Atlas Arrays wurde dieser zum Entfernen der alten Sonde 10 bis 20 min in 0,5 % SDS gekocht und anschließend 30 min bis 1 h bei 80°C unter Schütteln gewaschen.

* nicht im Atlas Human cDNA Expression Array-Kit enthalten

3.6.7 Densitometrische Auswertung der cDNA-Expression-Arrays

Die Auswertung der Atlas Arrays erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms Aida 2.0, beta. Hierzu wurde von jedem Doppelsignal der lokale Hintergrund abgezogen und die Intensität des Signals in Relation zur Intensität des β -Aktin-Signals gesetzt. Die Intensität des β -Aktin-Signals wurde als Faktor 1.0 definiert.

3.7 Polymerase-Kettenreaktion

3.7.1 Oligonukleotide und PCR-Bedingungen

Alle in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

3.7.2 RT-PCR

Eine geeignete Technik zum Nachweis der Expression von transfizierten Genen in Zelllinien oder Transkripten geringer Konzentration in Zellen oder Geweben eignet sich die RT-PCR.

3.7.2.1 Reverse Transkription

Im ersten Schritt der Reversen Transkription wurde zur Beseitigung von Sekundärstrukturen 1 μ g Gesamt-RNA 10 min bei 65°C denaturiert. Nach 5-minütiger Kühlung der RNA auf Eis

wurde der RT-Mix hinzugegeben. Im Verlauf der 1-stündigen Inkubation bei 37°C wurde der komplementäre cDNA-Strang synthetisiert. Zur Inaktivierung des Enzyms und Denaturierung des RNA-cDNA-Doppelstranges wurde der RT-Ansatz anschließend für 5 min auf 90°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. 5 bis 10 µl des RT-Ansatzes wurden zur cDNA- Amplifikation in die PCR eingesetzt.

RT-Mix:

- 1 x First strand buffer
- 10 mM DTT
- 0,5 mM dNTP-Mix (jeweils)
- 12,5 ng Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer
- 40 U RNaseOut
- 200 U M-MLV-Reverse Transcriptase
- ad 20 µl RNase-freies Wasser

Tab. 3: Charakteristika der verwendeten Oligonukleotide

Primer-Bezeichnung	Strang	Sequenz (5'→3')	Genbank-nummer	Position	T _m
SVLTup	sense	ACTCACTGCGTTCCAGGCAATG	J02400	3134-3154	60°C
SVLTdown	antisense	CTGGAGTTGCTTGGCTACTCTG		3631-3652	
E1Aup	sense	CCTTGGTCCTGTCGTATCAGGA	X73487	522-543	60°C
E1Adown	antisense	CCAGTACTATTCCGGTGGTGCT		990-1011	
E1BLup	sense	ACTGGTTAGAGCCATGGGAGGA	X73487	2280-2301	60°C
E1BLdown	antisense	CTGCTACCACACTCACACTGTC		3159-3180	
E1BSup	sense	TTCAGAGCGTTCGCCAGCTCTT	X73487	1570-1591	60°C
E1BSdown	antisense	GCGCCAGCGAGTAAATGCAAAC		1932-1953	
Earup	sense	ACTGCGTGGTGTGCGGGGACAAGT	X12794	866-889	69°C
Eardown	antisense	CCGGAAGCACTTCTTGAGACGGCAGTA		1030-1056	
FLT-1up	sense	ACTTGTCGTGTAAGGAGTGGAC	X51602	1177-1198	60°C
FLT-1down	antisense	GACAATTAGAGTGGCAGTGAGG		1500-1521	
HSP27up	sense	GAGGAGTGGTCGCAGTGGTTAG	X54079	170-191	64°C
HSP27down	antisense	TACTTGGCGGCAGTCTCATCGG		648-669	
ICAM1up	sense	GGTGACAGTGAAGTGTGAGG	J03132	1038-1057	60°C
ICAM1down	antisense	ATAGAGGTACGTGCTGAGGC		1547-1566	
IGFIIup	sense	ACACCCTCCAGTTCGTCTGTG	M29645	366-386	60°C
IGFIIIdown	antisense	TGCTCACTTCCGATTGCTGGC		776-796	
Intbeta1up	sense	TGATCCCTAAGTCAGCAGTAG	X07979	1155-1175	60°C
Intbeta1down	antisense	TCACAATGTCTACCAACACGC		1585-1605	
RANTESup	sense	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGCC	M21121	121-143	64°C
RANTES down	antisense	TTCACGCCATTCTCCTGCCTCAG		641-663	
beta-actin 5'*	sense	CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA	X00351	143-163	65°C
beta-actin 3'*	antisense	TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG		369-385	
PRLup	sense	AACCTCTCCTCAGAAATGTTTCAGC	D00411	147-170	60°C
PRLdown	antisense	AAGAAGCTTGCAATGGAACGGATC		696-721	

* spezieüberspannend

3.7.2.2 PCR

Zum Nachweis der Expression eines bestimmten Transkriptes wurde die zu diesem Transkript komplementäre cDNA mittels PCR amplifiziert. 5 bzw. 10 µl des RT-Ansatzes wurden zusammen mit genspezifischen Primern in die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz:

x µl RT-Ansatz
 1 x PCR-Puffer ohne Mg²⁺
 0,3 mM dNTP-Mix
 2 mM MgCl₂
 25 pmol sense-Primer
 25 pmol antisense-Primer
 2,5 U *Taq* DNA Polymerase
 ad 50 µl Aqua dest.

PCR-Verlauf:

5 min 94°C
 30 s 94°C
 30 s T_m
 45 s 72°C
 10 min 72°C

} x 35

Die oben beschriebenen PCR-Parameter gelten für alle RT-PCR-Versuche mit den in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotiden.

3.7.3 Semiquantitative RT-PCR

Zum Vergleich des relativen Expressionslevels eines Gens in unterschiedlichen Geweben oder in unterschiedlichen Proben eines Gewebsart eignet sich u.a. die semiquantitative RT-PCR.

Tab. 4: Reaktionsbedingungen der semiquantitativen RT-PCR

	Ear-2	FLT-1	HSP27	ICAM-1	IGFII	β ₁ -Integrin	RANTES
RT-Ansatz*	3 µl						
PCR-Puffer (-Mg ²⁺)	1x						
dNTP-Mix (je 5 mM)	0,3 mM						
MgCl ₂	2 mM						
beta-actin 5'	50 pmol	25 pmol	25 pmol	50 pmol	50 pmol	50 pmol	25 pmol
beta-actin 3'	50 pmol	25 pmol	25 pmol	50 pmol	50 pmol	50 pmol	25 pmol
sense Primer	12,5 pmol	25 pmol	50 pmol	25 pmol	12,5 pmol	25 pmol	25 pmol
antisense Primer	12,5 pmol	25 pmol	50 pmol	25 pmol	12,5 pmol	25 pmol	25 pmol
Taq-Polymerase	2,5 U						
Aqua dest.	ad 50 µl						
T _m	66°C	60°C	63°C	60°C	63°C	60°C	66°C
Anzahl der Zyklen	29	29	31	29	31	29	29

* Es wurden 1 µg Gesamt-RNA in die RT-Reaktion eingesetzt

Bei dieser Methode wird gleichzeitig die cDNA des zu untersuchenden Gens und die cDNA eines konstitutiv exprimierten Gens, in diesem Fall β-Aktin, in einem Ansatz amplifiziert.

Die Bedingungen für die semiquantitative RT-PCR wurden so gewählt, dass eine quantitative Auswertung der PCR-Produkte möglich war. Hierzu mussten alle Faktoren ausgeschlossen

werden, die eine exponentielle Amplifikation der PCR-Produkte störten. Die in die PCR eingesetzte DNA-Konzentration musste so gering wie möglich sein, und die Anzahl der PCR-Zyklen wurde so gewählt, dass die Amplifikation beider PCR-Produkte auch noch im letzten PCR-Zyklus exponentiell verlief.

PCR-Verlauf:

5 min	94°C	} x Wiederholungen
30 s	94°C	
30 s	T _m	
45 s	72°C	
10 min	72°C	

Nach elektrophoretischer Auftrennung der beiden PCR-Produkte auf einem 2 %ige Agarosegel wurde die Signalstärke der PCR-Produkte densitometrisch ausgewertet. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Aida 2.0, beta. Nach Abzug des lokalen Hintergrundes wurde der relative Expressionslevel des zu untersuchenden Gens auf den Expressionslevel des konstitutiv exprimierten Gens bezogen. Der Level des konstitutiv exprimierten Gens diente als Standard und wurde als Faktor 1,0 definiert.

3.8 Isolierung, Kultivierung und Transfektion endometrialer Zellen

3.8.1 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken (NUAIRE Biological Safety cabinets ClassII Type A/B3) der Sicherheitsklasse II durchgeführt. Die verwendeten Kulturmedien und Zusätze, wie Antibiotika, Wachstumsfaktoren oder Hormone, wurden durch Filtration sterilisiert (VacuCap 60, 0,2µm Supor[®]Membranen, Gelman Laboratory). Glasgeräte wurden bei 180°C 8 h hitzesterilisiert, Plastikartikel, wie Filterringe und Polyamidmembranen zur Isolierung der endometrialen Primärzellen, bei 120 °C und 1,2 bar 20 min autoklaviert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in befeuchteten Begasungsbrutschränken (NUAIRE IR Autoflow CO₂ Water Jacketed Incubator) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 mm² (T25-Flaschen) oder 30 mm-Kulturschalen bzw. 6-well-Platten verwendet.

Mediumwechsel wurde bei Primärzellkulturen alle zwei, bei Zelllinien alle drei Tage durchgeführt.

3.8.2 Zellkulturmedien

Grundmedium	50 % (v/v) DMEM 50 % (v/v) Ham' F-12 0,2 % (v/v) Pen/Strep-Stammlösung
Pen/Strep-Stammlösung	Penicillin 5000 IU/ml Streptomycin 50 mg/ml
primäre Stromazellen	10 % FCS ad 500 ml Grundmedium
primäre Epithelzellen	10 % FCS 1 ng/ml β -Estradiol 25 ng/ml EGF ad 500 ml Grundmedium
endometriale Zelllinien	10 % FCS 50 μ l/ml Geneticin (5 μ g/ml Hygromycin)* ad 500 ml Grundmedium

* nur enthalten, wenn Zellen mit pRc/E1A und pBabe/Hygro/E1B co-transfiziert wurden

3.8.3 Trypsinieren von Zellen

Sobald Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen waren, wurden sie trypsinisiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen. Durch Inkubation mit 1 ml 1 x TE bei RT wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes und voneinander gelöst. Nach Resuspension in Kulturmedium wurden die Zellen entweder passagiert und weiter kultiviert, eingefroren oder z.B. für die Isolierung von RNA verwendet.

3.8.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ein konfluenten Monolayer wurde trypsinisiert und in 4 ml Medium aufgenommen. Zum Entfernen des Trypsins wurden die Zellen 8 min bei 800 UpM (= 111·g) (Labofuge M, Heraeus Sepatech) zentrifugiert und in 3,2 ml Kulturmedium resuspendiert. 1,6 ml dieser Suspension wurde in ein Kryogefäß (Cellstar, Greiner) überführt. Zu den Zellen wurden 0,2 ml DMSO als Frostschutz und 0,2 ml FCS zugegeben. Die längerfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Nach Entnahme der Zellen aus flüssigem Stickstoff wurden diese durch Schwenken in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 37 °C warmes Kulturmedium überführt. Zum

Entfernen von DMSO wurden die Zellen sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in T25-Flaschen überführt und kultiviert. Nach etwa 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.8.5 Isolierung von Drüsenepithel - Aggregaten und Stromazellen aus humanem Endometrium durch Filtration

Endometriale Proben wurden ein- bis dreimal mit Moscona-Lösung gewaschen. Die Gebärmutter Schleimhaut wurde anschließend in etwa 1 mm³-große Stücke geschnitten und 1,5 bis 2 h in DMEM / Ham's F-12 mit 0,25 % Collagenase I bei 37 °C im Schüttler angedaut. Eine Verklumpung der Gewebstückchen während der Behandlung wurde durch kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes alle 30 min verhindert. Desweiteren wurde durch kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes am Ende der Inkubation Stromazellen von den Epithelaggregaten gelöst. Die voneinander getrennten Epithelzellaggregate und Stromazellen wurden nun durch Filtration durch Polyamidmembranen (neoLab) isoliert. Im ersten Filtrationsschritt durch eine Membran mit 90 µm Porendurchmesser erfolgt die Abtrennung von Gewebsresten. Im zweiten Schritt wurden die Zellen durch eine Polyamidmembran mit 40 µm Porendurchmesser filtriert. Die vereinzelt Stromazellen befanden sich anschließend im Filtrat, die Epithelzell-Aggregate auf dem 40µm-Filter. Um eine Verunreinigung durch Stromazellen zu reduzieren, wurde der Filter insgesamt mit 40 ml DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS gewaschen. Der 40µm-Filter wurde umgedreht, und die Epithelzell-Aggregate wurden mit 50 ml DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS von der Membran heruntergewaschen. Nach Zentrifugation bei 800 UpM (Labofuge M, Heraeus Sepatech) für 8 min wurde die Zellen mit DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 1 bis 2 ml DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer wurden 3-4 · 10⁵ Zellen pro 6-well-Platten bzw. T25-Flaschen ausplattiert. Die primären Stromazellen wurden in DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS, die primären Epithelzellen in DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS mit 1 ng / ml β-Estradiol und 25 ng / ml EGF kultiviert.

3.8.6 Isolierung von endometrialen Epithel - Zellaggregaten und Stromazellen durch Sedimentation (abgewandelt nach Osteen et al., 1989)

Nach dem Waschen der endometrialen Biopsien in PBS wurde das Gewebe in 1 mm³-große Stücke geschnitten und 2 min bei 800UpM (Labofuge M, Heraeus Sepatech) zentrifugiert, um Blutzellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die Gewebstücke wurden in DMEM / Ham's F-12

mit 0,5% Collagenase I und 0,02 % DNaseI 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach 30 min wurden noch vorhandene Zellklumpen durch wiederholtes Aufsaugen in eine Pasteurpipette zerkleinert und der Verdau fortgesetzt. Die Zellsuspension wurde nun durch eine Polyamidmembran mit 90 µm Porendurchmesser gefiltert. Das Filtrat, das die Stromazellen enthielt, wurde abzentrifugiert und einmal mit DMEM / Ham's F-12 gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml DMEM / Ham's F-12 und 10 % FCS resuspendiert und in einem 15 ml Röhrchen auf 10 ml DMEM / Ham's F-12 geschichtet. Das Röhrchen wurde nun 30 min bei 37°C im CO₂-Brutschrank senkrecht hingestellt. Nach 30 min wurden die oberen 8 ml, sie enthielten die Stromazellen, entnommen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden resuspendierte. Nach Filtration durch eine 40 µm-Polyamidmembran befanden sich die aufgereinigten Stromazellen im Filtrat und wurden unter Standardbedingungen kultiviert.

Die Zellen und Gewebereste auf dem 90 µm-Filter wurden für 15 min bei 37°C mit HBSS, das 0,5 % Collagenase I, 0,1 % Hyaluronidase und 0,02 % DNaseI enthielt, behandelt. Nach Filtrierung durch eine 90 µm- und anschließend 40 µm-Polyamidmembran wurden die noch verbleibenden Stromazellen entfernt. Die Epithelaggregate wurden vom 40 µm-Filter heruntergewaschen und zentrifugiert. Nach erneutem Enzymverdau für 45 min wurden die Zellen abzentrifugiert und in 2 ml DMEM / Ham's F-12 und 10 % FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 10 ml DMEM / Ham's F-12 und 10 % FCS geschichtet. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im CO₂-Brutschrank wurden die oberen 10 ml verworfen. Die unteren 2 ml mit den sedimentierten Epithelzellen wurden abzentrifugiert. Die Epithelzellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und unter Standardbedingungen kultiviert.

3.8.7 Immunomagnetische Aufreinigung der isolierten endometrialen Epithelaggregate und Stromazellen

Zur weiteren Aufreinigung der durch Filtration voneinander getrennten endometrialen Stroma- und Epithelzellen wurden Magnetpartikel, sogenannte Dynabeads, verwendet. Diese waren mit einem monoklonalen Maus IgG1 Antikörper gegen ein für Epithelzellen spezifischen Marker, das Glykopolypeptid BerEP4, beschichtet (Latzka et al., 1990).

Vorbereitung der Dynabeads für die Zell-Isolierung:

Die Magnetpartikel wurden in der Stammlösung resuspendiert und die für die Isolierung der Epithelzellen benötigte Menge in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der Stammlösung betrug $6,7 \cdot 10^7$ Magnetpartikel/ml. Das Gefäß wurde 2 min in den sogenannten Magnetpartikel-Konzentrator (MPK), ein für 1,5 ml-Eppendorfgefäße geeigneter Ständer mit Magnet, gesteckt. Nach Anlagerung der Dynabeads an die Gefäßwand im Bereich des

Magneten wurde der Überstand entfernt und das Gefäß aus dem MPK entnommen. Die Magnetpartikel wurden in 1,5 ml Waschpuffer (1x PBS, 0,1 % Casein) resuspendiert, gewaschen und das Reaktionsgefäß 2 min im MPK gesteckt. Der Waschschrift wurde wiederholt und die Dynabeads erneut im MPK konzentriert.

Für die anschließende Zell-Isolierung wurden die Magnetpartikel in Waschpuffer resuspendiert. Die hierzu eingesetzte Menge Puffer entsprach dem Volumen, das zu Beginn aus der Stammlösung entnommen worden war.

Zell-Isolierung:

Zur Isolierung von Epithelzellen bzw. Entfernung von Stromazellen aus der Epithelzellkultur wurde zu den Epithelzellen 1 ml 1 x TE hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C geschüttelt. Sobald die Zellen vollständig voneinander separiert waren, der Verlauf des Verdaus wurde alle 2 min mikroskopisch überprüft, wurden die Zellen bei 800 UpM (Labofuge M, Heraeus Sepatech) 5 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS wurden die Zellen in 500 µl DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Maximal $4 \cdot 10^7$ Zellen pro Reaktion wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die vorbereiteten Dynabeads hinzugegeben. Die Magnetpartikelzahl wurde so gewählt, daß das Verhältnis Zelle zu Dynabeads 1:4 betrug.

Um die Bindung der auf den Magnetpartikeln sitzenden Antikörpern an das Glykopolypeptid BerEP4 auf der Oberfläche der Epithelzellen zu ermöglichen, wurde der Ansatz 30 min sanft rotierend bei 4°C inkubiert.

Die Magnetpartikel wurden nun 10 min im MPK konzentriert und der Überstand, der die Stromazellen enthielt, abgenommen.

Die Magnetpartikel und die daran gebundenen Epithelzellen wurden nun zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, um nicht an Magnetpartikeln gebundenen Stromazellen vollständig zu entfernen. Die Magnetpartikel wurden in DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS resuspendiert und in 6-well-Platten geben.

Nach 24 h konnten die nicht an Epithelzellen gebundenen Magnetpartikel durch zweimaliges waschen mit Moscona-Lösung entfernt werden.

Sowohl die Vorbereitung der Dynabeads für die Zell-Isolierung als auch die Zell-Isolierung wurden bei 4°C durchgeführt.

Die beschriebene Methode kann gleichzeitig zum Separieren von Epithelzellen aus Stromazellkulturen verwendet werden. In diesem Fall wurden nach der 30-minütigen

Inkubation bei 4°C die Magnetpartikel, die die zu entfernenden Epithelzellen gebunden haben, im MPK konzentriert und der Überstand mit den Stromazellen kultiviert.

3.8.8 Vitalitätstest

Nach Isolation von Epithel- und Stromazellen aus Endometrium wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass der Farbstoff nur in abgestorbene Zellen eindringen und diese anfärben kann.

90 µl 0,5 %ige Trypanblau-Lösung wurden mit 110 µl PBS gemischt. Dieser Ansatz wurde zu einem Aliquot aus epithelialen bzw. stromalen Primärzellen gegeben und 4 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Anteil abgestorbener, d.h. angefarbter, Zellen mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer ermittelt.

3.8.9 Etablierung stabiler endometrialer Zelllinien

Zur Herstellung stabiler endometrialer Zelllinien wurden primäre endometriale Epithel- und Stromazellen getrennt voneinander transfiziert. Die Transfektion erfolgte an Tag 3 bzw. 4 nach Isolierung der Primärzellen aus dem Endometrium. Transfiziert wurden die Zellen mit den Expressionsvektoren pMSSVLT, der für das SV40LT-Antigen kodiert, pRc/E1A sowie mit pRc/E1A und pBabe/Hygro/E1B im Verhältnis 10:1.

SV40 largeT-Antigen (SV40LT) sowie E1A alleine bzw. in Kombination mit E1B, zwei früh exprimierte Gene des Adenovirus-Stamms 12, werden in der Literatur als Faktoren beschrieben, die sich zur Immortalisierung von Zellen eignen (Bernards et al., 1983; Hibi et al., 1991; Merviel et al., 1994; Ozer, 2000).

Unter Verwendung des Expressionsvektors pEGFP-C1 wurde die für den jeweiligen Zelltyp am besten geeignete Transfektionstechnik ermittelt.

24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen trypsiniert und auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm vereinzelt. 48 h nach Transfektion wurde mit der Selektion der stabil transfizierten Zellen begonnen. Als Selektionsmedium wurde bei Transfektion mit pMSSVLT bzw. pRc/E1A DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS und 50 µg/ml Geneticin (Gibco) und bei Co-Transfektion mit pRc/E1A und pBabe/Hygro/E1B DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS und 50 µg/ml Geneticin und 5 µg/ml Hygromycin B (Boehringer Mannheim) verwendet.

Unter Selektionsdruck gewachsene Zellklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringen einzelnen trypsiniert und in Mikrotiterplatten überführt. Mit jeder weiteren Passagierung wurde die Fläche des Kulturgefäßes vergrößert, d.h. von der Microtiterplatte über 24-well-, 12-well- und 6-well-Kulturplatten bis hin zur T25-Flasche.

3.8.10 Optimierung der Antibiotika-Konzentration für die Selektion transfizierter Zellen

Zur Optimierung der Antibiotika-Konzentration für die Selektion stabil transfizierter Zellen wurden primäre endometriale Epithel- und Stromazellen in 12-well-Platten kultiviert und unterschiedliche Mengen des zu testenden Antibiotikums in das Kulturmedium gegeben. Sowohl von Geneticin als auch von Hygromycin wurden die Konzentrationen 1 µg, 5µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg und 200 µg pro ml Kulturmedium an den Primärzellen getestet. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Die Antibiotikum-Konzentration, bei der etwa 80 % der Zellen nach 1 Woche und etwa 95 % nach 2 Wochen abgestorben waren, wurde für die Selektion stabil transfizierter Zellen eingesetzt.

3.8.11 Transfektionstechniken

3.8.11.1 Transfektion mit Effectene

Das Effectene-Transfektionsreagenz (QIAGEN) beruht auf einer „nicht-liposomalen“ Lipidtechnik. Die DNA interagiert bei dieser Methode zuerst mit einem sogenannten Enhancer, was zur Kondensation der DNA führt. Anschließend assoziiert die DNA mit Effectene zu einem Komplex. Das Effectene-Reagenz bildet Micell-Strukturen um die DNA aus. Der Effectene-DNA-Komplex wird zu den Zellen gegeben und die Lipide des Micells verschmelzen mit der Zellmembran. Die DNA gelangt in die Zelle.

Zur Kondensation der DNA wurden x µg DNA und die 8-fache Menge Enhancer ad 60 µl mit dem Puffer EC aufgefüllt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde Effectene hinzugeben, gründlich gemischt und 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die in 24-well-Platten kultivierten Primärzellen zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen und 350 µl DMEM / Ham's F-12 auf die Zellen gegeben. Nach Zugabe von 350 µl DMEM / Ham's F-12 zu dem Transfektionsansatz wurde dieser auf die Zellen geben. Die Transfektion erfolgte über 6 h bei 37°C und 5 % CO₂. Der Transfektionsansatz wurde hiernach entfernt, die Zellen zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen und 2 ml Kulturmedium hinzugegeben.

x: Menge variierte je nach Versuchsansatz; s. Kapitel 4.3.5

3.8.11.2 Lipofektion

Bei der Lipofektion macht man sich die Liposomen-Technik zunutze. Hierbei assoziieren die polykationischen Lipide der Liposomen mit der negativ geladenen DNA. Der Liposomen–DNA-Komplex wiederum setzt sich an die negativ geladene Zellmembran. Die DNA wird in die Zelle eingeschleust.

Für die Transfektion wurden $x \mu\text{l}$ LipofektAMINE (Gibco) mit DMEM / Ham's F-12 auf $50 \mu\text{l}$ und $x \mu\text{g}$ DNA mit OptiMEM (Gibco) auf $50 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Nach gründlichem Mischen der Ansätze wurden diese zusammengegeben und ebenfalls gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde $250 \mu\text{l}$ OptiMEM hinzupipettiert und der Transfektionsansatz auf die zweimal mit Moscona-Lösung gewaschenen Zellen gegeben. Bei Verwendung von 24-well- statt 6-well-Platten wurde statt $250 \mu\text{l}$ OptiMEM ein Volumen von $150 \mu\text{l}$ verwendet.

Nach 6 h bei 37°C und 5% CO_2 wurden der Transfektionsansatz abgenommen, die Zellen zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen und ein dem Zellkulturgefäß entsprechendes Volumen Kulturmedium hinzugeben.

x: Menge variierte je nach Versuchsansatz; s. Kapitel 4.3.5

3.8.11.3 Transfektion mit SuperFect

Das SuperFect-Reagenz (QIAGEN) ist ein aktiviertes Dendrimer. Es besitzt einen kugelförmigen Aufbau mit nach außen strahlenden Strukturen, die an ihren Enden Aminogruppen tragen. Die DNA windet sich um dieses Molekül, wodurch eine komplexe Struktur entsteht, die den Eintritt in die Zelle erleichtert. Der positiv geladenen SuperFect–DNA-Komplex bindet an die negativ geladenen Rezeptoren an der Zelloberfläche. Der Komplex gelangt in die Zelle und wird in Endosomen in den Zellkern transportiert.

Zur Herstellung des Transfektionsansatzes mit einem Endvolumen von $60 \mu\text{l}$, dies gilt nur für 24-well Platten, wurden $x \mu\text{g}$ DNA mit DMEM / Ham's F-12 gemischt. Nach Zugabe von $x \mu\text{l}$ SuperFect erfolgte eine Inkubation von 10 min bei RT. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen und $350 \mu\text{l}$ DMEM / Ham's F-12 mit 10% FCS auf die Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde zugefügt und 6 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Hiernach wurde der Transfektionsansatz entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen und mit 2 ml Kulturmedium bedeckt.

x: Menge variierte je nach Versuchsansatz; s. Kapitel 4.3.5

3.8.11.4 *In situ*-Elektroporation

Die *in situ*-Elektroporation wird an Zellen durchgeführt, die auf Membranfiltern, den sogenannten Transwellfiltern, adhärirt vorliegen. Dieses Verfahren ist für die Zellen schonender als die herkömmliche Elektroporation von Zellsuspensionen, da das Trypsinieren vor und das erneute Adhäririeren an den Boden des Kulturgefäßes nach Anlegen des elektrischen Pulses entfällt.

Zur Durchführung der *in situ*-Elektroporation wurden endometriale Primärzellen direkt nach der Isolierung aus dem Endometrium auf Transwell-Filtern mit einem Durchmesser von 24 mm und einer Porengröße von 0,4 µm (Corning Costar) ausplattiert und drei Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Für die Elektroporation wurde x µg DNA mit 400 µl EQUIBIO OptiMix (2 x OptiMix, ATP, Glutathion; Peqlab), 400 µl Aqua dest. und 200 µl DMEM / Ham's F-12 gemischt. Die auf den Transwell-Filtern adhärirten Zellen wurden von beiden Seiten 2 x mit Waschlösung A (EQUIBIO Optimix-Kit, Peqlab) gewaschen. Auf die Zellen wurde anschließend der Transfektionsansatz gegeben und 3 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde die Anode, der untere Teil der Elektroporationsküvette (PeqLab), mit 3 ml DMEM / F-12 gefüllt und der Transell-Filter hineingesetzt. Die Elektroporationsküvette wurde nun durch das Aufsetzen der Kathode geschlossen und in die Elektroporationskammer gesetzt (*In situ*-Elektroporationskammer für BioRad, Gene Pulser II; PeqLab). Nach Anlegen des elektrischen Pulses wurde die Kathode sofort entfernt und 1,5 ml 37°C warmes Medium (DMEM / Ham' F-12 mit 20 % FCS) hinzugegeben. Der Transwellfilter wurde direkt in vorgewärmtes DMEM / Ham' F-12 mit 20 % FCS gesetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach etwa 24 h wurden die Zellen mit Moscona-Lösung gewaschen, trypsiniert und auf 10 cm-Petrischalen überführt.

x: Menge variierte je nach Versuchsansatz; s. Kapitel 4.3.5

3.8.12 Vektoren

Die Karten der Vektoren befinden sich im Anhang (Abb. 39-42).

pBabe/Hygro/E1B: Der pBabe Vektor gehört zur Gruppe der retroviralen Vektoren (Morgenstern und Land, 1990). Er enthält ein Hygromycin-Resistenzgen unter Kontrolle des SV40-Promotors. Das E1B-Gen, inkloniert über BamHI, steht unter Kontrolle eines starken Promotors im MoMuLV LTR. Ampicillin-Resistenzgen. Vektorgröße: 5,2 kb. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. D. Brockmann, Institut für Molekularbiologie, Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen)

pEGFP-C1: (CLONTECH) pEGFP-C1 kodiert eine Variante des GFP-Wildtyps mit Anregungsmaximum bei 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 507 nm. Das pEGFP-C1-Gen enthält eine multiple Klonierungsregion. Durch Klonierung eines Gens in diese Region wird das Genprodukt an den C-Terminus des EGFP (Enhanced green fluorescent protein) fusioniert und ermöglicht so einen direkten Expressionsnachweis in transfizierten Zellen. Der Vektor vermittelt sowohl Kanamycin als auch Neomycin-Resistenz. Vektorgröße: 4,7 kb.

pMSSVLT: pMSSVLT setzt sich zusammen aus dem Expressionsvektor pMSE und dem SV40 largeT und small t Genen einkloniert über StuI und BamHI (Reddy et al., 1978; Schuermann, 1990); Ampicillin-Resistenz; Neomycin-Resistenz; Vektorgröße: 8,15 kb. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von AG IV Prof. Dr. Möröy, Institut für Zellbiologie, Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen)

pRc/CMV: (Invitrogen) Eukaryotischer Expressionsvektor mit der Enhancer-Promotor-Sequenz für unmittelbar früh exprimierte Gene des menschlichen Cytomegalovirus (CMV); mit Polyadenylierungssignal und Terminationscodon vom Rinderwachstumshormon- (BGH-) Gen zur Förderung der RNA-Stabilität 3' von der multiplen Klonierungsstelle. Der Vektor enthält das Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in *E. coli* als auch Neomycin-Resistenzgen, zur Selektion G418- bzw. Geneticin-resistenter stabiler Zelllinien. Vektorgröße: 5,5 kb.

pRc/E1A: pRc/E1A enthält das E1A Gen des Adenovirus-Stamms 12 einkloniert über HindIII und XbaI in das Plasmid pRc/CMV (P. Hellmann, Klon #16, Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, 1995)

3.8.13 Präparation von Zellen für Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Herstellung von REM-Aufnahmen von endometrialen Zellen und Zelllinien wurden diese auf Matrigel-beschichteten Glasplättchen kultiviert. Der konfluente Zellmonolayer wurde 1 h mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Cacodylatpuffer wurden die Zellen 1 h bei 4°C in 1 %iger Osmiumsäure fixiert und gefärbt. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit HMDS, einem Übergangsmittel zwischen der Ethanol-Reihe und der Lufttrocknung, das die Bildung von Oberflächenartefakten unterbindet. Die ü.N. luftgetrockneten Präparate wurden auf Rasterträger aufgeklebt und mit Gold besputtert.

Anschließend wurde mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops LEO 420 (Zeiss) Aufnahmen von den Präparaten gemacht.

3.8.14 *In vitro*-Dezidualisierung

Zur Dezidualisierung primärer Stromakulturen und stabiler Stromazelllinien wurden diese mit MPA (Medroxyprogestinacetat) und 8-Bromo-cAMP 8 Tage behandelt (abgewandelt nach Brosens et al. 1999).

Für die *in vitro*-Dezidualisierung wurden 5 x 3 12-wells zur Bestimmung des Prolaktin-Gehaltes im Überstand, ein 6-well für RNA-Isolierung und auf Glasplättchen kultivierte Zellen für REM-Aufnahmen der dezidualisierten Zellen ausplattiert.

Konfluente Zellmonolayer primärer Stromazellen und stromaler Zelllinien wurden zum Entfernen des Kulturmediums zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen. Hiernach wurde DMEM / Ham's F-12 mit 2 % Aktivkohle-gereinigtem FCS, 1 µM MPA, 0,5 mM 8-Bromo-cAMP und, im Falle der Zelllinien 50 µg Geneticin /ml, auf die Zellen gegeben.

Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Prolaktin-Konzentration (Dreifachbestimmung) mittels Immunoassay (Prolaktin-Test; Vitros Immundiagnostic Products Prolactin Reagenzpack) eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte unter Routine-Bedingungen in der Abteilung für Gynäkologie des Universitätsklinikums Essen.

Aus den drei Zellkulturen, von denen der Überstand zur Konzentrationsbestimmung verwendet wurde, wurde genomische DNA isoliert und die DNA-Konzentration als Bezugswert für die Prolaktin-Konzentration verwendet. Als Negativkontrolle diente das frisch angesetzte MPA-, 8-Bromo-cAMP-haltige Kulturmedium. Die DNA-Konzentration unbehandelter konfluenter Zellen diente hierbei als Bezugswert.

Die Isolierung von RNA sowie die Fixierung der Zellen für REM-Aufnahmen erfolgte am achten Tag der *in vitro*-Dezidualisierung.

3.8.15 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Zur Isolierung genomischer DNA aus Zellen wurde die Zellkultur zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen. Nach dem Entfernen der Waschlösung wurden 500 µl Lysispuffer auf die Zellen gegeben und 2 min inkubiert. Die visköse Flüssigkeit wurde hiernach abgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Kulturgefäß wurde mit 1 ml Isopropanol ausgespült und der Isopropanol ebenfalls in das Reaktionsgefäß zur Fällung der DNA gegeben. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 14000 UpM

(Eppendorftischzentrifuge) wurde das DNA-Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 14000 UpM wurde die DNA getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch ermittelt.

3.9 Statistische Auswertung

Die Signifikanz der Unterschiede in der Proliferationsaktivität zwischen eutoper und ektooper Endometrien wurde mit einem generalisierten linearen Modell, das von einer binomialen Verteilung mit Überdispersion ausgeht, berechnet. Eine Überdispersion (McCullagh und Nelder, 1989) zwischen Wiederholungen der binären Verteilung ereignet sich, wenn die Variation zwischen den Beobachtungen größer ist, als dass sie durch Proben unabhängiger binomialer Zufallsvariablen erklärt werden können.

Das Modell der Überdispersion erlaubt eine realistischere Schätzung der p-Werte und Konfidenzintervalle im Zusammenhang mit dem generalisierten linearen Modell.

Die Klassifikation des Schweregrades der Endometriose erfolgte anhand des AFS-Score. Die Anwendung dieses Scores ermöglicht eine differenziertere und exaktere Auswertung und Charakterisierung der Endometrioseherde.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen eutoper und ektooper Endometrien

Die zellbiologischen Mechanismen, die zur Pathogenese der Endometriose führen, sind bis heute nicht aufgeklärt. Obwohl zahlreiche zell- und molekularbiologische Eigenschaften der Endometriose in der Literatur beschrieben wurden, konnte die Endometriose bisher nicht eindeutig charakterisiert werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es u.a., verschiedene Eigenschaften, wie das Proliferationsverhalten und die Adhäsionsfähigkeit, sowie Faktoren der inflammatorischen Kaskade, die mit der Entstehung der Endometriose in Zusammenhang gebracht wurden, zu analysieren.

Dazu wurden zunächst immunhistochemische Untersuchungen an eutopen Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose sowie an korrespondierenden peritonealen Endometrioseherden durchgeführt.

Bei den Biopsien handelte es sich ausnahmslos um Proben, die im Verlauf der Proliferationsphase des Menstruationszyklus, Tag 6-14, entnommen wurden. Es wurden nur Gewebematerial für die Analysen berücksichtigt, das von Frauen stammte, die zum Zeitpunkt der Biopsie weder Hormone noch Präparate, die den Hormonhaushalt beeinflussen, eingenommen hatten.

4.1.1 Proliferation

Zur Erhebung der Proliferationsrate wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 immunhistochemisch untersucht. Ki67 ist im Zellkern lokalisiert und wird in der späten G₁-, S-, M- und G₂-Phase des Zellzyklus exprimiert. In der G₀-Phase ist dieser Marker hingegen nicht detektierbar (Schlüter et al., 1993). Durch Auszählen der angefärbten Drüsenepithel- bzw. Stromazellen wurde der prozentuale Anteil teilungsaktiver Zellen ermittelt.

Sowohl in Kryostatschnitten eutoper Endometrien von Frauen ohne (En) als auch mit Endometriose (EnEMT) ist im Drüsenepithel eine große Zahl angefärbter Zellkerne zu beobachten (Abb. 4a,b). Im Durchschnitt lag die Proliferationsrate der eutopen Endometriem bei etwa 38 % (Abb. 7a). Im Vergleich zu den Endometriem war der Anteil teilungsaktiver Drüsenepithelzellen in den Endometrioseherden signifikant ($p < 10^{-11}$; Statistische Auswertung, 3.9) reduziert. In 18 von 24 endometriotischen Biopsien konnte kein Ki67 detektiert werden (Abb. 4c). Bei den übrigen Proben exprimierten einzelne Epithelzellen den

Proliferationsmarker (Abb. 4d). Im Durchschnitt lag die Proliferationsaktivität der Drüsenepithelzellen der Endometrioseherde bei 1,2 % (Abb. 7a).

Durchschnittlich 10 % der endometrialen Stromazellen waren Ki67-positiv (nicht dargestellt), wohingegen im Stroma der Endometrioseherde kein Ki67 detektiert werden konnte (Abb. 4c,d).

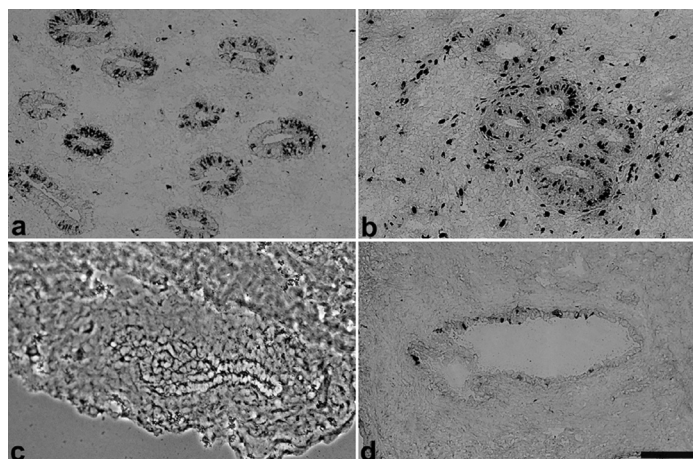


Abb. 4: Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 im Endometrium (a) von Frauen ohne Endometriose, (b) mit Endometriose und (c,d) in Endometrioseherden. Balken: 220µm

4.1.2 EGF und EGF-R

Zwei Faktoren, die die Proliferationsaktivität des Endometriums beeinflussen, sind EGF und sein Rezeptor EGF-R. Beide Faktoren werden sowohl im Epithel als auch im Stroma des humanen Endometriums exprimiert (Smith, 1994; Abb. 5a,d).

EGF ist im Drüsenepithel hauptsächlich im Bereich der apikalen Zellmembran lokalisiert. Eine schwache Immunreaktion konnte auch an der basalen und lateral Membran beobachtet werden (Abb. 5a,b). Die Expression dieses Wachstumsfaktors ist im eutopen Endometrium von Frauen ohne und mit Endometriose nahezu identisch. Das Fluoreszenzsignal zeigt durchschnittlich eine mittlere Intensität (Abb. 7b).

Im Gegensatz zum eutopen Endometrium ist EGF in den Endometrioseherden schwach exprimiert. 34% der Herde sind EGF-negativ (Abb. 5c, 7b).

EGF-R ist im Gegensatz zu EGF vornehmlich in der basalen Zellmembran der Drüsenepithelzellen lokalisiert. Eine schwache Immunreaktion ist zudem, in der lateralen Membran zu beobachten (Abb. 5d-f).

In Endometrien von nicht betroffenen Frauen (Abb. 5d) und Endometriose-Patientinnen (Abb. 5e) ist die Expression des EGF-R, genauso wie bei EGF, annähernd identisch. 53 % der

Endometrien nicht erkrankter Frauen und 44 % der endometrialen Kryostatschnitte von Endometriose-Patientinnen zeigen eine mittelstarke Immunreaktion gegen diesen Rezeptor (Abb. 7c). Bei Endometrien von nicht erkrankten Frauen erkennt man anhand der graphischen Auswertung eine leichte Tendenz in Richtung starker Expression. Bei 36 % dieser Endometrien war ein starkes Fluoreszenzsignal zu beobachten (Abb. 7c).

Im Vergleich zu den eutopen Endometrien wird EGF-R in den Endometrioseherden schwächer exprimiert.

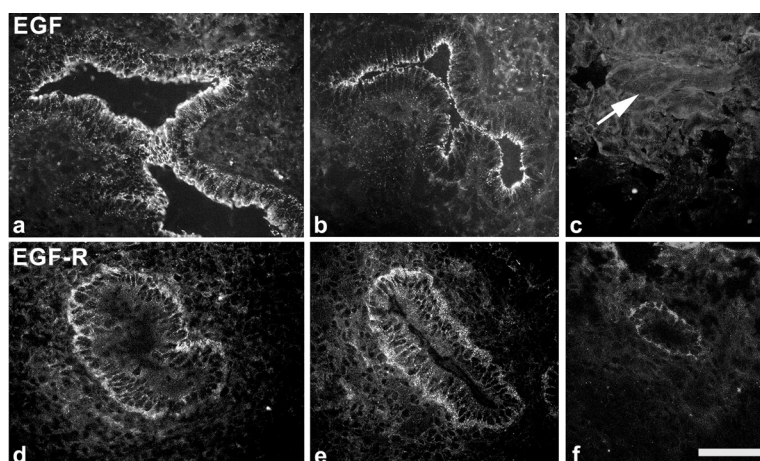


Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis des (a-c) ‚epidermal growth factor‘ (EGF) und des (d-f) ‚epidermal growth factor receptor‘ (EGF-R) im humanen Endometrium und in endometriotischen Biopsien. Die Spalten von links nach rechts zeigen Kryostatschnitte von eutopen Endometrien von Frauen (a,d) ohne Endometriose, (b,e) mit Endometriose sowie (c,f) den ektopen Endometrien. In Abb. c ist das Drüsenepithel des Endometrioseherdes mit einem Pfeil gekennzeichnet. Balken: 220 μ m.

48 % der endometriotischen Biopsien zeigen eine schwache Immunreaktion gegen EGF-R (Abb. 5f, 7c), und in 32 % der Proben war EGF-R nicht detektierbar (Abb. 7c).

Diese immunhistochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass es keine bedeutenden Unterschiede in der Expression von EGF und seinem Rezeptor im Drüsenepithel der eutopen Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose gibt.

Ein Vergleich der eutopen Endometrien mit den endometriotischen Biopsien belegt, dass es in den Herden zu einer Reduktion des relativen Expressionslevels von EGF und EGF-R kommt.

Im endometrialen Stroma konnte heterogen verteilt eine mittelstarke Expression sowohl von EGF als auch EGF-R detektiert werden. Das Stroma des ektopen Endometriums war hingegen in bezug auf beide Marker negativ (nicht dargestellt).

4.1.3 Zell-Zell-Adhäsion

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Drüsenepithel der ektopen Läsionen das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin nicht mehr exprimiert, und die E-Cadherin-negativen Epithelzellen die Fähigkeit zum invasiven Wachstum besitzen (Gaetje et al., 1995, 1997).

Aber nicht nur E-Cadherin ist essentiell für die Adhäsionsfähigkeit von Zellen sondern der gesamte Adhäsionskomplex inklusive α - und β -Catenin. Die folgenden immunhistochemischen Untersuchungen sollten zeigen, ob der Verlust der Adhäsionseigenschaften und die hiermit einhergehende Invasionsfähigkeit ektoper Läsionen alleine durch den Verlust von E-Cadherin bedingt ist, oder ob der gesamte Cadherin-Catenin-Komplex verloren geht.

4.1.3.1 E-Cadherin

E-Cadherin ist die Komponente des Zelladhäsionskomplexes, die über ihre extrazelluläre Domäne die Adhäsion benachbarter Epithelzellen vermittelt. Es ist ein Transmembranprotein, das über die komplette Zellmembran des endometrialen Drüsenepithels verteilt vorliegt (Abb. 6a,b).

Im überwiegenden Teil der Endometrien von Frauen ohne Endometriose wurde eine starke (44 %) bis mittelstarke (36 %) Immunreaktion gegen E-Cadherin detektiert (Abb. 6a, 8a). Lediglich 20 % der Proben exprimierten das Adhäsionsmolekül schwach.

Die Expression in den endometrialen Gewebeproben von Endometriose-Patientinnen war hingegen tendenziell moderat. In 8 % dieser eutopen Endometrien konnte sogar kein E-Cadherin detektiert werden (Abb. 8a).

In den ektopen Endometrien kommt es zu einer starken Reduktion der E-Cadherin-Expression. 43 % der Proben wiesen eine schwache Immunreaktion gegen das Adhäsionsmolekül auf. Mehr als die Hälfte der Endometrioseherde waren E-Cadherin-negativ (Abb. 6c, 8a).

4.1.3.2 α - und β -Catenin

Neben E-Cadherin besteht der Zelladhäsionskomplex u.a. aus α - und β -Catenin. α -Catenin, das mit den Aktin-Filamenten des Cytoskeletts in Verbindung steht, ist über β -Catenin mit der intrazellulären Domäne des E-Cadherins verbunden.

Beide Moleküle sind im endometrialen Epithel in Bereich der apikalen Zellmembran lokalisiert (Abb. 6d-e, g-h).

Endometriale Kryostatschnitte von nicht betroffenen Frauen wiesen in 61 % der Fälle eine starke und in 39 % eine moderate Immunreaktion gegen α -Catenin auf (Abb. 8b). Die Endometrien von Endometriose-Patientinnen hingegen exprimierten α -Catenin nur in 52 % der Fälle stark und in 29 % moderat. In alle übrigen Proben konnte nur ein schwaches Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abb. 8b).

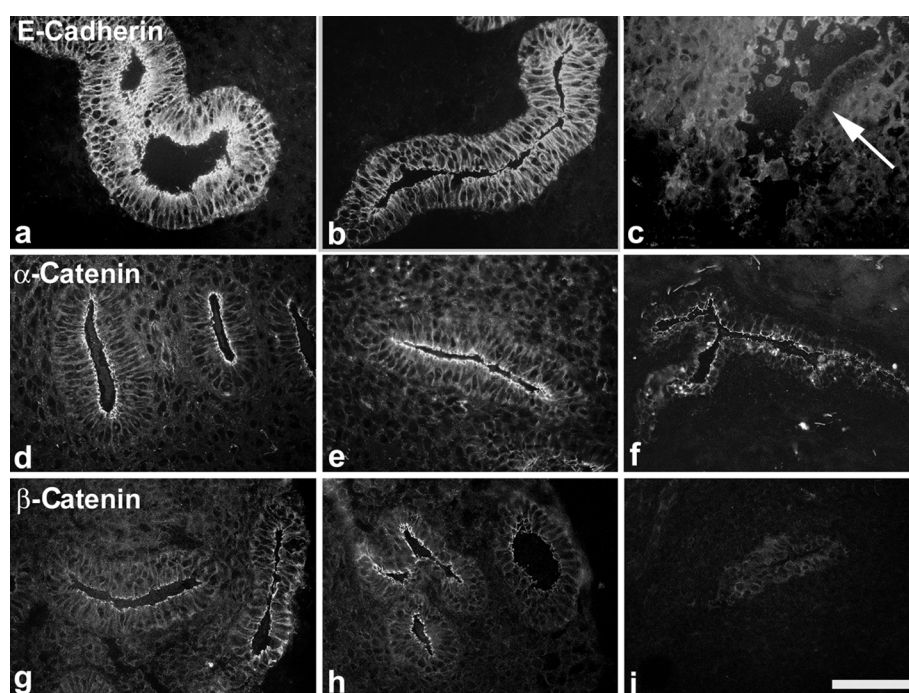


Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis von (a-c) E-Cadherin, (d-f) α -Catenin und (g-i) β -Catenin im humanen Endometrium und Endometrioseherden. Die Spalten von links nach rechts zeigen Kryostatschnitte von eutopen Endometrien von Frauen (a,d,g) ohne Endometriose, (b,e,h) mit Endometriose sowie (c,f,i) den ektopen Endometrien. In Abb. c ist das Drüsenepithel des Endometrioseherdes mit einem Pfeil gekennzeichnet. Balken: 190 μ m.

Im Gegensatz zu α -Catenin war der Unterschied in der relativen Expressionsstärke des β -Catenins zwischen den eutopen Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose größer.

An den Kryostatschnitten von Frauen ohne Endometriose konnte bei 21 % der Endometrien eine starke und in 61 % eine moderate Fluoreszenzfärbung beobachtet werden (Abb. 8c).

Bei den Endometriose-Patientinnen zeigten 44 % der Proben eine schwache zum Teil inhomogen verteilte Immunreaktion gegen β -Catenin (Abb. 6h). Nur 20 % dieser Endometrien exprimierten β -Catenin starke bzw. 24 % moderat. 12 % der Biopsien waren β -Catenin-negativ (Abb. 8c).

In den Endometrioseherden kommt es zu einer Reduktion der Expression beider Catenine. α -Catenin wird in den ektopen Endometrien überwiegend schwach (44 %) exprimiert. Lediglich 12 % der Biopsien zeigten eine starke und 27 % eine moderate Immunreaktion gegen dieses Protein. In 15 % der Fälle konnte kein α -Catenin detektiert werden (Abb. 8b). β -Catenin ist in

der Mehrzahl der Herde (58 %) schwach exprimiert. Ein Drittel der Proben ist β -Catenin-negativ (Abb. 6i, Abb. 8c).

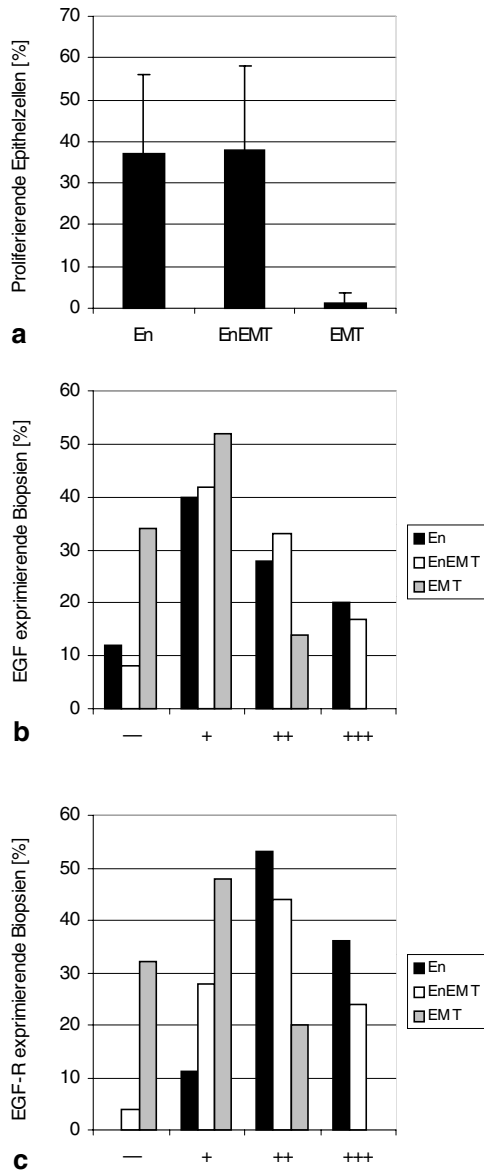


Abb. 7: (a) Proliferationsaktivität des Drüsenepithels in eutopen Endometrien von Frauen ohne (En; $n = 28$) und mit Endometriose (EnEMT; $n = 22$) sowie in endometriotischen Läsionen (EMT; $n = 24$). Durch immunhistochemische Detektion des Proliferationsmarkers Ki67 wurde der prozentuale Anteil teilungsaktiver Epithelzellen ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Diese Abbildung zeigt die Variationen des relativen Expressionslevels von (b) EGF und (c) EGF-R im Drüsenepithel des eutopen Endometriums von Frauen ohne Endometriose (En $n_{\text{EGF}} = 25$; $n_{\text{EGF-R}} = 23$), mit Endometriose (EnEMT $n_{\text{EGF}} = 24$; $n_{\text{EGF-R}} = 25$) und von Endometrioseherden (EMT $n_{\text{EGF}} = 21$; $n_{\text{EGF-R}} = 25$). Die Anzahl der Biopsien ohne (-) Immunreaktion, mit schwacher (+), moderater (++) und starker (+++) Intensität des Immunfluoreszenzsignals sind in Prozent dargestellt.

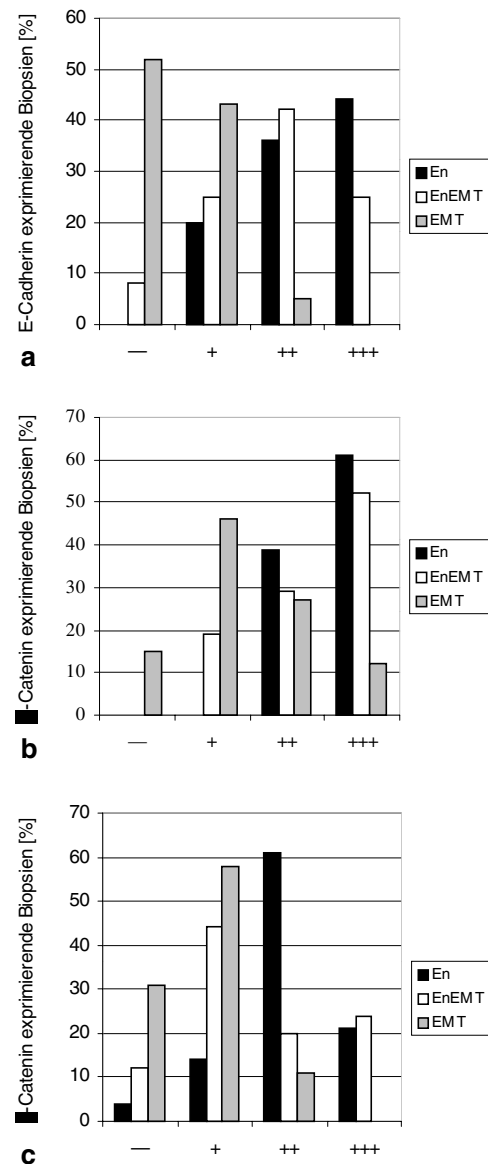


Abb. 8: Variationen des relativen Expressionslevels von (a) E-Cadherin, (b) α -Catenin und (c) β -Catenin im Drüsenepithel des eutopen Endometriums von Frauen ohne Endometriose (En $n_{\text{E-Cad}} = 25$; $n_{\alpha\text{-Cat}} = 23$; $n_{\beta\text{-Cat}} = 28$), mit Endometriose (EnEMT $n_{\text{E-Cad}} = 24$; $n_{\alpha\text{-Cat}} = 20$; $n_{\beta\text{-Cat}} = 25$) und Endometrioseherden (EMT $n_{\text{E-Cad}} = 21$; $n_{\alpha\text{-Cat}} = 26$; $n_{\beta\text{-Cat}} = 26$). Die Anzahl der Biopsien ohne (-), mit schwacher (+), moderater (++) und starker (+++) Intensität des Immunfluoreszenzsignals sind in Prozent dargestellt.

4.1.4 Korrelation der Expression des Cadherin-Catenin-Komplexes, von EGF und EGF-R zu den Östradiol-Serumwerten

Da die Östradiol-Serumwerte der Patientinnen in dieser immun-histochemischen Studie zwischen 17 und 290 pg/ml variierten, wurde untersucht, ob die Höhe der Östradiol-Konzentration Einfluss auf die Expression der analysierten Differenzierungsmarker hat.

Die Patientinnen wurden anhand ihrer Serumwerte in drei Gruppen unterteilt: (a) die Östradiol-Konzentration war kleiner als 30 pg/ml, (b) sie lag in einem Bereich von 30 und 100 pg/ml und (c) sie war größer als 100 pg/ml.

Die Expression von EGF, EGF-R, E-Cadherin, sowie α - und β -Catenin wurde mit diesen drei Gruppen korreliert. Die Korrelation erfolgte getrennt nach den drei Gewebsgruppen, eutopes Endometrium von Frauen ohne Endometriose, mit Endometriose und Endometrioseherden.

Wie am Beispiel von EGF-R (Abb. 9) gezeigt wird, konnte bei keinem der analysierten Differenzierungsmarker die Variation des Expressionslevels auf Unterschiede der Östradiol-Konzentrationen bei den Patientinnen zurückgeführt werden.

Die Progesteron-Serumkonzentration variiert im Verlauf der Proliferationsphase des Menstruationszyklus nur geringfügig. Die Progesteron-Konzentration lag bei den untersuchten Proben zwischen 0,2 und 1 ng/ml. Aus diesem Grund wurde eine Korrelation zwischen Expression der Differenzierungsmarker und der Progesteron-Konzentration nicht durchgeführt.

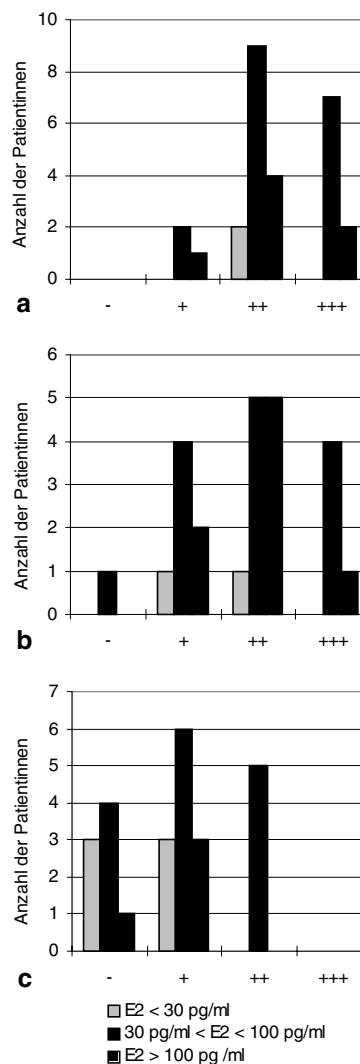


Abb. 9: Die Intensität der Immunreaktion gegen EGF-R in eutopen Endometrien von (a) Patientinnen ohne Endometriose, (b) mit Endometriose und (c) ektopen Endometrien wurde auf die Östradiol-Serumkonzentration zum Zeitpunkt der Biopsie bezogen. Die Anzahl der Patientinnen mit Östradiol-Konzentrationen kleiner als 30 pg/ml (hellgrau), zwischen 30 und 100 pg/ml (schwarz) und größer 100 pg/ml (schraffiert) wurde auf die relative Intensität des Fluoreszenzsignals bezogen: ohne (-), schwach (+), moderat (++) und stark (+++).

4.1.5 Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) und Cyclooxygenasen (COX)

Zu den typischen Symptomen der Endometriose gehören u.a. Schmerzen im Unterbauch, Menstruationsschmerzen und Entzündungsprozesse. Die Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) synthetisieren Stickstoffmonoxid (NO), das als Hauptmediator für u.a. Entzündungsreaktionen und Gefäßfunktionen angesehen wird. Die Cyclooxygenasen (COX) sind limitierende Enzyme der Prostaglandinsynthese. Prostaglandine sind hormonähnliche Substanzen, die u.a. eine Rolle bei der Entstehung von Schmerz und Entzündungsreaktionen, aber auch bei Gefäßreaktionen spielen.

4.1.5.1 eNOS und iNOS

Von den Stickstoffmonoxid synthetisierenden Enzymen (NOS) existieren drei Isoformen: endothelspezifisches NOS (eNOS), Cytokin-induzierbares NOS (iNOS) und ZNS-spezifisches NOS (bNOS). Sowohl eNOS als auch iNOS wurden im humanen Endometrium nachgewiesen (Tschuegguel et al. 1998).

Die eNOS-Expression schwankt im Drüsenepithel der eutopen Endometrium von Frauen ohne Endometriose zwischen moderat und stark (Abb. 10a, 11a). Jeweils etwa ein Drittel der endometrialen Biopsien von Frauen mit Endometriose zeigen eine schwache, moderate bzw. starke Immunreaktion gegen eNOS (Abb. 10b, 11a).

Bei den Endometrioseherden verschiebt sich die relative Expressionsstärke tendenziell in Richtung schwach bis moderat (Abb. 10c, 11 a).

83 % der Endometrien nicht betroffener Frauen und 75 % der Endometriose-Patientinnen exprimieren kein iNOS im Verlauf der Proliferationsphase des Menstruationszyklus (Abb. 11b). In den verbleibenden Biopsien kann bei nicht betroffenen Frauen eine schwache Immunreaktion im Drüsenepithel detektiert werden (Abb. 10d, 11b). Bei den Endometriose-Patientinnen ist bei 10 % der Proben eine moderate und 15 % eine schwache Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 10e, 11b).

Bei den ektopen Endometrien ist der prozentuale Anteil iNOS-exprimierender Proben größer als bei den eutopen Endometrien. Jeweils ein Viertel der Proben zeigt eine schwache bzw. moderate Immunreaktion gegen iNOS. Allerdings sind auch 50 % der Endometrioseherde iNOS-negativ (Abb. 10f, 11b).

Sowohl eNOS als auch iNOS sind im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 10c,e). Das Verteilungsmuster ist heterogen. In den meisten Fällen konnte eine erhöhte eNOS-Konzentration im apikalen Bereich der Drüsenepithelzellen beobachtet werden (Abb. 10a,b,d).

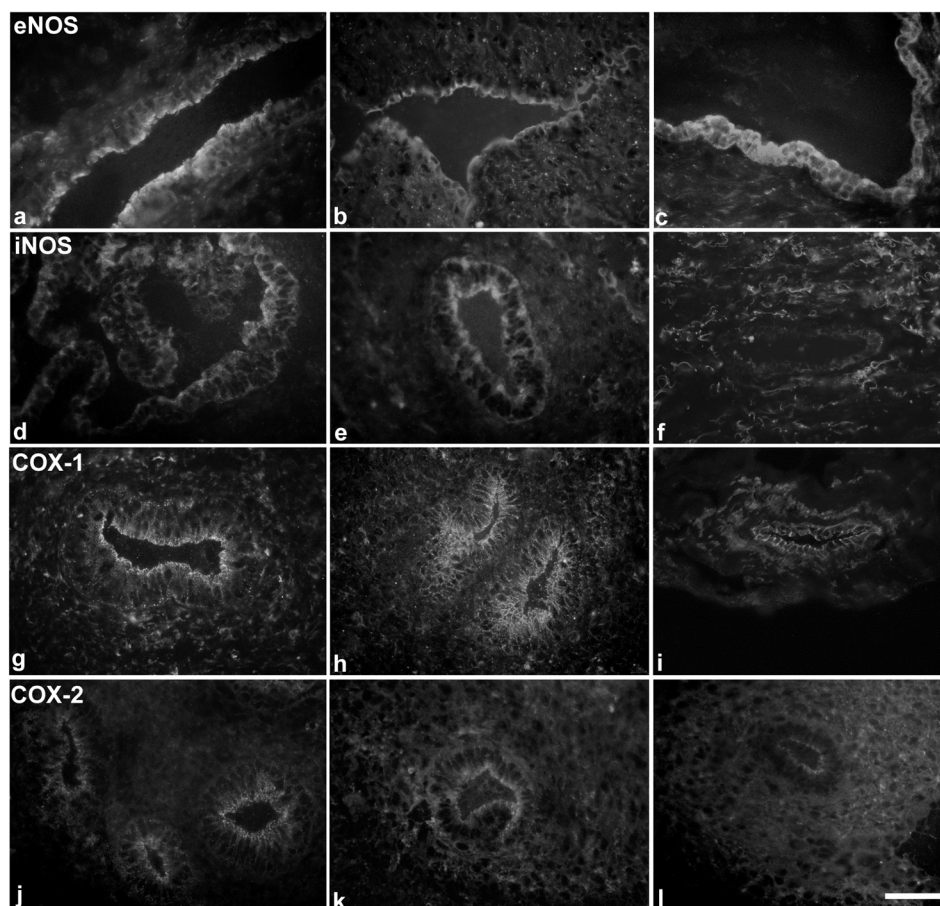


Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis von Stickstoffmonoxidsynthasen (a-c) eNOS, (d-f) iNOS, sowie der Cyclooxygenasen (g-i) COX-1 und (j-l) COX-2 im humanen Endometrium und in endometriotischen Läsionen. Die Spalten von links nach rechts zeigen Kryostatschnitte von eutopen Endometrien (a,d,g,j) von Frauen ohne und (b,e,h,k) mit Endometriose und (c,f,i,l) von Endometrioseherden. Balken: 170 μ m.

4.1.5.2 COX-1 und COX-2

Von den Cyclooxygenasen gibt es zwei Isoformen: COX-1, das konstitutiv exprimiert wird, und COX-2, die induzierbare Isoform. Beide Enzyme sind im endometrialen Drüsenepithel vornehmlich im apikalen Bereich der Zelle im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 10g-h, j-k). Im übrigen Cytoplasma ist nur ein schwaches Fluoreszenzsignal von COX-1 bzw. COX-2 zu erkennen (Abb. 10h,j).

COX-1 wird in den eutopen Endometrien tendenziell moderat exprimiert (Abb. 12a). Die Immunreaktion in den ektopen Endometrien ist im Vergleich zu den eutopen Endometrien tendenziell eher schwach (Abb. 10i, 12a).

Die COX-2-Expression ist sowohl in den eutopen Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose als auch in den Endometrioseherden als schwach einzustufen. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebsgruppen ist gering (Abb. 12b).

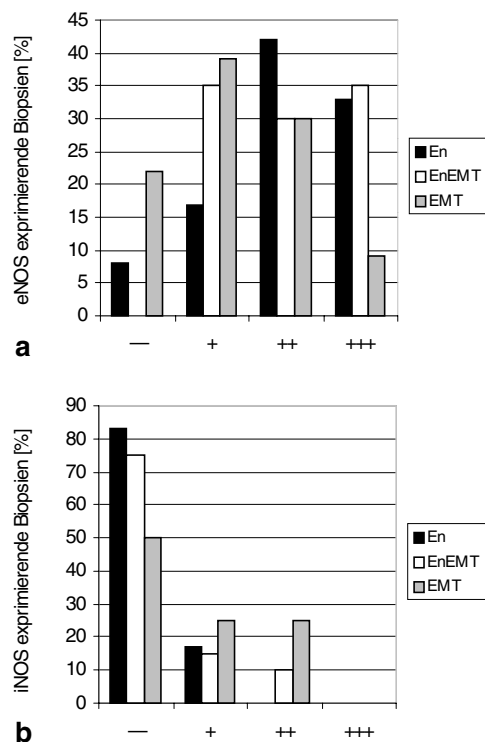


Abb. 11: Variation der relativen Expressionsstärke von (a) eNOS und (b) iNOS im eutopen Endometrium von Frauen ohne Endometriose (En; $n_{eNOS} = 24$; $n_{iNOS} = 23$), mit Endometriose (EnEMT; $n_{eNOS} = 23$; $n_{iNOS} = 20$) und endometriotischen Läsionen (EMT; $n_{eNOS} = 23$; $n_{iNOS} = 24$). Die Anzahl der Biopsien ohne (-), mit schwacher (+), moderater (++) und starker (+++) Intensität des Immunfluoreszenzsignals sind in Prozent dargestellt.

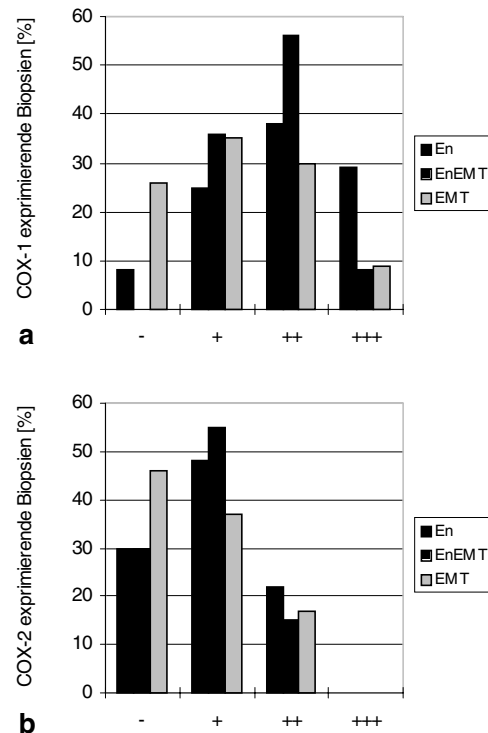


Abb. 12: Variation der relativen Expressionsstärke von (a) COX-1 und (b) COX-2 im eutopen Endometrium von Frauen ohne Endometriose (En; $n_{COX-1} = 24$; $n_{COX-2} = 23$), mit Endometriose (EnEMT; $n_{COX-1} = 25$; $n_{COX-2} = 20$) und endometriotischen Läsionen (EMT; $n_{COX-1} = 23$; $n_{COX-2} = 24$). Die Anzahl der Biopsien ohne (-), mit schwacher (+), moderater (++) und starker (+++) Intensität des Immunfluoreszenzsignals sind in Prozent dargestellt.

4.1.6 Korrelation der NOS-/ COX-Expression zum Schweregrad der Endometriose

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der COX-1- und -2- sowie eNOS- und iNOS-Expression wurden mit dem AFS-Score und somit mit dem Schweregrad der Endometriose korreliert. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob eine erhöhte

Expression dieser Marker, die an der Entstehung von Entzündungen und Schmerzen beteiligt sind, mit dem Schweregrad der Endometriose in Zusammenhang stehen.

Weder für die Cyclooxygenasen noch für die Stickstoffmonoxidsynthasen konnte gezeigt werden, dass ihr relatives Expressionslevel in den Endometrien von Endometriose-Patientinnen bzw. Endometrioseherden mit dem Endometriose-Score steigt oder sinkt.

Wie am Beispiele von COX-2 (Abb. 13) deutlich wird, liegen alle vier möglichen Klassifizierungsstufen über das gesamte Spektrum der detektierten Fluoreszenzsignalstärken verteilt vor, ohne dass irgendein definiertes Schema zu erkennen ist.

Weder der Schweregrad der Endometriose noch die Schmerzsymptomatik der Patientinnen scheint in einem direkten Zusammenhang zur Stärke der Expression von COX-1, COX-2, eNOS und iNOS zu stehen.

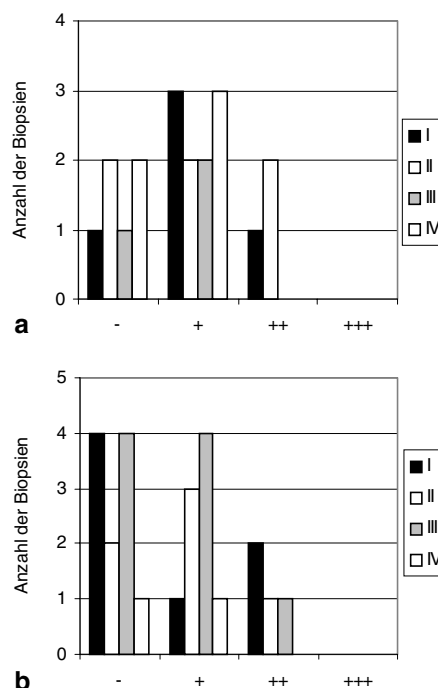


Abb. 13: Die Intensität der Immunreaktion gegen COX-2 in eutopen Endometrien von (a) Patientinnen mit Endometriose und (b) Endometrioseherden wurde auf den Endometriosegrad (AFS-Score) der Patientinnen zum Zeitpunkt der Biopsie bezogen. Die Anzahl der Patientinnen mit dem Endometriose-Score I (schwarz), II (waagrecht gestreift), III (hellgrau) oder IV (diagonal schraffiert) wurde auf die relative Intensität des Fluoreszenzsignals bezogen: ohne (-), schwach (+), moderat (++) und stark (+++).

4.1.7 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Der Vergleich zwischen eutopen Endometrien und Endometrioseherden belegt, dass die Proliferationsaktivität der Herde und die Expression von EGF und EGF-R, die die Proliferationsaktivität der endometrialen Zellen beeinflussen, reduziert sind. Die Herde zeigen zudem eine Reduktion, zum Teil sogar einen vollständigen Verlust der Adhäsionsfähigkeit, die auch besonders im Falle des β -Catenins tendenziell schon im Endometrium von Endometriose-Patientinnen zu beobachten ist.

COX-1 und eNOS sind tendenziell in den ektopen Endometrien schwächer exprimiert. Die Immunreaktion von COX-2 ist bei eutopen und ektopen Endometrien nahezu identisch. Der prozentuale Anteil iNOS exprimierender Endometrioseherde ist höher als der der endometrialen Biopsien.

4.2 Vergleichende Analyse des endometrialen Expressionsmusters von Frauen mit und ohne Endometriose

Das Expressionsmuster der Endometrioseherde ist in bezug auf die untersuchten Marker sehr heterogen, was sowohl die hier dargestellten immunhistochemischen Untersuchungen als auch die Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt haben. Eine Ausnahme stellen lediglich die reduzierte Proliferationsaktivität und die Abnahme der E-Cadherin-Expression dar. Eine Aussage über die Pathogenese der Endometriose ist bedingt durch die Heterogenität der untersuchten Marker nicht möglich.

Es stellt sich hier die Frage, ob die Ursache für die Pathogenese der Endometriose im Ausgangsgewebe, dem eutopen Endometrium, zu suchen ist. Es gibt zahlreiche medizinische und zellbiologische Hinweise darauf, dass bereits das Endometrium von Endometriose-Patientinnen im Vergleich zum Endometrium nicht betroffener Frauen Dedifferenzierungen aufweist.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob das Endometrium von Endometriose-Patientinnen bereits ein verändertes Differenzierungsmuster im Vergleich zu gesunden Patientinnen besitzt, sind cDNA-Expressionsanalysen durchgeführt worden. Diese Analysen sollten uns Aufschluss über mögliche Veränderungen auf transkriptionaler Ebene in Endometrium von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu nicht erkrankten Frauen geben.

4.2.1 cDNA Expression Arrays

Die Auswahl der für die Expressionsanalysen verwendeten Endometrien erfolgte nach eng definierten Kriterien.

Das Endometrium liegt nicht, wie andere Gewebstypen, im ‚steady state‘ vor, sondern unterliegt einem permanenten Wandel bedingt dadurch, dass es als Zielorgan durch die ständigen Veränderungen der ovariellen Hormone im Verlauf des Menstruationszyklus in seiner Differenzierung beeinflusst wird.

Bei der Auswahl der Endometrien wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- die Patientin musste prämenopausal sein
- die Progesteron und Östradiol-Serumwerte mussten in einem definierten Bereich liegen (Anhang Tab.14)
- die Patientin musste sich in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus befinden
- die Patientin durfte weder Hormonpräparate noch Präparate, die den Hormonhaushalt beeinflussen, eingenommen haben.

Zur Durchführung der Expressionsanalysen haben wir den “Atlas Human cDNA Expression Array“ von CLONTECH verwendet. Dieser Array umfasst cDNAs von 588 Genen, die für Proteine der in Abb. 14a aufgeführten funktionellen Gruppen kodieren, sowie von 9 konstitutiv exprimierten Genen zur Standardisierung der Expressionslevel.

Jedes Gen ist als Doppelpunkt auf der Membran vertreten (Abb. 14b), um falsch-positive Signale auszuschließen. Die auf der Nylonmembran immobilisierten cDNA-Fragmente sind zwischen 200 und 600 bp lang. Sie enthalten weder PolyA-Sequenzen, noch repetitive Elemente oder hoch homologe Sequenzen, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden.

Kontaminationen der Sonde durch genomische DNA können anhand von Spots genomischer DNA am rechten Rand und einer Reihe Spots unterhalb der konstitutiv exprimierten Gene detektiert werden (in Abb. 14b nicht zu erkennen).

Die RNA wurde aus den Endometrien isoliert, DNA-Verunreinigungen mittels DNaseI-Verdau entfernt und die Qualität der RNA-Proben gelelektrophoretisch überprüft.

Zur Herstellung der cDNA-Sonden wurde die RNA unter Zugabe von radioaktiv markiertem dATP revers transkribiert. Nach dem Entfernen nicht eingebauter Nukleotide sowie von cDNA-Fragmenten von weniger als 100 bp Länge erfolgte die Hybridisierung der Atlas Arrays. Nicht gebundene cDNA wurde unter stringenten Bedingungen entfernt und der Array auf einem hoch sensitiven Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit war abhängig von der Intensität der Signale auf dem Röntgenfilm. Die Signale wurden nach Abzug des lokalen Hintergrundsignals densitometrisch ausgewertet.

Insgesamt wurden das Expressionsprofil von vier Endometrien von nicht an Endometriose erkrankten Frauen (En) und drei Endometrien von Endometriose-Patientinnen (EnEMT) erstellt.

Aus zwei der vier Endometrien nicht betroffener Frauen wurde mRNA aus den restlichen zwei Proben nicht betroffener Frauen Gesamt-RNA isoliert und für die Untersuchungen verwendet. Es konnten keine Unterschiede bezüglich Signalintensität und Expressionmuster festgestellt werden, obwohl laut Hersteller die Sensitivität durch die Verwendung von mRNA erhöht werden sollte. Im Gegenteil, wurde mRNA zur Herstellung der cDNA-Sonde eingesetzt, so kam es in allen Fällen zu einem erhöhten Hintergrundsignal, das in 80 % der Versuche so stark war, dass die Arrays nicht ausgewertet werden konnten. Trotz zusätzlicher Fällung der mRNA und unterschiedlichster Aufreinigungen der cDNA-Sonde zum Entfernen

freier Nukleotide oder anderer Kontaminationen ließ sich das unspezifische Hintergrundsignal nicht beseitigen.

Zur Analyse des Expressionsprofils von Endometriose-Patientinnen wurde deswegen Gesamt-RNA verwendet.

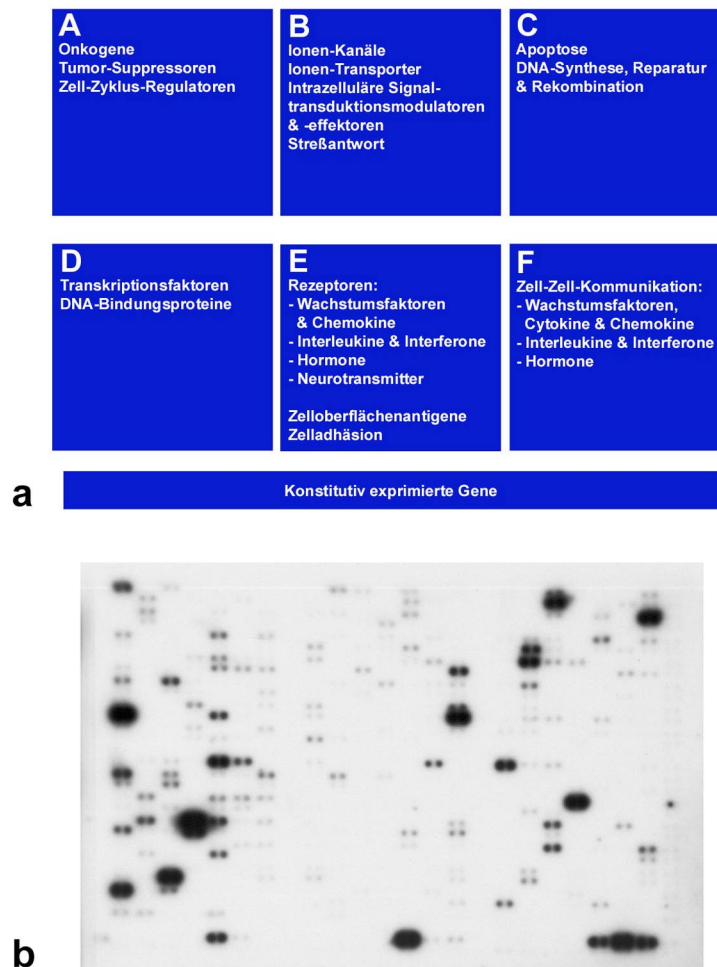


Abb. 14: „Atlas Human cDNA Expression Array“ (CLONTECH)

(a) Schematische Darstellung der auf dem „Atlas Human cDNA Expression Array“ vertretenen funktionellen Gruppen; (b) Autoradiogramm eines cDNA Arrays mit dem Expressionsprofil des humanen Endometriums;

4.2.2 Expressionsmuster humaner Endometrien

Insgesamt konnten 208 von 588 auf den Arrays vorliegenden Genen im Endometrium nachgewiesen werden (Tab.16). Von diesen 208 Genen werden 74 Gene (Anhang Tab. 16 dunkelgrau unterlegt) in allen Proben ohne signifikante Unterschiede zwischen den Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose transkribiert. 11 Gene werden in Endometrien von Endometriose-Patientinnen signifikant herunterreguliert (Tab. 5; Anhang Tab. 16 kursiv) und 6 signifikant hochreguliert (Tab. 6; Anhang Tab. 16 kursiv).

Tab. 5: Im Endometrium von Endometriose-Patientinnen herunterregulierte Gene

	Gen- / Proteinbezeichnung	Relativer Expressionslevel	
		Endometrium von Frauen	
		ohne Endometriose (n=4)	mit Endometriose (n=3)
A1h	v-erbA related protein (EAR2)	0,34 ± 0,13	0,06 ± 0,05
A6b	proliferating cell nucleolar antigen P120; NOL1	0,16 ± 0,10	0,04 ± 0,04
B7l	27-kDa heat-shock protein (HSP27); stress-responsive protein 27 (SRP27); estrogen-regulated 24-kDa protein; HSPB1	3,60 ± 0,93	1,55 ± 0,66
C3b	glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3)	2,60 ± 0,64	1,11 ± 0,45
D3k	guanine nucleotide-binding protein G-s alpha subunit (GNAS); adenylate cyclase-stimulating G alpha protein	3,07 ± 1,33	1,27 ± 0,23
D3l	homeobox protein HOXB7; HOX2C; HHO.c1	0,56 ± 0,08	0,15 ± 0,20
D4g	transcription factor ETR101	1,41 ± 0,88	0,24 ± 0,21
D5f	nucleobindin precursor (NUC)	1,42 ± 0,21	0,63 ± 0,16
E7m	beta catenin (CTNNB)	0,24 ± 0,10	0,06 ± 0,04
F1a	insulin-like growth factor II (IGF2); somatomedin A	3,28 ± 1,15	1,37 ± 0,47
F4d	thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10	4,04 ± 0,98	1,62 ± 0,48

Das Transkript von 4 Genen ist nur im Endometrium von erkrankten Frauen nachweisbar (Tab.7; Anhang Tab. 16 kursiv).

Bei 59 Genen konnte das Transkript in einer der vier Endometrien nicht betroffener Frauen und/oder einer der drei Endometrien von Endometriose-Patientinnen nicht detektiert werden (Anhang Tab. 16 hellgrau unterlegt). Alle übrigen Gene wurden heterogen, ohne erkennbares Muster exprimiert.

Tab. 6: Im Endometrium von Endometriose-Patientinnen hochregulierte Gene

	Gen- / Proteinbezeichnung	Relativer Expressionslevel	
		Endometrium von Frauen	
		ohne Endometriose (n=4)	mit Endometriose (n=3)
A2c	vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1); tyrosine-protein kinase receptor flt +soluble VEGFR; tyrosine-protein kinase receptor SFLT	0,03 ± 0,03	0,24 ± 0,04
A4k	EB1 protein	0,11 ± 0,08	0,36 ± 0,16
D1l	60S ribosomal protein L6 (RPL6); TAX-responsive enhancer element binding protein 107(TAXREB107); neoplasm-related protein C140	0,36 ± 0,19	1,11 ± 0,21
E5h	intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen	0,03 ± 0,02	0,22 ± 0,13
E7f	fibronectin receptor beta subunit (FNRB); integrin beta 1 (ITGB1); VLA4 beta subunit; CD29 antigen	0,07 ± 0,06	0,23 ± 0,09
F2j	T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine	0,03 ± 0,02	0,15 ± 0,04

Tab. 7: Gene, die ausschließlich im Endometrium von Endometriose-Patientinnen exprimiert werden

	Gen- / Proteinbezeichnung	Relativer Expressionslevel	
		Endometrium von Frauen ohne Endometriose (n=4)	mit Endometriose (n=3)
D1n	cellular nucleic acid binding protein (CNBP); sterol regulatory element-binding protein	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,10
F4j	migration inhibitory factor-related protein 14 (MRP14); calgranulin B; leukocyte L1	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,38
F4l	platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF1)	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,06
G13	brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1)	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,32

Anhand von Literaturrecherchen wurde ermittelt, welche Rolle die in den Tabellen 5 bis 7 aufgelisteten Faktoren im Endometrium, während der Implantation, und der Entstehung bzw. Entwicklung der Endometriose spielen können.

7 der 21 Gene bzw. Proteine wurden aufgrund der Ergebnisse der Literaturrecherchen für weitere Versuche ausgewählt (Abb.15).

EAR2 (A1h) ist ein Orphanrezeptor, der in der Lage ist die östrogenregulierte Expression verschiedener Gene, z.B. des Oxitocin-Gens im Endometrium (Chu und Zingg, 1997), zu supprimieren.

HSP27 (B7l) gehört zu den Hitzeschock-Proteinen. Es wird im Endometrium hormonell reguliert. HSP27 schützt vor der Wirkung von TNF α insbesondere im Implantationsfenster (Tabibzadeh und Broome, 1999).

IGFII (F1a) spielt eine Rolle bei der Regeneration (Roy et al., 1999) und Abstoßung des Endometriums (Giudice et al., 1993), sowie in der frühen Implantationsphase (Irwin et al., 1994; Giudice et al., 1993).

Durch die Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor 1 (A2c) wird das Kapillarwachstum in der Proliferationsphase des Zyklus reguliert. VEGFR-1 spielt auch während der Implantation eine Rolle. Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation ist u.a. die Erhöhung der mikrovaskuläre Dichte im Endometrium und die Permeabilität der Blutgefäße (Meduri et al., 2000).

ICAM-1(E5h) ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, das die durch ‚natural killer‘- (NK-) Zellen vermittelte Lysis von Tumorzellen hemmen kann, und somit eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung von Tumoren spielt (Johnson et al., 1989; Becker et al., 1991; Johnson, 1991; Giavazzi et al., 1992). Es wird vermutet, dass ICAM-1 die Lysis von retrograd in die Bauchhöhle menstruiertem Endometrium durch NK-Zellen verhindert und somit hilft, der Immunabwehr zu entkommen (Somigliana et al., 1996).

RANTES (F2j) gehört zu den Cytokinen. In verschiedenen Studien wurde eine Korrelation zwischen der RANTES-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit und dem Grad der Endometriose beobachtet (Hornung et al., 1997).

Integrin β_1 (E7f) vermittelt nicht nur den Kontakt zwischen extrazellulärer Matrix und der Zelle, sondern spielt auch eine Rolle bei der Adhäsion von endometrialen Gewebefragmenten an das Peritoneum (van der Linden, 1995), sowie der Blastozystenentwicklung nach der Implantation (Shiokawa et al., 1999).

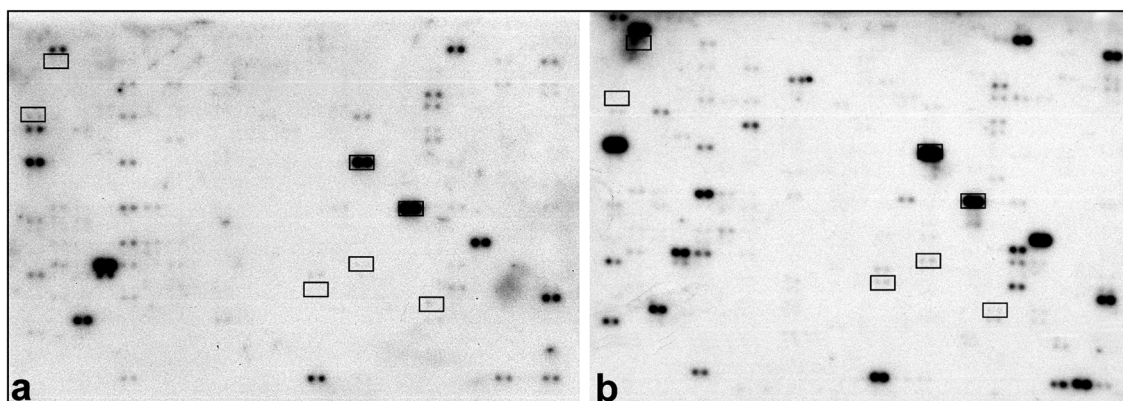


Abb. 15: Autoradiogramme von cDNA Arrays des humanen Endometriums

(a) eutopes Endometrium einer Patientin ohne Endometriose; (b) eutopes Endometrium einer Endometriose-Patientin; Umrahmt sind die Gene, deren Expression sich zwischen den eutopen Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose signifikant unterschied und mittels semiquantitativer RT-PCR zur Validierung der cDNA Expressionsanalyse analysiert wurden. Expositionszeit: (a) 3 Tage, (b) 2 Tage

Die Expression von β -Catenin, das im Endometrium bei der Zell-Zell-Adhäsion des Epithels eine Rolle spielt, wurde bereits immunhistochemisch in eutopen Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose untersucht (4.1.3.2). Die immunhistochemischen Analysen haben ebenso wie die Array-Analysen gezeigt, dass β -Catenin im Endometrium von Frauen mit Endometriose schwächer exprimiert wird als im Endometrium von gesunden Frauen. Eine weitere Verifizierung der β -Catenin-Expression wurde nicht durchgeführt.

Es konnte keine Verbindung zwischen den übrigen in den Tabellen 5 bis 7 aufgeführten Faktoren und dem Endometrium, der Endometriose oder uteruspezifischen Abläufen hergestellt werden.

4.2.3 Validierung der Ergebnisse des cDNA-Expressionsanalysen

Zur Validierung der Expressionsunterschiede zwischen den Endometrien von Frauen ohne und solchen mit Endometriose wurde eine semiquantitative RT-PCR (Abb. 16, 18) durchgeführt.

Aus Gesamt-RNA unterschiedlicher Endometrien, die alle die oben beschriebenen Kriterien erfüllten, wurde durch Reverse Transkription cDNA synthetisiert. Zur Quantifizierung des relativen Expressionslevels des zu untersuchenden Gens wurde gleichzeitig ein Abschnitt der cDNA dieses Gens und der cDNA des β -Aktins amplifiziert. Die Bedingungen für die semiquantitative PCR wurden so gewählt, dass eine exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte auch noch im letzten PCR-Zyklus geben war. Hierzu wurde die in die PCR eingesetzte cDNA-Konzentration, die Anzahl der PCR-Zyklen und die Primer-Verhältnisse variiert, bis beide PCR-Produkte als distinkte Banden auf dem Agarose-Gel zu erkennen waren und nach Möglichkeit annähernd die gleiche Intensität hatten, und gleichzeitig die Amplifikation noch exponentiell verlief.

Die RT-PCR-Bedingungen, die für die Amplifikation der sieben Gene in Kombination mit β -Aktin gewählt wurden, sind im Abschnitt „Semiquantitative RT-PCR“ im Material und Methodenteil aufgeführt. Die semiquantitative RT-PCR wurde für jedes Gen dreimal wiederholt.

Die PCR-Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Hierbei wurde nach Abzug des lokalen Hintergrundes die Signalstärke des zu untersuchenden Gens in Relation zum β -Aktin-Signal derselben Probe gesetzt.

Insgesamt wurde an zwölf Endometrien, jeweils 6 von Frauen ohne Endometriose und 6 von Endometriose-Patientinnen, überprüft, ob sich die mit Hilfe der cDNA Expression Arrays ermittelten Veränderungen im Expressionsmuster verifizieren lassen.

EAR2, IGFII und HSP27 gehören zu der Gen-Gruppe, die im Endometrium von an Endometriose erkrankten Frauen herunterreguliert werden. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR bestätigen dieses Ergebnis nur tendenziell. Bereits anhand des Bandenmusters auf dem Agarosegel sind keine auffallenden Unterschiede in der Intensität der Signale zu beobachten (Abb. 16).

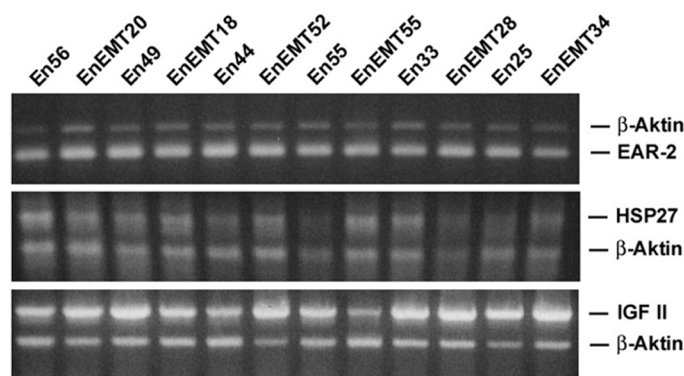
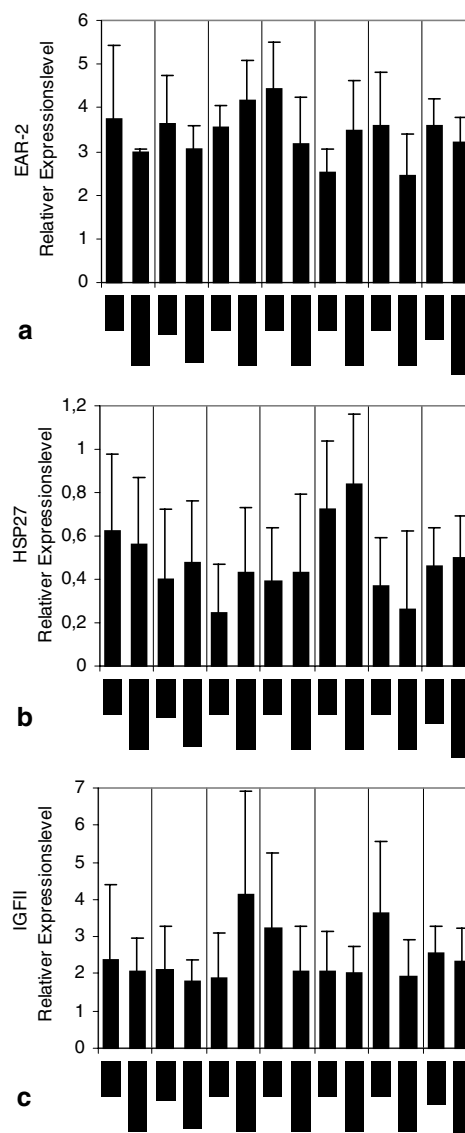


Abb. 16: Vergleich der relativen Expressionsstärke von EAR-2, HSP27 und IGFII im Endometrium von Frauen ohne (En) und mit Endometriose (EnEMT) mittels semiquantitativer RT-PCR; Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte wurde die Intensität der Banden densitometrisch ermittelt. Das Signal des β -Aktins diente hierbei als Standard.

Abb. 17: Relative Expressionsstärke von EAR-2, HSP27 und IGFII in eutopen Endometrien von Frauen ohne (En) und mit Endometriose (EnEMT); Gesamt-RNA der Endometrien wurde revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in eine semiquantitative RT-PCR eingesetzt. Die Intensität der PCR-Produkte wurde densitometrisch ermittelt. β -Aktins diente hierbei als Standard.



Die densitometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR belegt diese Beobachtung. EAR2 (Abb. 17a) wird tendenziell bei 4 der 6 anhand ihrer Hormonwerte zusammengestellten Paare (Anhang Tab. 15) schwächer im Endometrium von erkrankten Frauen exprimiert. Diese Unterschiede sind aber nicht signifikant.

Bei HSP27 (Abb. 17b) ist der entgegengesetzte Effekt zu beobachten. Bei 4 der 6 Pärchen ist der relative Expressionslevel im EnEMT leicht erhöht.

IGFII wird bei einer Probenkombination signifikant und bei vier Pärchen tendenziell im EnEMT herunterreguliert. In einem Fall ist jedoch, eine signifikante Hochregulation der Expression im Endometrium von Endometriose-Patientinnen zu beobachten (Abb. 17c).

Es stellt sich hier die Frage, ob dieses heterogene Expressionsprofil durch hormonelle Unterschiede bei den Patientinnen zustande kommen kann (Anhang Tab. 15).

En44/EnEMT52 weichen bei allen drei Genen von dem aufgrund der Expressionsanalysen erwarteten Expressionsmuster ab. In allen drei Fällen exprimiert EnEMT52 das Gen stärker

als En44. Da dieses Pärchen aber ähnliche Hormonserumwerte wie z.B. En25/EnEMT34 aufweist, En25/EnEMT34 aber eine genau entgegengesetzte Tendenz zeigt, lassen sich die Schwankungen im Expressionsprofil nicht durch eine hormonelle Beeinflussung erklären. Bildet man einen Mittelwert aus dem relativen Signalstärken aller Endometrien von nicht betroffenen Frauen (En_{ges}) und Endometriose-Patientinnen ($EnEMT_{ges}$), so zeigt sich, dass sich die relativen Expressionsstärken der Gene in den Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose nicht signifikant unterscheiden. Bei EAR2 und IGFII ist die Expression im normalen Endometrium etwas stärker, bei HSP27 im Endometrium erkrankter Frauen.

Auch für ICAM-1, VEGF-R1, RANTES und β_1 -Integrin konnten die in der cDNA Expressionsanalyse erzielten Ergebnisse mit der semiquantitative RT-PCR (Abb. 18) nur bei einem Teil der Probenpaare, der prozentuale Anteil schwankt je nach Faktor zwischen 17 und 67 %, tendenziell bestätigt werden. Die relativen Expressionslevel dieser vier Gene unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose.

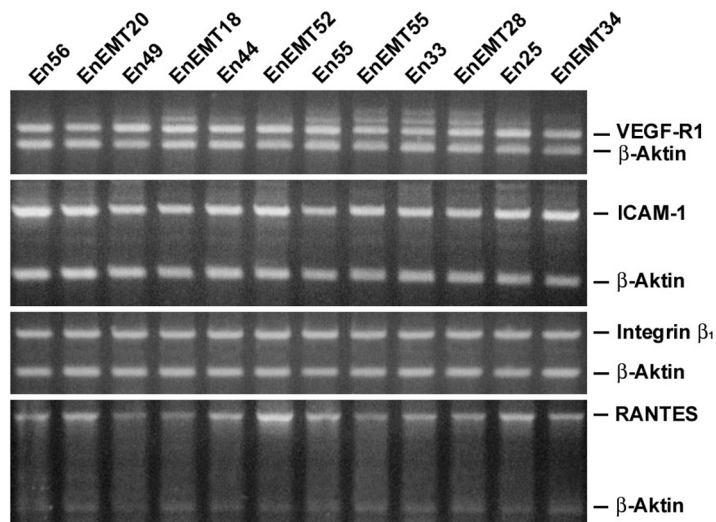


Abb. 18: Vergleich der relativen Expressionsstärke von ICAM-1, VEGF-R1, RANTES und β_1 -Integrin im Endometrium von Frauen ohne (En) und mit Endometriose (EnEMT) mittels semiquantitativer RT-PCR; Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte wurde die Intensität der Banden densitometrisch ermittelt. Das Signal des β -Aktins fungierte hierbei als Standard.

ICAM-1 wird in allen Proben nahezu gleichstark exprimiert (Abb.19b). Der Mittelwert aller Expressionslevel von normalen Endometrien liegt bei $0,97 \pm 0,11$ und der von Endometrien von Endometriose-Patientinnen bei $1,03 \pm 0,08$. Bei vier der sechs Probenpaare wird ICAM-1 in den Endometrien von Frauen mit Endometriose tendenziell stärker exprimiert (Abb. 19b), bei der β_1 -Untereinheit des Integrins ist diese Tendenz, bei 50 % der gegenübergestellten Probenpaare zu erkennen (Abb. 19c).

Für RANTES (Abb. 19d) und VEGF-R1 (Abb. 19a) ergab die densitometrische Messung, dass bei fünf bzw. drei der sechs Pärchen das normalen Endometrien eine höhere relative Expressionsstärke zeigten als das Endometrium von Endometriose-Patientinnen. Diese Tendenz wird auch anhand der Mittelwerte der relativen Signalstärken offensichtlich und widerspricht den Array-Ergebnissen. Für Endometrien von Endometriose-Patientinnen beträgt $EnEMT_{ges}$ für RANTES $2,19 \pm 0,70$ und VEGF-R1 $1,03 \pm 0,14$ und für Endometrien von nicht erkrankten Frauen $2,47 \pm 0,38$ bzw. $1,05 \pm 0,12$ (Abb. 19a,d).

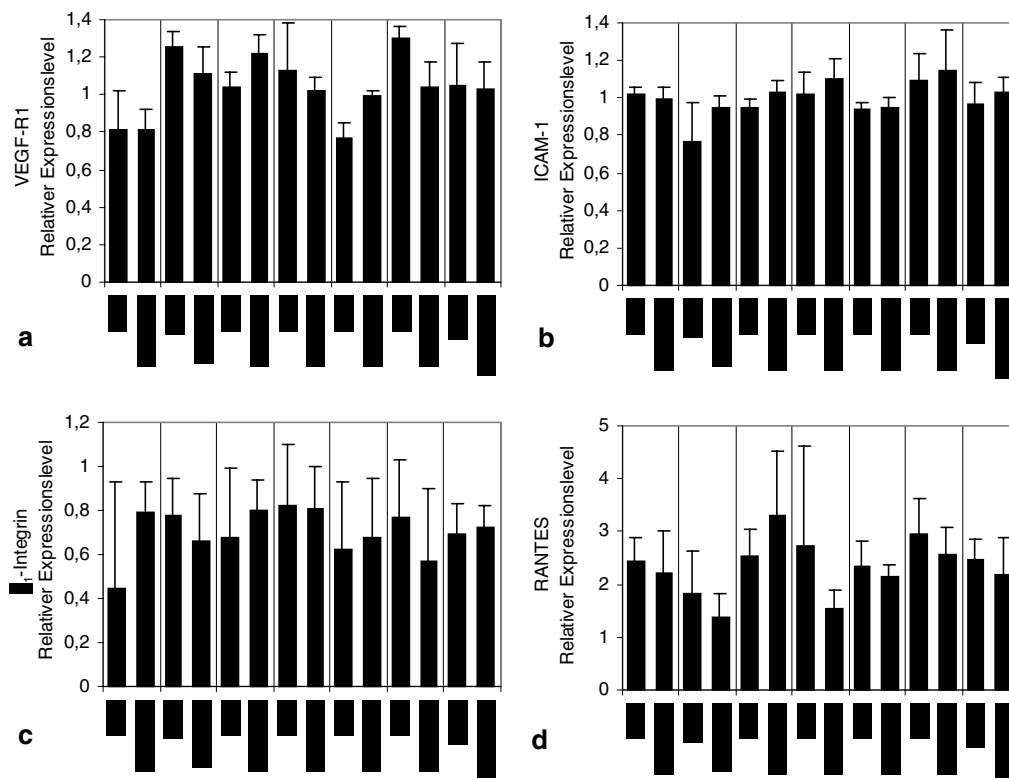


Abb. 19: Relative Expressionsstärke von (a) VEGF-R1, (b) ICAM-1, (c) β_1 -Integrin und (d) RANTES in eutopen Endometrien von Frauen ohne (En) und mit Endometriose (EnEMT); Die aus den Endometrien isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in eine semiquantitative RT-PCR eingesetzt. Die Intensität der PCR-Produkte wurde densitometrisch ermittelt. β -Aktins diente hierbei als Standard.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Falle von EAR-2 und IGFII 67 % der Endometrien von Endometriose-Patientinnen eine schwächere und im Falle von ICAM-1 und Integrin β_1 67 % bzw. 50 % dieser Endometrien tendenziell eine höhere Expression zeigten als die Endometrien von Frauen ohne Endometriose.

4.3 Etablierung und Charakterisierung endometrialer Primärkulturen und endometrialer Zelllinien

Durch die Etablierung von Zellkulturmodellen besteht die Möglichkeit, unabhängig von frisch entnommenem Gewebe, die Ursachen zur Entstehung der Endometriose zu untersuchen und neue Therapiemodelle zu entwickeln.

Immunhistochemische Untersuchungen und Expressionsanalysen brachten eine Vielzahl an Faktoren zu Tage, deren Expression auf RNA- und / oder Proteinebene in ektopen und eutopen Endometrien von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu nicht betroffener Frauen variieren. Durch die Transfektion der endometrialen Zelllinien mit diesen Kandidatengen kann deren Funktion im humanen Endometrium und bei der Pathogenese der Endometriose analysiert werden. Anhand der Zellkulturmodelle besteht zudem die Möglichkeit, unterschiedliche Substanzen auszutesten, die die Expression dieser Faktoren beeinflussen, und somit für die Entwicklung neuer Therapieansätze von Nutzen sein können. Desweiteren kann der Einfluss veränderter zell- und molekularbiologischer Parameter, wie z.B. der Verlust der Zelladhäsion oder die Hoch- oder Herunterregulation verschiedener Gene untersucht werden.

4.3.1 Isolierung von Epithelaggregaten und Stromazellen aus humanem Endometrium

Für die Etablierung von Primärkulturen aus endometrialen Epithel- und Stromazellen musste zuerst die Isolierung der beiden Zelltypen aus dem Endometrium erfolgen. Hierzu musste eine Methode gefunden werden, die zu einer hohen Ausbeute an Epithel- bzw. Stromazellen führt, eine möglichst geringe Verunreinigung durch den jeweils anderen Zelltyp zeigt und bei der die Mortalitätsrate möglichst gering ist.

In verschiedenen Arbeiten wurde die Aufreinigung von Epithel- und Stromazellen aus endometrialem Gewebe beschrieben (Satyaswaroop et al., 1979, Matthews et al., 1992, Bentin-Ley et al., 1994, Overton et al., 1997). Eine Kombination aus den Methoden der genannten Publikationen erwies sich in Hinblick auf Ausbeute und Vitalität der Zellen sowie Reinheit der Zellkulturen als geeignet.

Diese Methode beruht auf einer Filtration der Drüsenepithelaggregate und Stromazellen, die durch einen Kollagenase-Verdau separiert und anschließend durch Membranen mit unterschiedlicher Porengröße voneinander getrennt wurden (3.8.5).

Nach der Aufreinigung der Zellen wurde die Zellzahl mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer bestimmt, ein Vitalitätstest durchgeführt und die Reinheit der Zellsuspensionen ermittelt.

Um die Vitalität der Zellen zu testen, wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt (3.8.8). Bei diesem Verfahren macht man sich zunutze, dass lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen können. Trypanblau kann nur in abgestorbene Zellen eindringen, die dann eine blaue Färbung zeigen. Durch die Bestimmung der Anzahl der gefärbten und ungefärbten Zellen in der Suspension unter Verwendung einer NEUBAUER-Zählkammer wurde der prozentuale Anteil der abgestorbenen Zellen ermittelt.

Im Durchschnitt betrug die Mortalitätsrate der Epithelzellen $2,9 \% \pm 2,6 \%$ (n=9) und die der Stromazellen $3,6 \% \pm 2,5 \%$ (n=9).

Die Reinheit von Epithel- und Stromazellkulturen wurde durch immunhistochemische Anfärbung mit Human-anti-Cytokeratin- bzw. -Vimentin-Antikörpern überprüft (Abb. 27b,e, 34b,e). Durch Auszählung der Cytokeratin-positiven und -negativen Zellen konnte der Grad der Verunreinigung der Zellkulturen durch den jeweils anderen Zelltyp errechnet werden.

Die Verunreinigung der Epithelzellen mit Stromazellen lag im Durchschnitt bei $12,8 \% \pm 2,8 \%$ (n=5), wohingegen es sich bei $7,1 \% \pm 2,8 \%$ (n=5) der Zellen in der Stromakultur um Epithelzellen handelte.

Alternativ zur beschriebenen Methode wurden die endometrialen Epithelaggregate und Stromazellen durch Sedimentation (3.8.6) voneinander getrennt (abgewandelt nach Osteen et al., 1989). Aufgrund der unterschiedlichen hohen Massen von Epithelaggregaten und vereinzelt vorliegenden Stromazellen sinken Epithelzellen in Kulturmedium schneller auf den Boden des Gefäßes herab.

Durch die große Anzahl an Reinigungsschritten bei dem Sedimentationsverfahren kam es zu einem hohen Verlust an Zellen. Die Zellausbeute war bei annähernd gleicher Ausgangsmenge Endometrium um einen Faktor von $1 \cdot 10^2$ bis $1 \cdot 10^3$ niedriger als bei der nur auf Filtration beruhenden Methode.

Da das Filtrationsverfahren alle geforderten Kriterien, nämlich eine hohe Zellausbeute, geringe Verunreinigungen der Kulturen, sowie eine geringe Mortalitätsrate, erfüllte, wurde diese Methode als Standardverfahren zur Isolierung von Epithelaggregaten und Stromazellen aus humanem Endometrium eingesetzt.

4.3.2 Immunomagnetische Aufreinigung der Primärzellen

Um die Reinheit der epithelialen und stromalen Zellsuspension zu erhöhen, wurden das Zell-Isolierungssystem von Dynal eingesetzt (3.8.7). Bei diesem System erfolgt eine gezielte Isolierung oder, je nach Fragestellung, Beseitigung eines bestimmten Zelltyps, z.B. aus einer Zellsuspension, unter Verwendung von Anti-BerEP4-Antikörper-beschichteten Magnetpartikel (Dynabeads). Zur Aufreinigung der Epithelproben wurden die in der Zellsuspension befindlichen Epithelzellen über Anti-BerEP4-Antikörper an die Dynabeads gebunden. Die frei in der Suspension vorliegenden Stromazellen wurden durch Entnahme des Überstandes entfernt.

Die Epithelzellen mussten an die Dynabeads gekoppelt kultiviert werden, da keine Möglichkeit bestand, entweder die Antigen-Antikörper-Bindung oder die Bindung des Antikörpers an den Magneten zu lösen. Ein Vergleich von Epithelkulturen mit und ohne Magnetpartikel-Kopplung zeigte, dass die Existenz der Magnetpartikel keine Auswirkungen auf die Lebensdauer der Kultur oder die Morphologie der Zellen hatte.

Zur Beseitigung der Epithelzellen aus der Stromazellsuspension wurden die an die Dynabeads gebundenen Epithelzellen im Magnetfeld an der Gefäßwand konzentriert. Die im Überstand vorliegenden Stromazellen wurden aus dem Reaktionsgefäß entnommen und kultiviert.

Durch die immunomagnetische Aufreinigung nahm der Anteil der Stromazellen in der Epithelkultur von durchschnittlich 12,8 % auf 2,6 % ab. Die Kontamination der Stromakultur durch Epithelzellen sank von 7,1 % auf 1,2 %.

4.3.3 Proliferationsaktivität der Primärzellkulturen

Um den geeigneten Zeitpunkt für die Transfektion der Primärkulturen zu ermitteln, war die Analyse der Proliferationsaktivität der primären Epithel- und Stromazellen unerlässlich.

Die Bestimmung der Proliferationsrate der endometrialen Epithelzellen erfolgte von Tag 1 bis Tag 7 der Kultivierung. Die Epithelzellen wurden für die Erhebung der Proliferationsrate mit anti-Ki-67-Antikörpern behandelt. Um sicherzustellen, dass es sich um Epithelzellen handelte, wurde eine Doppelinkubation mit anti-Cytokeratin- und anti-Ki67-Antikörpern durchgeführt. Die Kultivierung der Epithelzellen erfolgte in Medium unterschiedlicher Zusammensetzung: a) in DMEM/F-12 mit 10 % FCS und 1 µg 17β-Estradiol / ml und b) in DMEM/F-12 mit 10 % FCS, 1 µg 17β-Estradiol / ml und 25 ng EGF / ml.

Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass primäre Epithelzellen sowohl ER als auch EGF-R exprimieren (Abb. 27h, 28b), und somit in der Lage sind, auf die beiden Substanzen zu reagieren.

Der prozentuale Anteil der proliferierenden Epithelzellen an der Gesamtzellzahl unterschied sich bei Verwendung der beiden Medien nicht wesentlich (Abb. 20a). Nach Adaptation an die Kulturbedingungen gehen die primären Epithelzellen ab Tag 2 in die exponentielle Wachstumsphase über. Zwischen Tag 3 und je nach Kulturmedium Tag 5 bzw. 6 sind durchschnittlich 30 % der Zellen teilungsaktiv. Wurde dem Kulturmedium nur Östradiol zugesetzt, so gingen die Epithelzellen ab Tag 5 in den teilungsinaktiven Zustand über. Durch zusätzliche Gabe von EGF konnte, wie in Abb. 20a erkennbar ist, der Übergang in die replikative Seneszenz um 1-2 Tage verzögert werden.

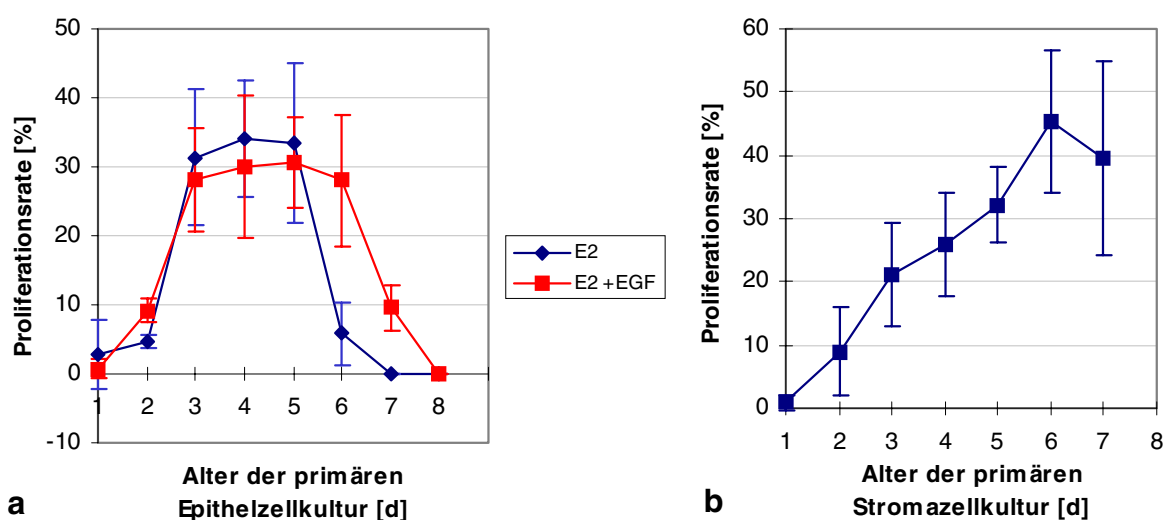


Abb. 20: Proliferationsaktivität endometrialer Primärzellen in Kultur

Die primären Epithel- und Stromazellen wurden aus dem humanen Endometrium mit der Filtrationsverfahren isoliert und auf Matrigel-beschichteten Glasplättchen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Erhebung der Proliferationsrate wurde Proliferationsmarker Ki67 immunhistochemisch detektiert, und der prozentuale Anteil Ki67-positiver Zellen ermittelt.

(a) Die Kultivierung der primären Epithelzellen erfolgte über einen Zeitraum von 7 bzw. 8 Tagen in DMEM/Ham's F-12 mit 10 % FCS und 1 µg 17β-Estradiol / ml (blau) bzw. 1 µg 17β-Estradiol / ml und 25 ng EGF / ml (rot).

(b) Die primären Stromazellen wurden für 7 Tage in DMEM/Ham's F-12 mit 10 % FCS kultiviert.

Endometriale Stromazellen wurden in DMEM/F-12 mit 10 % FCS kultiviert. Die Teilungsaktivität der Kultur nahm, wie an der Proliferationskurve in Abb. 20b zu sehen ist, von Tag 2 bis Tag 6 kontinuierlich zu. Die Verringerung der Teilungsaktivität der Stromakultur an Tag 7 war bedingt durch die Bildung eines konfluenten Zellmonolayers. Durch Kontakthemmung wird die Zellvermehrung blockiert. Nach Passagieren der Zellen in ein größeres Kulturgefäß setzte die Proliferationsaktivität der Stromazellen nach erneuter Adaption an die Wachstumsbedingungen der Kultur wieder ein. Die Verdopplung der FCS-

Konzentration im Medium zeigte keine Wirkung auf die Proliferationsaktivität der Stromazellen (nicht dargestellt). Im Gegensatz zu den primären Epithelzellen, die sich nicht subkultivieren ließen, konnten die primären Stromazellen durchschnittlich 11-mal passagiert werden und traten nicht, wie die Epithelzellen, bereits vor der ersten Passagierung in die replikative Seneszenz ein.

Durch die Analyse der Proliferationsaktivität konnte der optimale Zeitraum für die Transfektionsexperimente der Epithel- bzw. Stromazellen auf Tag 3 bzw. 4 nach dem Anlegen der Primärkultur festgelegt werden.

4.3.4 Etablierung permanenter endometrialer Zelllinien

Die Analyse der Proliferationsaktivität der endometrialen Primärzellen verdeutlicht, dass Langzeitstudien mit primären Epithelzellen nicht möglich sind, da diese nach maximal einer Woche in Kultur in die replikative Seneszenz übergehen.

Die primären Stromakulturen hingegen ließen sich durchschnittlich bis Passage 11 (n=3) kultivieren.

Für die Durchführung von Langzeitstudien sind stabile Zelllinien notwendig, die durch Immortalisierung von Primärzellen hergestellt werden können.

4.3.5 Analyse der Effizienz unterschiedlicher Transfektionsverfahren

Für die Transfektion der primären Epithel- und Stromazellen standen vier Transfektionsverfahren zur Auswahl: die drei Transfektionsreagenzien Effectene (QIAGEN), LipofektAMINE (Gibco) und SuperFect (QIAGEN) sowie die *in situ*-Elektroporation.

Unter Verwendung des Expressionsvektors pEGFP-C1 wurde die für den jeweiligen Zelltyp am besten geeignete Transfektionstechnik ermittelt.

Dieser Expressionsvektor kodiert für eine Variante des ‚green fluorescence protein‘ (GFP)-Wildtyps der Qualle *Aequorea victoria*. GFP stellt ein wichtiges Reportermolekül dar, das den direkten Nachweis der Expression von transfizierten Genen, sowie die Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen speziesunabhängig ermöglicht. Wird der Expressionsvektor pEGFP-C1 in eine Zelle transfiziert und GFP alleine oder fusioniert mit einem anderen Genprodukt exprimiert, so leuchtet diese Zelle unter UV-Licht der Wellenlänge 488 nm grün.

Die frisch isolierten endometrialen Zellen wurden in 24-well-Platten bzw. Transwellfilter kultiviert. Die primären Epithelzellen wurden am dritten Tag nach der Isolierung aus dem

Endometrium transfiziert. Es wurde dieser Zeitpunkt gewählt, da an diesem Tag die Kultur erstmals das Niveau der maximalen Proliferationsrate erreicht, und die Zellen noch weitere drei Tage unter Einfluss von E₂ und EGF teilungsaktiv sind, bevor sie in die replikative Seneszenz übergehen (Abb. 20a).

Die Transfektion der primären Stromazellen erfolgte je nach Zelldichte am dritten bzw. vierten Kultivierungstag. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Stromazellen einen zu etwa 60 bis 80 % konfluenten Zellmonolayer gebildet.

Durch Transfektion der primären endometrialen Epithel- und Stromazellen mit dem Expressionsvektor pEGFP-C1 wurde die Transfektionseffizienz der vier beschriebenen Verfahren analysiert.

Um die optimalen Bedingungen für die jeweilige Transfektionsmethode zu finden, wurden unter Berücksichtigung der Herstellerangaben in jedem Transfektionsdurchgang die Parameter, z.B. das DNA-Transfektionsreagenz-Verhältnis, die DNA-Menge, die Spannung oder der Widerstand, variiert (Tab. 8-12).

Tab. 8: Effectene; Parameter und Transfektionsraten

DNA [µg]	Effectene [µl]	DNA/Effectene	transfizierte Stromazellen [%]	transfizierte Epithelzellen [%]
0,1	2,5	1:25	2,5 ± 0,2	0,0
0,2	5	1:25	1,9 ± 0,2	0,0
0,4	10	1:25	0,2 ± 0,3	0,0
0,2	2,0	1:10	2,2 ± 0,2	0,0
0,2	10	1:50	0,0 ± 0,0	0,0
-	10	-	0,0 ± 0,0	0,0
24-well-Platte, 6 h Inkubation				

Um die Effizienz der drei Reagenzien Effectene, LipofectAMINE und SuperFect vergleichen zu können, wurden alle drei Verfahren an Zellen durchgeführt, die aus demselben Endometrium stammten. Da nur eine begrenzte Anzahl an Zellen zur Verfügung stand, wurden die primären Epithel- und Stromakulturen in 24-well-Platten kultiviert.

Tab. 9: LipofectAMINE; Parameter und Transfektionsraten

DNA [µg]	LipofectAMINE [µl]	DNA / LipofectAMINE	transfizierte Stromazellen [%]	transfizierte Epithelzellen [%]
0,2	1,0	1:5	1,4 ± 0,8	0,0
0,4	1,0	1:2,5	3,0 ± 2,3	0,0
0,2	1,5	1:7,5	7,1 ± 5,4	0,0
0,4	1,5	1:3,75	8,8 ± 6,3	0,0
-	2,0	-	0,0 ± 0,0	0,0
24-well-Platte, 6 h Inkubation				

Tab. 10: SuperFect; Parameter und Transfektionsraten

DNA [µg]	SuperFect [µl]	DNA/SuperFect	transfizierte Stromazellen [%]	transfizierte Epithelzellen [%]
0,2	1,2	1:6	1,4 ± 0,4	0,0
0,5	3	1:6	5,2 ± 1,3	0,0
0,5	4	1:8	4,3 ± 1,5	0,0
0,2	2	1:10	1,1 ± 0,2	0,0
-	6	-	0,0 ± 0,0	0,0
24-well-Platte, 6 h Inkubation				

Der Vergleich der Transfektionsraten zeigte, dass sich die Liposomen-Technik für die Transfektion von Stromazellen am besten eignet. Bei Verwendung von Effectene leuchteten maximal 2,2 % (Tab.88) und von SuperFect 5,2 % (Tab. 10) der Zellen grün. Durch Lipofektion hingegen konnten durchschnittlich 8,8 % (Tab. 9) der Stromazellen transfiziert werden.

Bei den primären Epithelzellen lag die Transfektionsrate bei allen drei Verfahren bei 0 % (Tab. 8-10). Keines dieser drei Verfahren eignet sich für die Transfektion primärer endometrialer Epithelzellen.

Da die Zellausbeute an Stromazellen nach der Isolierung hoch genug war, um innerhalb von 3 bis 4 Tagen einen zu 60 bis 80 % konfluenten Monolayer in 6-well-Platten zu erhalten, wurden die Parameter für die Lipofektion von Stromazellen in 6-well-Platten optimiert (Tab. 11).

Tab. 11: LipofectAMINE; Parameter und Transfektionsraten

DNA [µg]	LipofectAMINE [µl]	DNA / LipofectAMINE	transfizierte Stromazellen [%]
1,0	8,0	1:8	12,6 ± 12,0
1,5	8,0	1:5,3	20,0 ± 6,7
2,0	8,0	1:4	12,7 ± 4,7
-	8,0	-	0,0 ± 0,0
6-well-Platte, 6 h Inkubation			

Unter Verwendung von 1,5 µg Plasmid-DNA und 8 µl LipofectAMINE und einer Inkubation für 6 h bei 37°C wurde die höchste Transfektionseffizienz erreicht. Es gelang, durchschnittlich 20 % der primären Stromazellen mit dem Vektor pEGFP-C1 zu transfizieren.

Durch die *in situ*-Elektroporation war es möglich, primäre Epithelzellen zu transfizieren (abgewandelt nach den Angaben von Starzinski-Powitz et al., persönliche Kommunikation).

Die Transfektionsrate lag unabhängig von den gewählten Bedingungen (Tab. 12) zwischen 12,4 % und 15,4 %. Zur Etablierung von stabilen endometrialen Epithelzelllinien wurde, trotz geringerer Transfektionseffizienz, die *in situ*-Elektroporation mit 20 µg DNA bei 70 V, 150 µF und 100 Ω durchgeführt, da die Behandlung mit geringerer Spannung schonender für die Zellen war.

Tab. 12: *in situ*-Elektroporation; Parameter und Transfektionsraten

DNA [µg]	Spannung [V]	transfizierte Stromazellen [%]	transfizierte Epithelzellen [%]
20	70	17,6 ± 4,4	13,6 ± 7,5
30	70	n.d.	13,2*
20	100	n.d.	12,4*
30	100	17,0 ± 3,1	15,4 ± 6,4
24 mm-Transwellfilter, 150 µF, 100Ω			

* n=1

Der prozentuale Anteil transfizierter Stromazellen konnte durch *in situ*-Elektroporation im Vergleich zur Lipofektion (20,0 %) nicht gesteigert werden. Die Transfektionsrate lag durchschnittlich bei etwa 17 % (Tab. 12).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erfolgte die Etablierung stabiler Stromazelllinien unter Verwendung von LipofectAMINE unter den in Tabelle 11 markierten Bedingungen. Die endometrialen Epithelzellen hingegen wurde zur Etablierung stabiler Zelllinien mittels *in situ*-Elektroporation transfiziert (Tab. 12, Markierung).

4.3.6 Immortalisierung von primären endometrialen Zellen

Das Ziel der Transfektion primärer Stromazellen bzw. Epithelzellen war es, stabile Zelllinien zu etablieren. Als Ausgangsmaterial für die Etablierung der stabilen Zelllinien dienten 11 Endometrien, 5 von Frauen ohne Endometriose und 6 von Endometriose-Patientinnen. Nach Isolierung von Epithel- und Stromazellen aus dem Gewebe wurden diese mit den Vektoren pMSSVLT, ein Vektor der für das SV40 largeT-Antigen (SV40LT) kodiert, pRc/E1A sowie pRc/E1A und pBabe/Hygro/E1B im Verhältnis 10:1 transfiziert.

24 h nach Lipofektion der Stromazellen bzw. *in situ*-Elektroporation der Epithelzellen wurden die transfizierten Zellen vereinzelt. Nach 48 h wurde mit der Selektion stabil transfizierter Zellen begonnen (3.8.10).

Stabil transfizierte Zellen wuchsen nach etwa 3 Wochen zu Kolonien aus. Insgesamt wurden 180 Zellkolonien vereinzelt. Von den 180 Zellkolonien starben 40 in Passage 1 bzw. 2 ab, als Passage 1 wurde die Überführung in die Mikrotiterplatte definiert. Da trotz der geringen

Verunreinigung der Primärkulturen durch den jeweils anderen Zelltyp nicht ausgeschlossen werden kann, dass in einer transfizierten Epithelprimärkultur auch Stromaklone und umgekehrt heranwachsen können, wurde in Passage 3 bzw. 4 erneut immunhistochemisch die Expression des Epithelmarkers Cytokeratin und die des Vimentins überprüft.

Alle Stromaklone, die mit Hilfe der Lipofektion etabliert worden waren, zeigten nur Vimentin- aber keine Cytokeratin-Expression (Anhang Abb. 38).

Die durch *in situ*-Elektroporation transfizierten Klone hingegen konnten in zwei Gruppen unterteilt werden (Anhang Abb. 38).

Bei der ersten Gruppe handelte es sich um Epithelzellen. Sie waren sowohl Cytokeratin- als auch Vimentin-positiv. Die Expression des Cytokeratins in den Epithelkulturen war, im Gegensatz zu den Primärkulturen heterogen, d.h., es gab sowohl Cytokeratin-positive als auch –negative Zellen innerhalb eines Zellklones.

Die zweite Gruppe exprimierte nur Vimentin, aber nicht Cytokeratin. Da die *in situ*-Elektroporation nur für die Transfektion primäre Epithelkultur eingesetzt wurde, immunhistochemisch aber kein Cytokeratin nachgewiesen werden konnte (s. auch Analyse der Cytokeratin-Expression, 4.4.2), konnte ohne zusätzliche Analysen keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob es sich um Epithel- oder Stromazellen handelte. Mit dieser Gruppe an Zelllinien wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde die Expression des transfizierten Gens überprüft. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus den Zellen der Stroma- bzw. Epithelzelllinien isoliert und eine RT-PCR durchgeführt (4.3.7).

Alle Epithel- und Stromazelllinie, deren Ausgangszelle mit dem Vektor pMSSVLT transfiziert worden war, exprimierten SV40 largeT (Anhang Abb. 38).

Nur eine Stromazelllinie aus dem Endometrium einer Endometriose-Patientin sowie 4 Stromazelllinien aus Endometrien von nicht an Endometriose erkrankten Frauen exprimierten E1A. E1B konnte in zwei E1A-positiven Klonen schwach detektiert werden.

Es konnten keine E1A bzw. E1A und E1B exprimierenden Epithelzelllinien etabliert werden. Die Zellen starben entweder schon vor oder spätestens nach Passage 2 in der 24-well-Platte ab.

4.3.7 Stabilität der transfizierten Gene und Eintritt in die replikative Seneszenz

Um zu überprüfen, ob die Zelllinien die transfizierten viralen Gene stabil exprimieren, wurde die Expression von SV40LT, E1A und E1B nicht nur zu Beginn der

Langzeitkultivierung sondern auch in späten Passagen der Zelllinien überprüft (Abb. 21-23). SV40LT wird in allen charakterisierten epithelialen (Abb. 22) und stromalen Zelllinien (Abb. 21) stabil exprimiert. Auch kurz vor Eintritt in die replikative Seneszenz ist das Transkript des SV40LT-Gens mit Hilfe der RT-PCR nachweisbar (Tab. 13).

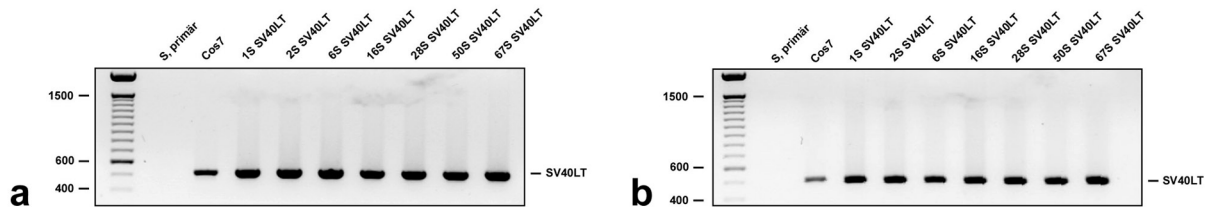


Abb. 21: Expression von SV40LT in endometrialen Stromazelllinien

Die Expression des SV40 „large T“-Antigens in den endometrialen Stromazelllinien wurde mittels RT-PCR zu Beginn der Langzeitkultivierung (a) und in einer späten Passage (b) analysiert (Tab. 13). Als Positiv-Kontrolle dienten COS7-Zellen, die SV40LT exprimieren. Als Negativ-Kontrolle fungierte eine primäre Stromakultur.

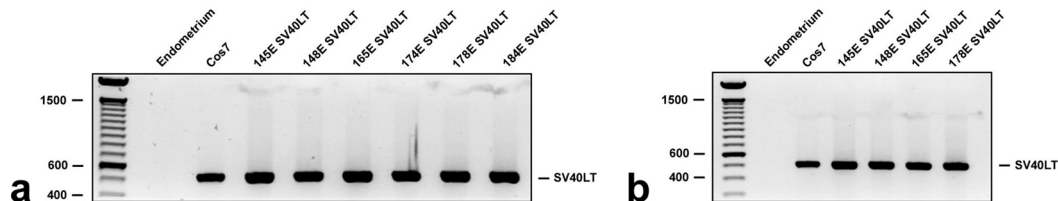


Abb. 22: Expression von SV40LT in endometrialen Epithelzelllinien

Die Expression des SV40 „large T“-Antigens in den endometrialen Epithelzelllinien wurde mittels RT-PCR zu Beginn der Langzeitkultivierung (a) und in einer späten Passage (b) untersucht (Tab. 13). Als Positiv-Kontrolle fungierten COS7-Zellen, die SV40LT exprimieren. Als Negativ-Kontrolle wurde RNA des humanen Endometriums in die RT-PCR eingesetzt.

Die Transfektion mit E1A ist nicht so stabil. Der Expressionsstärke nimmt im Verlauf der Kultivierung ab (Abb. 23a,b). Die Zellklone 34S E1A und 55S E1A zeigen in den Passagen 27 bzw. 25 nur noch eine schwache E1A-Expression (Abb. 23b). Bei Zelllinie 12S E1A, die bereits in Passage 7 nur eine schwache E1A-Expression zeigte, ist das Transkript in Passage 29 nicht mehr nachweisbar (Abb. 23b). E1B, das in Passage 7 durch RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Abb. 23c), wird bereits in Passage 8 nicht mehr exprimiert (nicht dargestellt).

Die primären Stromakulturen ließen sich durchschnittlich 11-mal passagieren, bevor, die Zellen ihre Teilungsaktivität einstellten. Die maximale Passagenzahl der SV40LT-positiven stromalen Zelllinien variierte zwischen 20 und 39, unabhängig davon ob das Ausgangsgewebe von einer Frau mit oder ohne Endometriose stammte (Tab. 13).

Die E1A-positiven Zelllinien traten erst zwischen Passage 29 und 39 in die replikative Seneszenz ein (Tab. 13).

Durch die stabile Transfektion primärer Stromazellen ist es gelungen, die Kultivierungsdauer mindestens zu verdoppeln, im Optimalfall zu vervierfachen (Tab. 13).

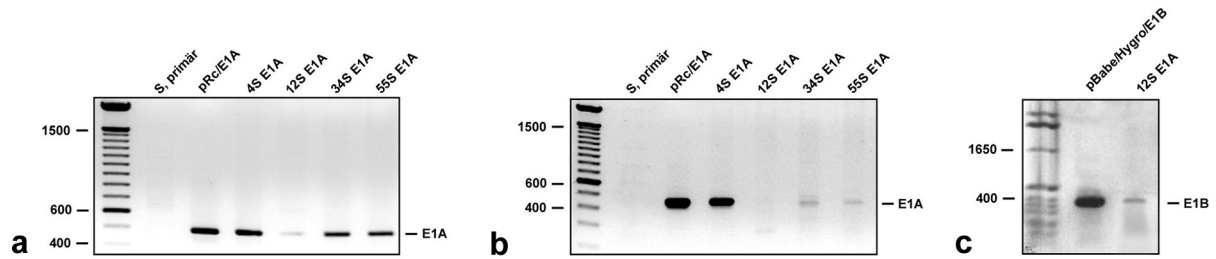


Abb. 23: Expression von E1A und E1B in endometrialen Stromazelllinien

Die Expression von E1A in endometrialen Stromazelllinien (a,b) und E1B im Falle des Klons 12S E1A (c) wurde mittels RT-PCR zu Beginn der Langzeitkultivierung (a) und in einer späten Passage (b) analysiert (Tab. 13). Als Positiv-Kontrolle wurde der transfizierte Expressionsvektor pRC/E1A bzw. pBabe/Hygro/E1B in die PCR eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle fungierte eine primäre Stromakultur.

Die epithelialen Primärkulturen stellen bereits vor der ersten Subkultivierung ihre Teilungsaktivität ein (4.3.3). Durch die stabile Expression des SV40LT konnten die Epithelzellen je nach Zelllinie zwischen 15- und 25-mal passagiert werden, bevor die epithelialen Zellen in die replikative Seneszenz eintraten (Tab. 13).

Tab. 13: Analyse der Expression der transfizierten Gene SV40LT, E1A und E1A mit E1B mittels RT-PCR in frühen und späten Passagen[#] der Zelllinien; Zeitpunkt des Eintritts der Zelllinien in die replikative Seneszenz

Zelllinie	Nachweis der Expression des transfizierten Gens		Eintritt in die replikative Seneszenz
1S SV40LT	P7	P16	P20
2S SV40LT	P8	P28	P30
6S SV40LT	P10	P21	P21
16S SV40LT	P6	P23	P25
28S SV40LT	P9	P18	P21
50S SV40LT	P8	P26	P32
67S SV40LT	P8	P23	P39
4S E1A	P10	P17	(P37) ¹
34S E1A	P6	P27	P39
55S E1A	P7	P25	P31
12S E1A//E1B	P7//P7	P28//P8 -	P29
145E SV40LT	P5	P23	P24
148E SV40LT	P7	P22	P22
165E SV40LT	P4	P14	P15
174E SV40LT	P5	n.d.	n.d.*
178E SV40LT	P7	P24	P25
184E SV40LT	P5	n.d.	n.d.*

* wegen Kontamination verworfen

[#] eine Passage entspricht etwa 2 Populationsverdoppelungen

¹ bei Abschluß dieser Arbeit weiterhin teilungsaktiv

Alle Zellen, unabhängig vom Zelltyp und dem transfizierten Gen, wiesen nach Einstellung der Proliferationsaktivität die gleichen morphologischen Veränderungen auf. Das Kern-Cytoplasma-Verhältnis nahm zu. In den meisten Zellen konnten 2 bis 4 Zellkerne beobachtet werden. Die Zellen hatten eine flächige, unförmige Gestalt.

Obwohl alle Zelllinien bis zu 8 Wochen nach dem Eintritt in die replikative Seneszenz weiter kultiviert wurden, konnte bei keiner der Zelllinien die Wiederaufnahme der Proliferationsaktivität beobachtet werden.

4.4 Charakterisierung endometrialer Epithel- und Stromazelllinien

Die Charakterisierung der Zelllinien und der Vergleich ihrer Eigenschaften mit den Primärkulturen sowie dem Ursprungsgewebe ist essentiell, da nur hierdurch eine Aussage über die Eignung der Zelllinien als Ersatz für die Primärkulturen und als Zellkulturmodell getroffen werden kann. Nur wenn die Eigenschaften der Zelllinien nicht auffallend von den der Primärkulturen und dem Ursprungsgewebe abweichen, kann letztendlich die Wirkung veränderter zell- und molekularbiologischer Parameter auf endometriale Zellen und das Endometrium mit Hilfe der Zelllinien analysiert werden.

Die epithelialen und stromalen Zelllinien wurde daher auf ihre Morphologie, ihre Proliferationsaktivität sowie die Expression verschiedener bereits im Zusammenhang mit der Endometriose analysierter Differenzierungsmarker, insbesondere der des Östrogen- (ER) und Progesteron-Rezeptors (PR), untersucht. Da die Differenzierung des Endometriums durch ovarielle Hormone beeinflusst wird, ist es von entscheidender Bedeutung, ob die Zelllinien ER und PR exprimieren und somit hormonell ansprechbar sind.

Die Eigenschaften der epithelialen und stromalen Zelllinien wurden mit den der epithelialen und stromalen Primärkulturen und dem Endometrium verglichen.

4.4.1 Analyse der Cytokeratin-Expression epithelialer Zelllinien

Bei der erneuten Überprüfung des Zelltyps in Passage 3 und 4 nach der Transfektion fiel auf, dass alle Epithelzelllinien im Gegensatz zu den epithelialen Primärkulturen, in denen alle Epithelzellen Cytokeratin-positiv sind (Abb. 27b), ein heterogenes Cytokeratin-Expressionsmuster zeigten (Abb. 27c). Die transformierten Epithelzellen scheinen, die Fähigkeit Cytokeratin zu bilden, zu verlieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Cytokeratin-Expression immunhistochemisch über mehrere Passagen hinweg bei allen

SV40LT-positiven Epithelzelllinien untersucht. Durch Auszählen der fluoreszierenden Zellen bzw. der Gesamtzellzahl wurde der prozentuale Anteil Cytokeratin-positiver Zellen ermittelt. Abbildung 24 zeigt am Beispiel von 11 der 21 untersuchten Zelllinien die Veränderung des prozentualen Anteils Cytokeratin-exprimierender Zellen innerhalb von 5 bzw. 6 Passagen.

In allen Fällen nimmt die Anzahl Cytokeratin-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl ab. Bei einigen Zelllinien kann sogar ein nahezu vollständiger Verlust der Expression beobachtet werden (Zelllinien 125E SV40LT, 182E SV40LT).

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden solche Epithelzelllinien ausgewählt, bei denen auch noch in Passage 8 bzw. 9 mindestens 10 % der Zellen Cytokeratin exprimierten.

Hierzu zählten die Linien 145E SV40LT, 148E SV40LT, 165E SV40LT, 174E SV40LT und 178E SV40LT. 184E SV40LT diente als Beispiel für eine Zelllinie, die in Passage 6 mit 3,5 % fast keine Cytokeratin-positiven Zellen mehr aufwies.

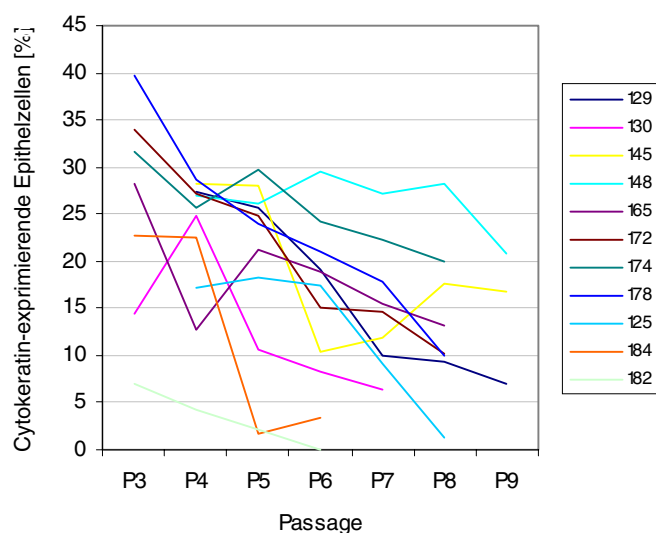


Abb. 24: Cytokeratin-Expression in epithelialen Zelllinien des humanen Endometriums
Zwischen der dritten und neunten Passage reduziert sich der prozentuale Anteil Cytokeratin-positiver Zellen in den verschiedenen SV40LT-exprimierenden epithelialen Zelllinien.

4.4.2 Morphologie primärer Epithelkulturen und epithelialer Zelllinien

Primäre Epithelzellaggregate bilden zu Beginn der Kultivierung vereinzelte kompakte Zellpopulationen aus polygonale Zellen aus (Abb. 27b). Nach vier- bis fünftägiger Kultivierung löst sich diese Struktur auf. Die Zellen lösen sich voneinander (Abb. 29b), zeigen eine flächigere Struktur und das Volumen des Zellkerns nimmt zu. Die Zellen differenzieren und gehen in einen teilungsinaktiven Zustand über.

Abb. 25a und b zeigen rasterelektronenmikroskopische (REM-) Aufnahmen eines konfluenten Epithelmonolayers mit Zellen typischer epithelialer Gestalt. Die Oberfläche der Epithelzellen ist dicht mit Mikrovilli besetzt. An einigen Stellen sind sekretgefüllt Vesikel zu erkennen (Abb. 25b, Pfeil).

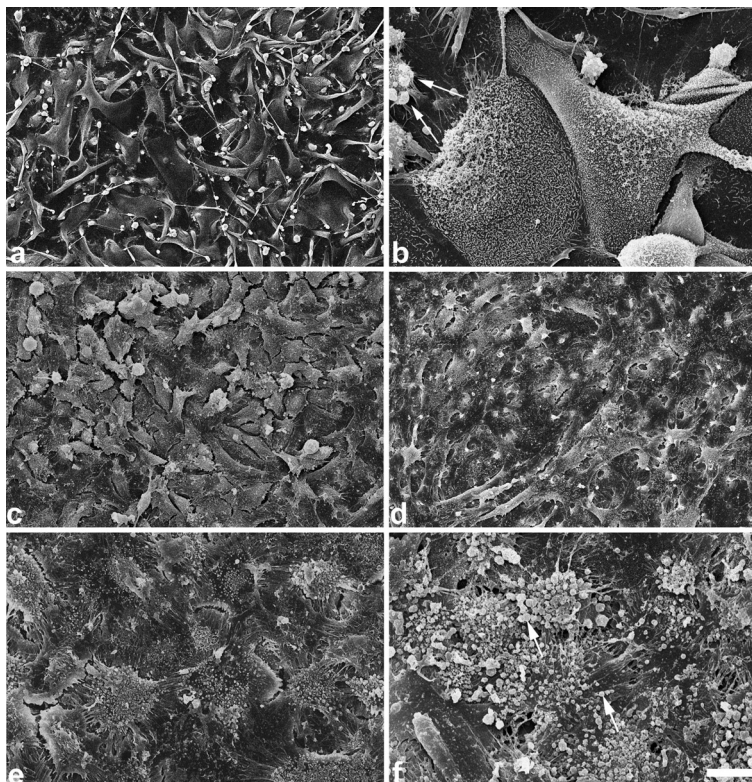


Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von epithelialen Primärkulturen und permanenten Zelllinien des humanen Endometriums

(a,b) Primärkulturen des endometrialen Epithels; (c-f) epitheliale Zelllinien: (c) 184E SV40LT; (d) 148E SV40LT; (e) 178E SV40LT; (f) 174E SV40LT; Balken: (a) 20,5 μm ; (c-e) 42 μm ; (b,f) 9,4 μm ; (b,f) Gekennzeichnet mit einem Pfeil sind die sekretorischen Vesikel auf der Oberfläche der Epithelzellen;

Die SV40LT-exprimierenden epithelialen Zelllinien weisen einen von den Primärzellen abweichende Phänotyp auf (Abb. 25c-f). Die Zellform der einzelnen Linien unterscheiden sich deutlich von der Gestalt der epithelialen Primärzellen. Die plattensteinartige Zellform, die für Plattenepithelien typisch ist, konnte lediglich in einzelnen Arealen von Klon 184E SV40LT (Abb. 25c) und Klon 148E SV40LT beobachtet werden. Die Gestalt der übrigen Zellen der verschiedenen Epithelzelllinien variiert. In 148E SV40LT bilden die Zellen neben plattensteinartigen auch spindel- und sternförmige Strukturen aus (Abb. 25d). In 178E SV40LT überwiegen Zellen mit sternförmiger Gestalt (Abb. 25e,f).

Die Zellen der permanenten Zelllinien sind mit 10 bis 20 μm Breite und 20 bis 80 μm Länge deutlich kleiner als die Primärzellen mit 10-30 μm Breite und 100 bis 180 μm Länge.

Der Mikrovilli-Besatz auf der Zelloberfläche der transformierten Zellen ist reduziert (Abb. 27b,f). Dafür ist eine großen Anzahl sekretorischer Vesikel zu erkennen, die auf eine erhöhte sekretorische Aktivität der Zelllinien im Vergleich zu den Primärzellen hinweist (Abb. 27f, Pfeil). Lediglich 145E SV40LT zeigt, wie die Primärkultur, eine geringe sekretorische

Aktivität (nicht dargestellt). Die Ausbildung von Filopodien zur Kontaktaufnahme und Adhäsion der Zellen untereinander sowie zur Adhäsion an den Untergrund ist bei allen untersuchten Zelllinien stärker ausgeprägt als bei der Primärkultur.

4.4.3 Teilungsaktivität der Epithelzelllinien im Vergleich zur Primärkultur

Zur Analyse der Teilungsaktivität der epithelialen Zelllinien wurden der Proliferationsmarker Ki67 immunhistochemisch markiert.

Die epithelialen Zelllinien zeigen eine deutlich höhere Teilungsaktivität (Abb. 26) als die epithelialen Primärkultur. Bereits einen Tag nach dem Passagieren der Zellen (Tag1) liegt die Proliferationsrate der Zelllinien zwischen 40 und 60 %. 145E SV40LT bildet mit 84 % eine Ausnahme. Im Verlauf der Kultivierung nimmt der Anteil proliferierender Zellen stetig zu und steigt bis Tag 5 auf 80 bis 100 % an.

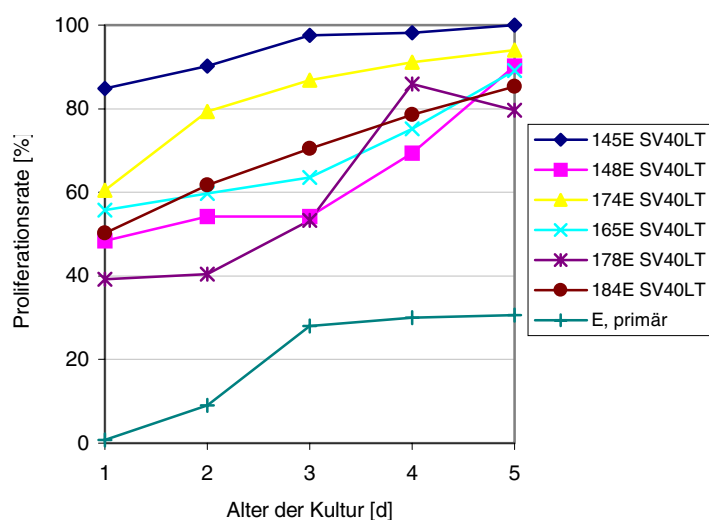


Abb. 26: Proliferationsaktivität endometrialer Epithelzelllinien im Vergleich zur epithelialen Primärkultur

Der prozentuale Anteil teilungsaktiver Zellen in den verschiedenen Zelllinien und der Primärkultur wurde von Tag 1 nach dem Passagieren bzw. nach der Isolierung der Zellen aus dem Endometrium bis Tag 5 ermittelt. Proliferierende Zellen wurden durch die immunhistochemische Markierung des Proliferationsmarkers Ki67 detektiert.

Bei den Primärzellen hingegen sind höchstens 35 bis 40 % der Zellen teilungsaktiv. Zudem gehen die Primärzellen in Abhängigkeit vom Kulturmedium ab Tag 5 bzw. 6 bereits vor dem ersten Passagieren in die replikative Seneszenz über (4.4.3).

4.4.4 Immunhistochemische Untersuchung unterschiedlicher Differenzierungsmarker in Epithelzellen

Zur Analyse der Differenzierung von epithelialen Zelllinien im Vergleich zu epithelialen Primärkulturen und zum Endometrium wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Expression der verschiedenen Antigene in den Zelllinien wurde jeweils in einer frühen Passage sowie einer späten Passage der Kultur analysiert (Anhang Tab. 17). Neben den Intermediärfilamenten, Cytokeratin und Vimentin, erfolgte die Detektion der

Rezeptoren ER, PR und EGF-R, sowie der Adhäsionsmoleküle E-Cadherin, ZO-1 und verschiedener Integrin-Untereinheiten (Anhang Tab. 17, Abb. 27-29).

4.4.4.1 Intermediärfilamente

Wie bereits im Abschnitt „Analyse der Cytokeratin-Expression“ (4.4.1) beschrieben, wird Cytokeratin in genetisch veränderten Epithelzelllinien heterogen exprimiert, wohingegen die Drüsenepithelzellen des Endometriums sowie die primären Epithelzellen zu 100 % Cytokeratin-positiv sind (Abb. 27a,b,c). Der Anteil Cytokeratin-positiver Zellen nimmt bei den Zelllinien von Passagierung zu Passagierung ab. Das intermediäre Filament Vimentin ist in allen Epithelzellen nachweisbar, allerdings ist die Immunreaktion gegen Vimentin in Drüsenepithelzellen und primären Epithelzellen schwächer als in den epithelialen Zelllinien und Stromazellen (Abb. 27d-f, 34 d-f).

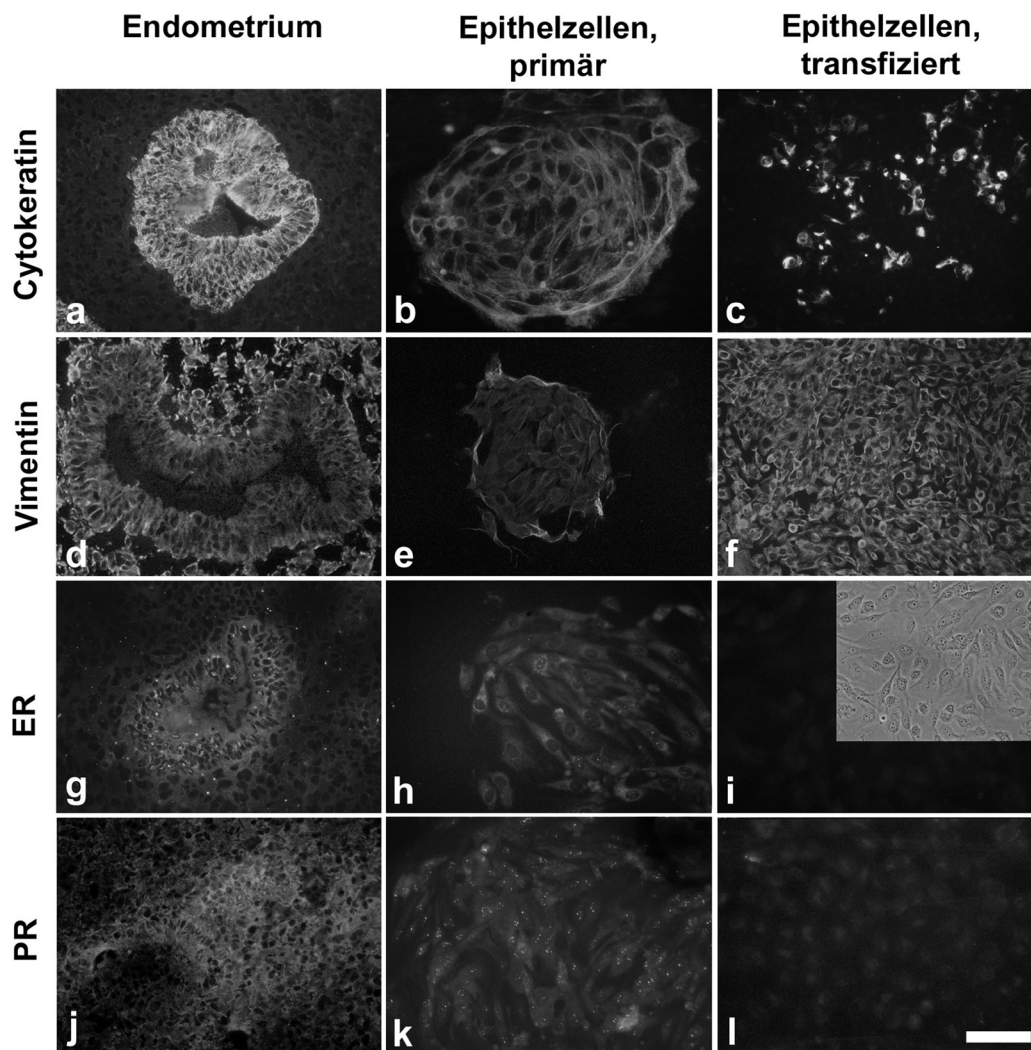


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis der Intermediärfilamente Cytokeratin (a-c) und Vimentin (d-f) sowie der Hormonrezeptoren Östrogen-Rezeptor (ER) (g-i) und Progesteron-Rezeptor (PR) (j-l) im humanen Endometrium und in epithelialen Primärkulturen (Spalten von links nach rechts).

Balken: (a,d,g,j) 180µm; (b,e,h,i,k,l) 150µm; (c, f) 75 µm;

4.4.4.2 Hormonrezeptoren

Der Östrogen-Rezeptor (ER) wird sowohl im Zellkern des endometrialen Drüsenepithel als auch im Zellkern primärer Epithelzellen, wenn auch nur bei einem Teil der Zellen, exprimiert (Abb. 27g,h; Anhang Tab. 17). Die epithelialen Zelllinien hingegen sind ER-negativ (Abb. 27i; Anhang Tab. 17). Der Progesteron-Rezeptor ist im Drüsenepithel sowie den epithelialen Primärkulturen und Zelllinien immunhistochemisch nachweisbar (Abb. 27 j-l; Anhang Tab. 17).

4.4.4.3 Wachstumsfaktoren

EGF ist ein Wachstumsfaktor mit mitogener Wirkung auf Epithelzellen. Sein Rezeptor EGF-R ist sowohl in der basalen Membran des Drüsenepithels des Endometriums als auch in Membranen der primären Epithelzellen nachweisbar (Abb. 28a,b; Anhang Tab. 17). Vier der sechs Zelllinien exprimieren EGF-R nach 6 bzw. 10 Passagierungen (Abb. 28c; Anhang Tab. 17).

4.4.4.4 Zelladhäsion

E-Cadherin spielt eine Rolle bei der Adhäsion benachbarter Epithelzellen, ihrer Polarisierung und Aufrechterhaltung ihres nicht-invasiven Charakters (Behrens et al, 1989; Birchmeier et al., 1991; Behrens, 1993; Frixen et al., 1991). Der Verlust von E-Cadherin führt nicht nur zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit sondern setzt auch Ereignisse in Gang, die zur Transformation von Epithelzellen in migrierende, invasive Fibroblast-ähnliche Zellen führen.

Wie die bereits die immunhistochemischen Analysen eutoper Endometrien gezeigt haben, exprimiert das Drüsenepithel des Endometriums E-Cadherin (Abb. 6a, 28d). Aber auch in den Primärkulturen ist dieses Adhäsionsmolekül detektierbar (Abb. 28e).

Nur bei drei der epithelialen Zelllinien konnte E-Cadherin in der Zellmembran lokalisiert werden (Abb. 28f). Alle übrigen Zelllinien exprimierten kein E-Cadherin. Im Verlauf der weiteren Kultivierung kommt es auch bei den beiden positiven Zelllinien zu einem Verlust des Adhäsionsmoleküls (Anhang Tab. 17).

Ähnliches gilt für ZO-1. ZO-1 ist ein intrazelluläres Protein, lokalisiert in der Zonula occludens. Die Zonula occludens verstärkt den Zusammenhalt der Epithelzellen und dichtet den Interzellulärspalt ab. ZO-1 wird sowohl im *in vivo* Epithel als auch den Primärkulturen exprimiert (Abb. 28g,h). ZO-1 konnte nur in den Zellen von vier der sechs Zelllinien

beobachtet werden (Abb. 28i; Anhang Tab. 17). In späteren Passagen war auch in diesen Zelllinien ZO-1 nicht mehr detektierbar (Anhang Tab. 17).

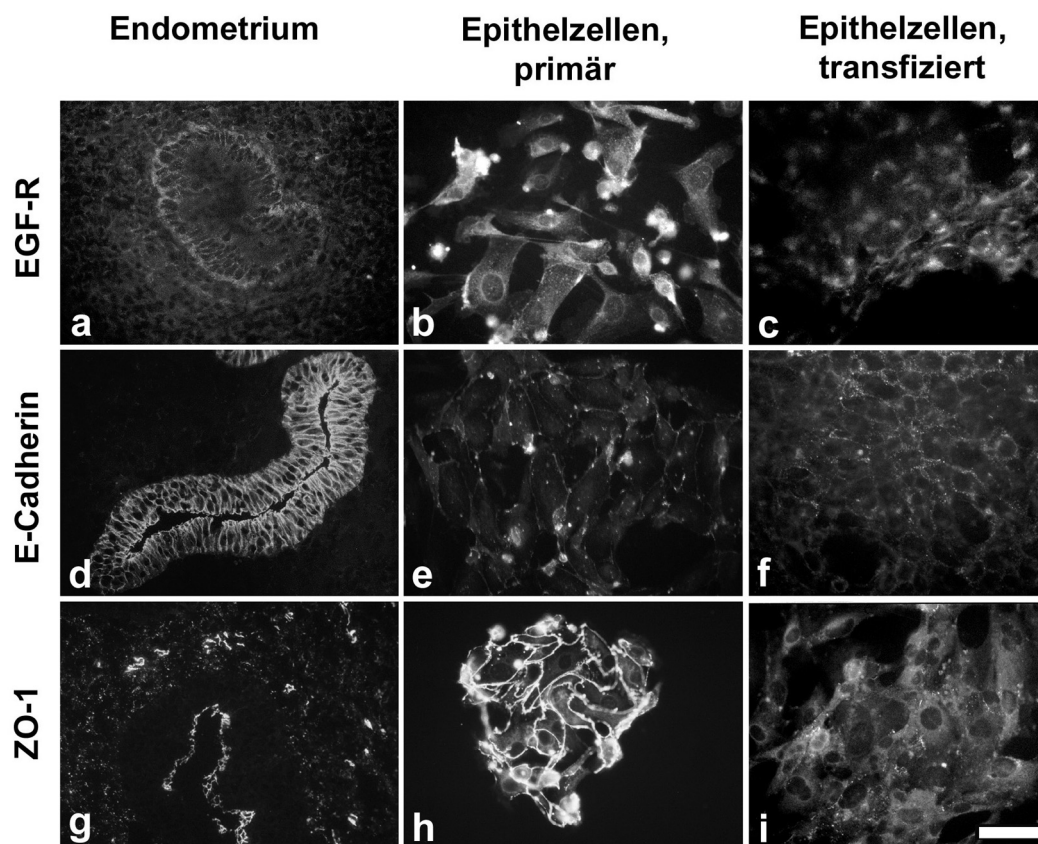


Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis von EGF-R (a-c), E-Cadherin (d-f) und ZO-1 (g-i) im humanen Endometrium, in epithelialen Primärkulturen und epithelialen Zelllinien (Spalten von links nach rechts). Balken: (a,d,g,) 180µm; (b,c,e,f,h,i) 150 µm;

4.4.4.5 Integrine

Integrine sind Adhäsionsmoleküle, die die Kommunikation zwischen Proteinen der extrazellulären Matrix und dem zellulären Cytoskelett vermitteln. Diese Kommunikation ist essentiell für viele zelluläre Prozesse, wie Zelladhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung.

Immunhistochemische Untersuchungen der β -Subfamilie der Integrine zeigten (Anhang Tab. 17), dass das Expressionsmuster der Integrin Untereinheiten β_1 , β_2 , und β_3 in den permanenten Zelllinien (Abb. 29c,f,i) mit dem der Primärkulturen (Abb. 29b,e,h) und der Endometrien nahezu identisch ist (Abb. 29a,d,g). Die β_1 -Untereinheit wird sowohl im endometrialen Drüsenepithel als auch in den Primärkulturen und den permanenten Zelllinien stark exprimiert. Die Immunreaktion gegen die β_2 -Untereinheit im endometrialen Drüsenepithel und den primären Epithelzellen ist schwach, wohingegen in den SV40LT-exprimierenden Zellen eine stärkere β_2 -Expression zu beobachten ist. β_3 -Integrin konnte

weder im Ausgangsgewebe noch in den epithelialen Primärkulturen detektiert werden. Von den epithelialen Zelllinien exprimierten lediglich die Klone 174E SV40LT, 178E SV40LT und 184E SV40LT in einzelnen Zellen diese Integrin- Untereinheit (Anhang Tab. 17).

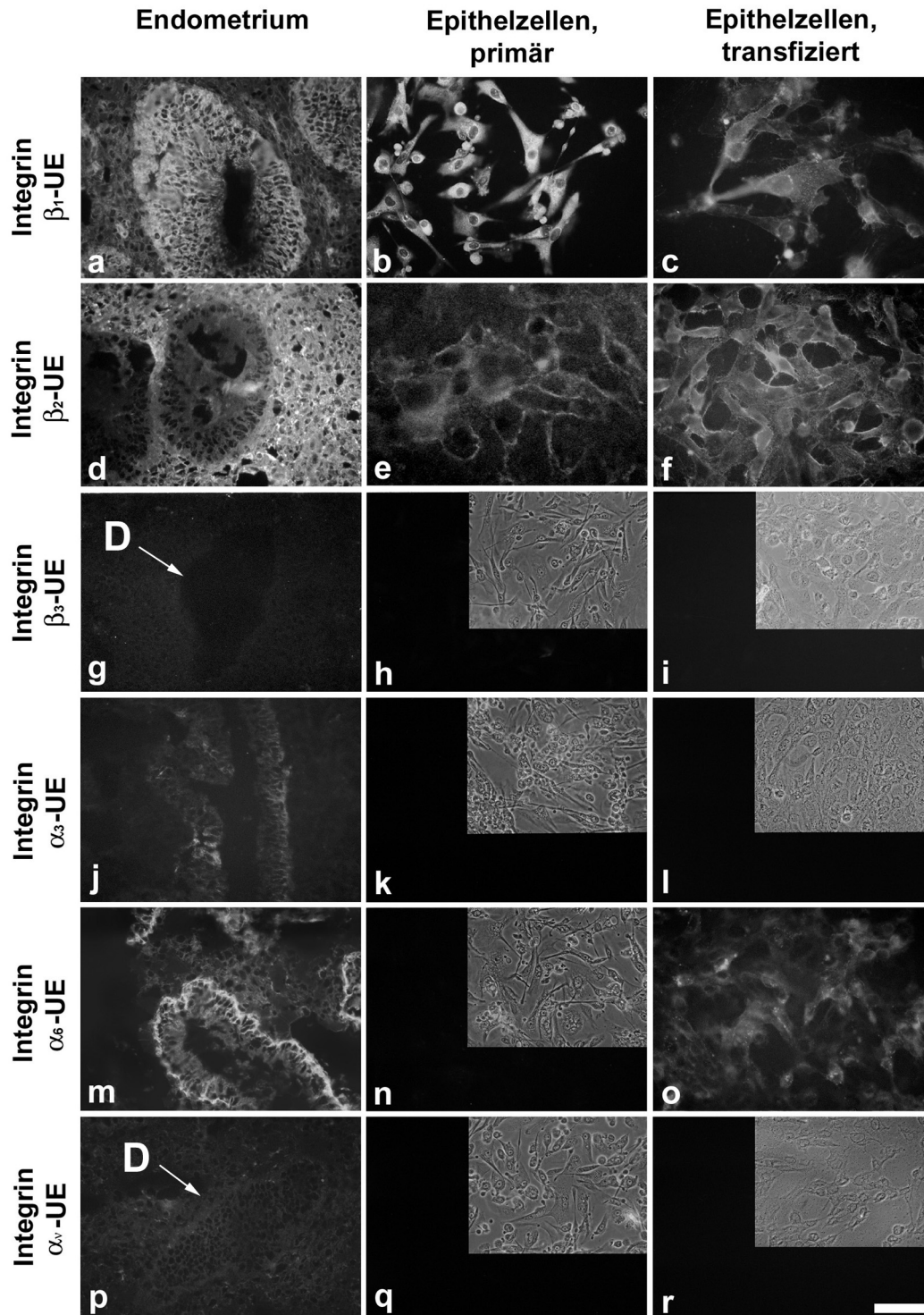


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis der Integrin-Untereinheiten β_1 (a-c), β_2 (d-f) sowie β_3 (g-i) und α_3 (j-l), α_6 (m-o) sowie α_v (p-r) im humanen Endometrium, in epithelialen Primärkulturen und epithelialen Zelllinien (Spalten von links nach rechts).

In Abbildung g und p ist das Drüsenepithel (D) mit einem Pfeil gekennzeichnet. Balken: (a,d,g,j,m,p) 180 μ m; alle übrigen Abbildungen : 150 μ m;

Von der α -Subfamilie wurde die Expression der Untereinheiten α_3 , α_6 und α_v untersucht. Im endometrialen Drüsenepithel ist immunhistochemisch α_3 und α_6 detektierbar (Abb. 29j,m; Anhang Tab. 17), wobei α_3 nur von vereinzelten Zellen sehr schwach exprimiert wird. Eine Immunreaktion gegen die α_3 -Untereinheit konnte nur in einer Primärkultur sowie in zwei permanenten Zelllinien sehr schwach beobachtet werden (Anhang Tab. 17). Die α_6 -Untereinheit wird mit Ausnahme von 148E SV40LT in allen Zelllinien sowie im Drüsenepithel des Endometriums synthetisiert (Abb. 29o; Anhang Tab. 17). Diese Untereinheit war in den Primärkulturen nicht nachweisbar (Abb. 29n; Anhang Tab. 17). Mit Ausnahme von einer untersuchten endometrialen Biopsie und Klon 178E SV40LT in Passage 24, die die α_v -Untereinheit nur schwach exprimierten, waren alle analysierten Gewebs- und Zellproben α_v -negativ (Abb. 29 p-r, Anhang Tab. 17).

Bei diesen Untersuchungen fällt auf, dass sowohl β_3 - als auch α_3 -, α_v -Integrin in den Zelllinien exprimiert werden, die ihren Ursprung in einem Endometrium einer Endometriose-Patientin haben.

Bei allen übrigen immunhistochemisch analysierten Faktoren, sowie in bezug auf die Morphologie und Proliferationsaktivität, waren keine Unterschiede zwischen Zelllinien aus Drüsenepithelien von Frauen mit und ohne Endometriose zu beobachten.

4.4.5 Charakterisierung endometrialer Stromazelllinien

Die Charakterisierung der stromalen Zelllinien wurde insgesamt an 7 SV40LT-positiven Stromakulturen, 3 von Frauen mit und 4 von Patientinnen ohne Endometriose, sowie 4 E1A-positiven Stromazelllinien, drei von nicht betroffenen Frauen und eine von einer Endometriose-Patientin durchgeführt.

4.4.6 Morphologischer Vergleich permanenter Stromazelllinien und primärer Stromakulturen

Primäre Stromazellen besitzen als Bindegewebszellen eine typische Fibroblasten-Morphologie. Die Zellen haben in der Regel eine langgestreckte spindelförmige Gestalt (Abb. a). Mit zunehmender Dichte der Kultur wachsen die Zellen übereinander, und die Morphologie wird heterogener (Abb. 30a,b). Die Zellen zeigen eine flächigere z.T. sternförmige Morphologie. Primäre Stromazellen bilden auf ihrer Zelloberfläche Mikrovilli,

sowie Filopodien und Mikrospines aus, mit denen sie sich am Untergrund und aneinander adhäreren (Abb. 30b, 31b).

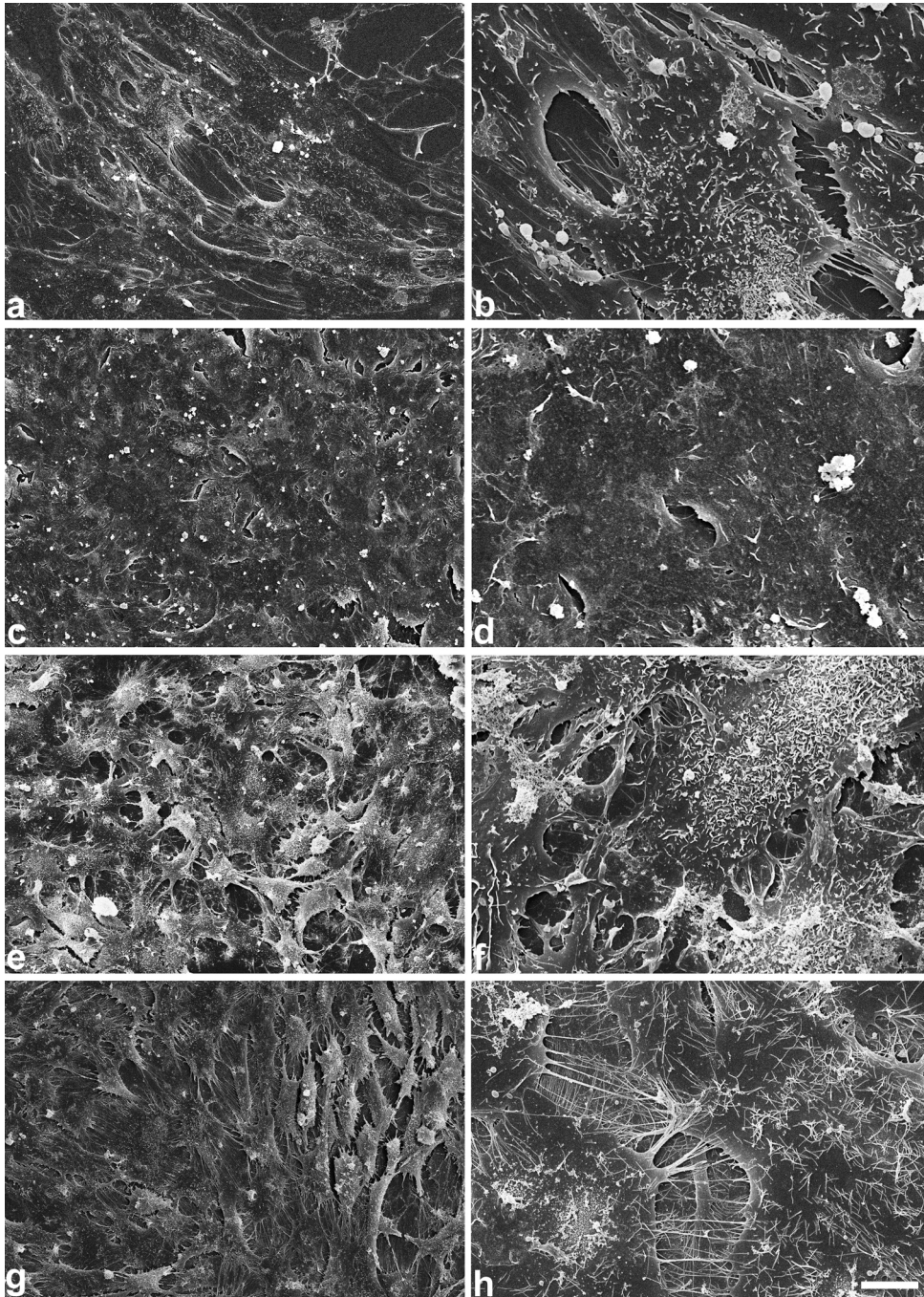


Abb. 30: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von stromalen Primärkulturen und SV40 'largeT' exprimierende Zelllinien des humanen Endometriums
(a,b) Primärkultur des endometrialen Stromas; (c,d) 67S SV40LT; (e,f) 28S SV40LT; (g,h) 1S SV40LT; Balken (a,c,e,g) 44 µm; (b,d,f,h) 9,4 µm;

Die vier SV40LT-positiven Stromazelllinien von Frauen ohne Endometriose lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Bei den Klone 6S SV40LT und 67S SV40LT ist die äußere Form

der Zellen heterogen. Die Zellen besitzen eine flächige unregelmäßige Gestalt. Auf der Zelloberfläche bzw. an den Zellrändern sind wenig Filopodien und Mikrovilli zu erkennen (Abb. 30c,d).

Klon 28 SV40LT und 16S SV40LT ähneln in ihrer Gestalt dicht gewachsener Primärkulturen. Diese Kulturen bestehen aus z.T. langgestreckten, z.T. aber auch sternförmigen Zellen. Ihre Zelloberfläche ist dicht mit Mikrovilli und Filopodien besetzt (Abb. 30e,f).

Die Zellen der drei Zelllinien, die aus primären Stromazellen von Endometriose-Patientinnen etabliert wurden, weisen eine typische langgestreckte Fibroblasten-Gestalt auf (Abb. 30g). Alle drei Klone (1S SV40LT, 2S SV40LT und 50S SV40LT) zeigen einen dichten Besatz mit Mikrovilli und Filopodien (Abb. 30h).

Die E1A- bzw. E1A und E1B-exprimierenden Zelllinien sind in ihrer Morphologie sehr homogen. Die Zellen sind ungleichmäßig geformt, haben eine flächige Gestalt und bilden dichte Zellmonolayer (Abb. 31c). Die Mikrovilli- und Filopodien-Dichte auf der Zelloberfläche ist größer als bei den Primärkulturen (Abb. 31c,d).

Die durchschnittliche Zellgröße der verschiedenen Zellklone im Vergleich zur stromalen Primärkultur ist identisch.

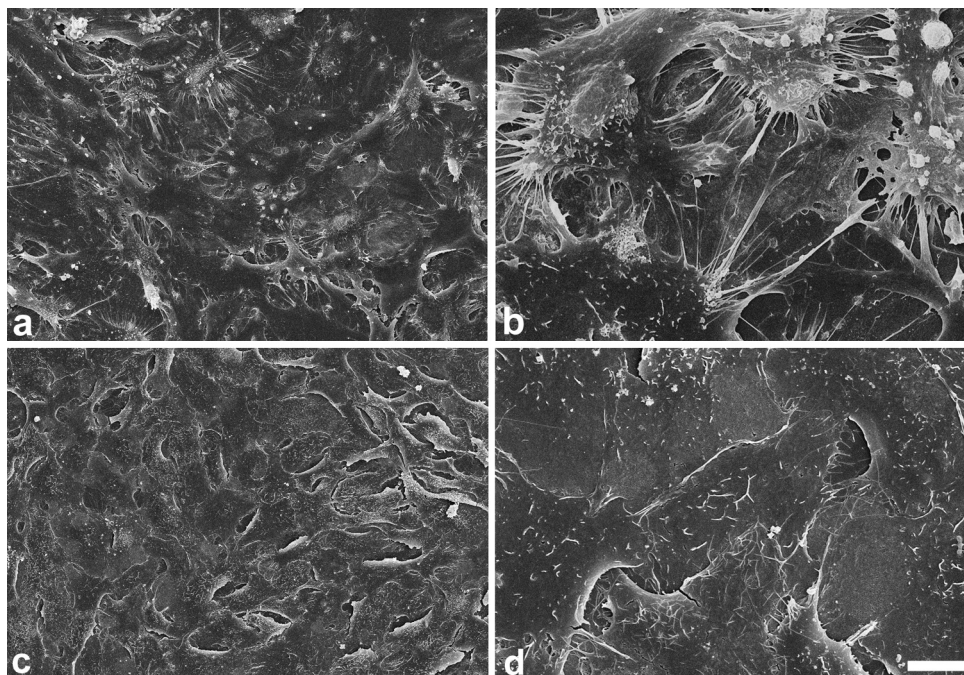


Abb. 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von stromalen Primärkulturen und E1A exprimierende Zelllinien, die des humanen Endometriums (a,b) Primärkultur des endometrialen Stromas; (c,d) 12S E1A; Balken (a,c) 44 µm; (b,d) 9,4 µm;

4.4.7 Proliferationsaktivität der Stromalen Zelllinien

Die Untersuchungen der Proliferationsrate der permanenten Zelllinien sowie einer passagierten Stromalen Primärkultur zeigen, dass zwischen 40-60 % der Zellen einen Tag nach dem Passagieren teilungsaktiv sind und der prozentuale Anteil Ki67-positiver Zellen stetig bis Tag 5 zunimmt (Abb. 32, 33). Lediglich der mit E1A und E1B co-transfizierte Klon 12S E1A benötigt länger zur Adaption an die neuen Kulturbedingungen (Abb. 32b). Hier sind an Tag 1 nach dem Passagieren ein Drittel der Zellen Ki67-positiv. Erst ab Tag 2 steigt der prozentuale Anteil proliferierender Zellen in der Kultur an.

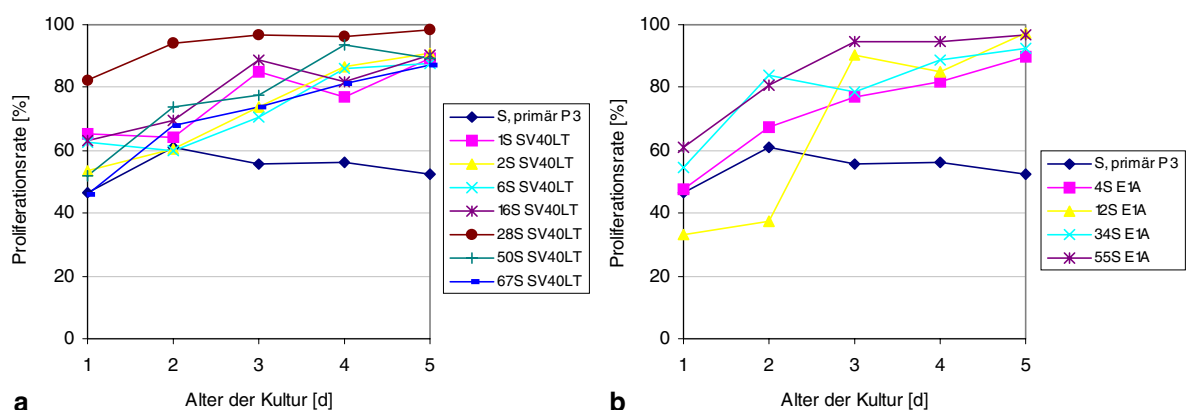


Abb. 32: Proliferationsaktivität permanenter endometrialer Stromazelllinien im Vergleich zur Stromalen Primärkultur: (a) SV40LT exprimierende Zelllinien; (b) E1A exprimierende Zelllinien; Der prozentuale Anteil teilungsaktiver Zellen in den verschiedenen Zelllinien und der Primärkultur wurde von Tag 1 nach dem Passagieren bis Tag 5 ermittelt. Proliferierende Zellen wurden durch die immunohistochemische Markierung des Proliferationsmarkers Ki67 detektiert.

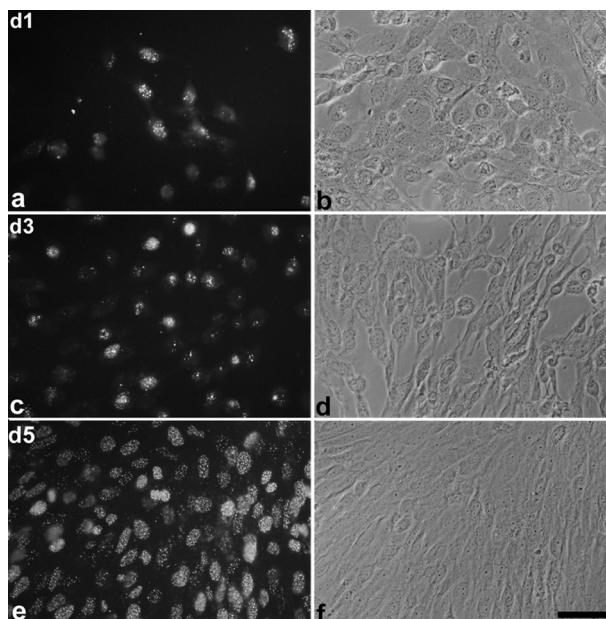


Abb. 33: Immunohistochemischer Nachweis proliferierender endometrialer Stromazellen in Kultur

Stabil transfizierte endometriale Stromazellen wurden 1, 3 und 5 Tage in DMEM / Ham's F-12 mit 10 % FCS und 50 µg Geneticin/ml bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Durch immunohistochemische Markierung des Proliferationsmarkers Ki67 im Zellkern der Zellen erfolgte die Detektion teilungsaktiver Zellen. (a,c,e) Fluoreszenzmarkierung des Proliferationsmarkers Ki67; (b,d,f) Phasenkontrast; Balken: 144 µm;

Bei allen permanenten Zelllinien, unabhängig davon ob sie mit SV40LT (Abb. 32a) oder E1A (Abb. 32b) transformiert wurden, sind am fünften Tag zwischen 87 und 98 % teilungsaktiv. Bei den untransfizierten Stromazellen hingegen pendelt sich der Anteil proliferierender Zellen bei etwa 55 % ein und verbleibt bis Tag 5 auf diesem Niveau (Abb. 32a,b).

4.4.8 Immunhistochemische Untersuchung der Expression verschiedener Differenzierungsmarker in Stromazellen

Um mögliche Veränderungen im Differenzierungsmuster der verschiedenen stromalen Zelllinien im Vergleich zur Primärkultur und zum Endometrium detektieren zu können, wurde die Expression u.a. von Hormonrezeptoren sowie von Integrinen untersucht.

4.4.8.1 Intermediärfilamente

Stromazellen exprimieren unabhängig davon, ob sie sich im Gewebeverband befinden (Abb. 34d), als Primärkultur (Abb. 34e) oder als Zelllinien (Abb. 34f) vorliegen, generell Vimentin aber kein Cytokeratin (Anhang Tab. 18; Abb. 34a-c). Auch Desmin, ein Marker für die Dezidualisierung, konnte weder im Endometrium noch in den Primärkulturen oder Zelllinien immunhistochemisch nachgewiesen werden (Anhang Tab. 18).

4.4.8.2 Hormonrezeptoren

Die Expression des Östrogen-Rezeptors (ER) im endometrialen Stroma ist sehr heterogen. Der Anteil ER-positiver Zellen variiert stark zwischen den verschiedenen Endometrien (Abb. 34g). In 3 der 11 untersuchten stromalen Zelllinien wurde ER in Passage 9 bzw. 10 und bei 3 Klonen in Passage 21 bzw. 22 ER detektiert (Abb. 34i; Anhang Tab. 18). Die beiden Primärkulturen, deren ER-Expression im Rahmen dieser Versuchsreihe immunhistochemisch analysiert wurde, waren beide ER-negativ (Anhang Tab.18).

Der Progesteron-Rezeptor (PR) konnte in einem über das Endometrium willkürlich verteilten Teil der Stromazellen detektiert werden (Abb. 34j; Anhang Tab. 18). Eine Immunreaktion gegen PR war hingegen, in allen untersuchten stromalen Primärkulturen zu beobachten (Abb. 34k; Anhang Tab. 18). Abgesehen von den Klonen 34S E1A und 50S E1A, die in keiner der untersuchten Passagen PR exprimierten, 6S SV40LT und 4S E1A, die im Verlauf der Kultivierung die PR-Expression einstellten, und Zelllinie 67S SV40LT, bei in Passage 21 nicht aber in Passage 8 PR detektiert werden konnte, war der Rezeptor in allen Zelllinien nachweisbar (Abb. 34l; Anhang Tab. 18).

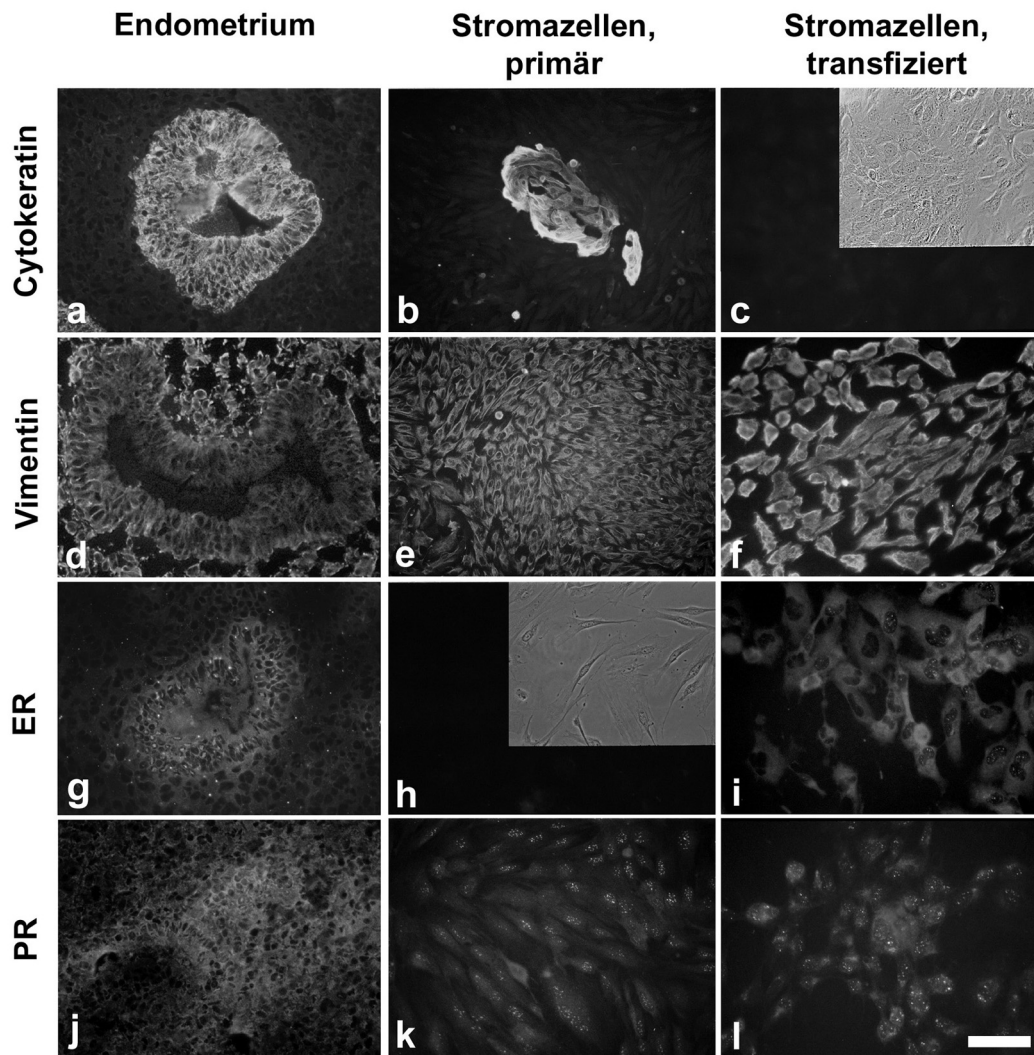


Abb. 34: Immunohistochemischer Nachweis der Intermediärfilamente Cytokeratin (a-c) und Vimentin (d-f) sowie der Hormonrezeptoren Östrogen-Rezeptor (ER) (g-i) und Progesteron-Rezeptor (PR) (j-l) im humanen Endometrium, primären Stromakulturen und Stromazelllinien (Spalten von links nach rechts). In Abbildung d sind Cytokeratin-positive Epithelzellen (E) in einer primären Stromakultur mit einem Pfeil gekennzeichnet. Balken: (a,d,g,j) 180µm; (b,c,f,h,i,k,l) 150µm; (e) 75 µm;

4.4.8.3 Wachstumsfaktoren

EGF-R ist nicht nur auf Epithelzellen beschränkt, sondern ist auch im endometrialen Stroma detektierbar, wie die immunohistochemischen Analysen gezeigt haben (4.1.2; Abb. 5a,d). In einer primären Stromazellkultur konnte eine auf einzelne Areale beschränkte EGF-R-Expression gezeigt werden (Anhang Tab. 18). Nur die Zellklone 67 S SV40LT und 50S E1A exprimieren EGF-R in Passage 8 bzw. 9 und Zelllinie 34S E1A in Passage 22 (nicht dargestellt). Alle anderen Zelllinien sind EGF-R-negativ (Anhang Tab. 18).

Weder ZO-1 noch E-Cadherin, als epithelspezifische Marker, konnten im Stroma des Endometriums noch in den primären Stromakulturen und Stromazelllinien detektiert werden. (Anhang Tab.18).

4.4.8.4 Integrine

Alle analysierten Stromazellen endometrialer Biopsien (Abb. 35a,d), primären Stromakulturen (Abb. 35b,e) sowie stromalen Zelllinien (Abb. 35c,f) exprimieren sowohl β_1 - als auch β_2 -Integrin (Anhang Tab.18). Die Intensität der Immunfluoreszenz bei der Anfärbung des β_1 -Integrin ist allerdings in den Zellkulturen stärker als im Endometrium, in dem diese Untereinheit nur schwach zu detektieren ist.

Die α_6 -Untereinheit war in den primären Stromazellen nicht nachweisbar (Abb. 35n; Anhang Tab. 18). In 8 von 11 Zelllinien, sowie in einem von drei getesteten Endometrien war eine schwache Immunreaktion zu beobachten (Abb. 35m,o; Anhang Tab. 18)

Die α_v -Untereinheit war lediglich in einem endometrialen Kryostatschnitt schwach exprimiert, alle übrigen endometrialen Biopsien und alle analysierten Primärkulturen waren α_v -negativ (Abb. 35p,q; Anhang Tab. 18). Obwohl weder im Endometrium noch in den Primärkulturen die Untereinheit α_v exprimiert wurde, waren die Zelllinien 50S SV40LT, 4S E1A und 55S E1A α_v -positiv (Abb. 35 r; Anhang Tab. 18).

β_3 -Integrin konnten weder im Stroma der Endometrien noch in den Stromakulturen detektiert werden (Abb. 35g-i; Anhang Tab. 18). Lediglich die Zelllinie 2S SV40LT zeigte in Passage 9 eine heterogene Immunreaktion gegen die α_3 -Untereinheit (Anhang Tab. 18). Alle übrigen primären und permanenten Stromakulturen sowie die untersuchten Endometrien waren α_3 -negativ (Abb. 35j-l; Anhang Tab.18).

4.4.9 *In vitro*-Dezidualisierung

Als Reaktion auf die sich implantierende Blastozyste erfolgt die Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen. Auch in Kultur kann die Dezidualisierung der Stromazellen ausgelöst werden. Als Mediatoren fungieren Progesteron, das auch *in vivo* für die Auslösung der Dezidualisierungsreaktion benötigt wird, und cAMP.

Die Fähigkeit zu dezidualisieren, ist ein Charakteristikum für endometriale Stromazellen. Um zu analysieren, ob die stromalen Zelllinien dieses Charakteristikum im Vergleich zur Primärkultur weiterhin besitzen, wurden parallel primäre Stromazellen und jeweils eine SV40LT-positive Zelllinien, etabliert aus Zellen von einer Endometriose-Patientin und einer nicht von der Endometriose betroffenen Frau, mit MPA (Medroxyprogesteronacetat) und 8-Bromo-cAMP behandelt.

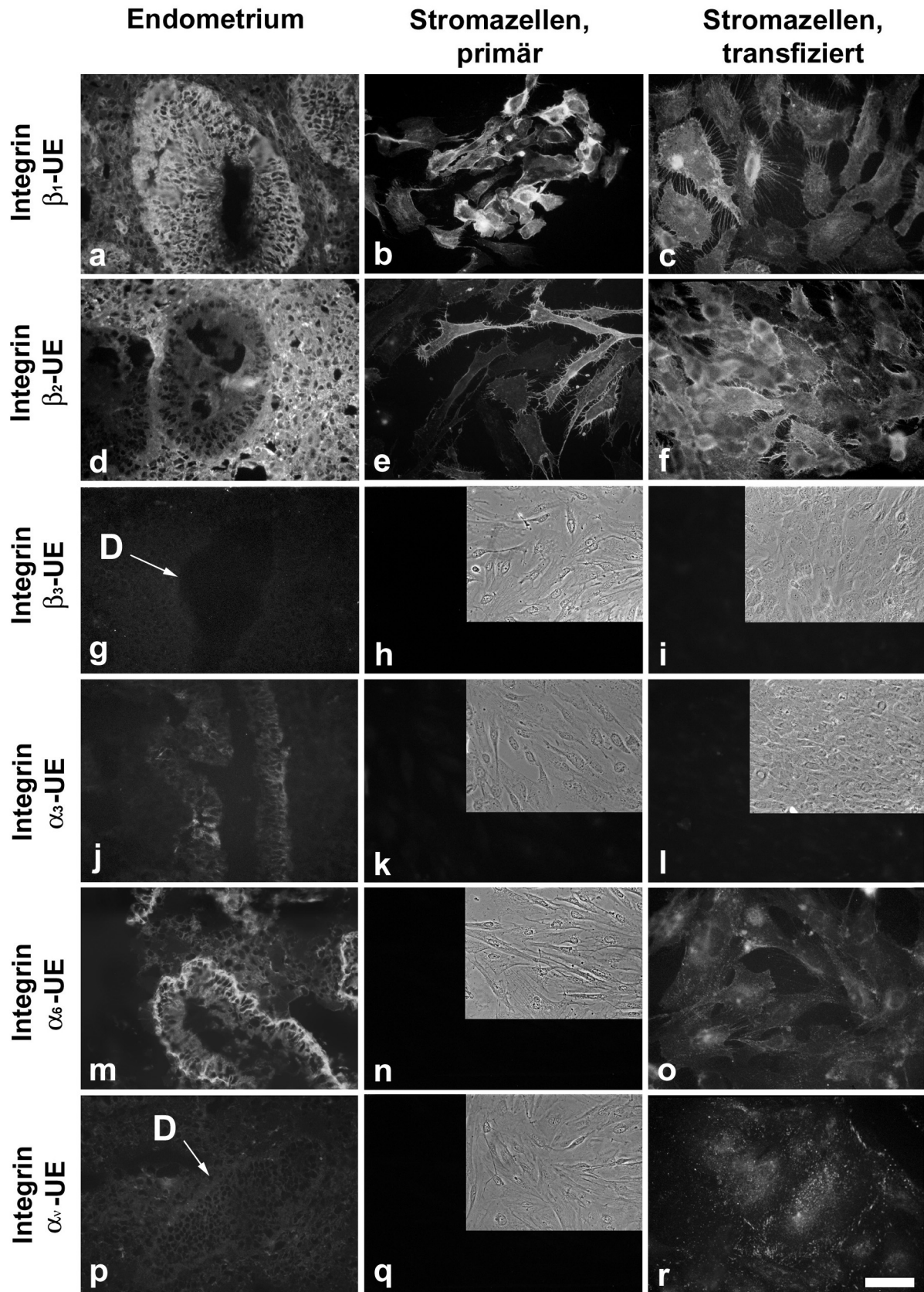


Abb. 35: Immunhistochemischer Nachweis der Integrin-Untereinheiten β_1 (a-c), β_2 (d-f) sowie β_3 (g-i) und α_3 (j-l), α_6 (m-o) sowie α_v (p-r) im humanen Endometrium, primären Stromakulturen und Stromazelllinien (Spalten von links nach rechts).

In Abbildung g und p ist das Drüsenepithel (D) mit einem Pfeil gekennzeichnet. Balken: (a,d,g,j,m,p) 180 μ m; alle übrigen Abbildungen : 150 μ m;

Vor der Durchführung der *in vitro*-Dezidualisierung wurde immunhistochemisch überprüft, ob die Primärkultur und die Zelllinien den Progesteron-Rezeptor exprimieren, und somit in der Lage, sind auf MPA zu reagieren.

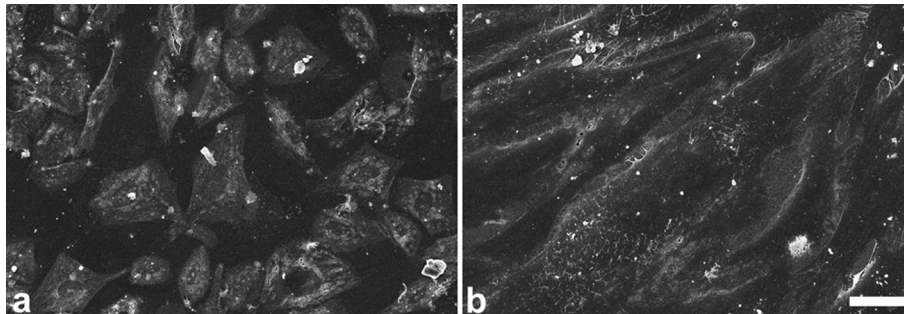


Abb. 36: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von dezidualisierten Stromakulturen
Die *in vitro*-Dezidualisierung primärer Stromazellen und permanenter Zelllinien erfolgte durch die Behandlung mit 1 μ M MPA und 0,5 mM 8-Bromo-cAMP. Nach 8-tägiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert.
(a) Primäre Stromakultur; (b) Zelllinie 1S SV40LT; Balken: (a) 44 μ m; (b) 21 μ m;

Die REM-Aufnahmen (Abb. 36) zeigen, dass es sowohl bei den Primärkulturen als auch bei den Zelllinien zu morphologischen Veränderungen gekommen ist. Statt einer eher spindelförmigen Gestalt der Primärkultur (Abb. 36a) und des Klons 1S SV40LT (Abb. 36b) besitzen die Zellen nach 8-tägiger Behandlung mit MPA und 8-Bromo-cAMP eine polygonale Form. Der Besatz mit Mikrovilli und Pseudopodien ist fast vollständig verschwunden.

Bei der Zelllinie 28S SV40LT wurden tendenziell die gleichen Veränderungen beobachtet (nicht dargestellt).

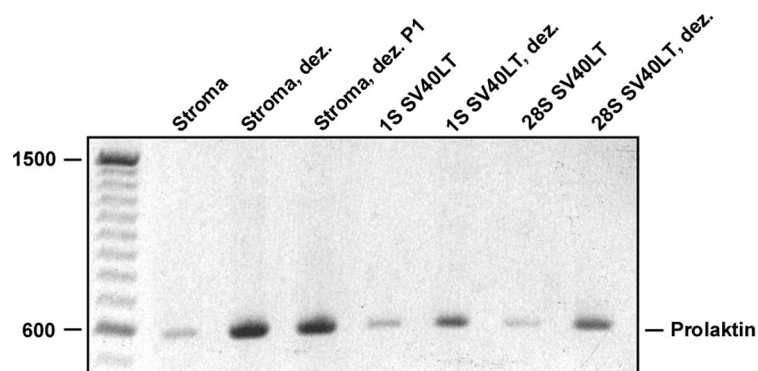


Abb. 37: Prolaktin-Expression in dezidualisierten primären Stromakulturen und Stromazelllinien
Die *in vitro*-Dezidualisierung wurde an einer primären Stromakultur, ihrer 1. Subkultur sowie den Zelllinien 1S SV40LT und 28S SV40LT durchgeführt. Zum Nachweis der Dezidualisierungsreaktion wurde die Expression des Dezidualisierungsmarkers Prolaktin mittels RT-PCR analysiert.

Die mit MPA und 8-Bromo-cAMP behandelten Zellen zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und zum Endometrium einen Anstieg der Prolaktin-Expression (Abb. 37).

Da Primärzellen generell dazu tendieren, in Kultur zu differenzieren, kann dies die Ursache für die Expression von Prolaktin in den unbehandelten Zellen sein.

Die quantitative *in vitro*-Messung von Prolaktin im Kulturüberstand ergab keinen eindeutigen Anstieg der Prolaktin-Konzentration im Verlauf der 8-tägigen Behandlung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Die Prolaktin-Konzentration im Überstand lag vermutlich unter der Nachweisgrenze des verwendeten Testverfahrens.

5 Diskussion

Um die Pathogenese der peritonealen Endometriose zu analysieren, ist im Rahmen dieser Arbeit die Expression verschiedener Differenzierungsmarker in eutopen und ektopen Endometrien verglichen worden. Zusätzlich wurde das Genexpressionsmuster von Frauen mit und ohne Endometriose mit Hilfe der Array-Technologie erfasst. Zudem wurden endometriale Zelllinien etabliert, die die Analyse Endometriose-relevanter Gene erlauben und somit ein Werkzeug für die Charakterisierung der Endometriose und ihrer Pathogenese darstellen.

5.1 Dedifferenzierungen der peritonealen Endometrioseherde im Vergleich zum eutopen Endometrium

Die molekularen Mechanismen, die die Pathogenese der Endometriose beeinflussen, sind bis heute nicht geklärt. Die meisten in der Literatur in Zusammenhang mit der Endometriose beschriebenen Beobachtungen sind in bezug auf die Regulation und Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker widersprüchlich. Ein Teil der widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse ist bereits in der Einleitung dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es sich bei der Endometriose um eine Erkrankung handelt, die durch proliferatives und / oder invasives Wachstum charakterisiert ist. Desweiteren stellte sich die Frage, ob die mit Endometriose einhergehenden Entzündungsreaktionen (Cirkel et al., 1993; Grosskinsky und Halme, 1993) und Gefäßfunktionen mit einer erhöhten Stickstoffmonoxid- und Prostaglandin-Synthese korreliert sind.

Die Proliferationsaktivität endometrialer Epithelzellen ist in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus am höchsten und sinkt im Verlauf der Sekretionsphase. Der Proliferationsindex der Stromazellen bleibt im Verlauf des Zyklus relativ konstant (Jones et al., 1995).

Zur Untersuchung der proliferativen Eigenschaften der Endometrioseherde wurden die Expression von Ki67 analysiert, einem Proliferationsmarker, der, mit Ausnahme der G₀-Phase, in allen Phasen der Mitose exprimiert wird.

Durch den immunhistochemischen Nachweis von Ki67 konnte die Proliferationsaktivität der endometrialen und endometriotischen Zellen ermittelt werden. In unserer Studie konnten keine Unterschiede zwischen der Teilungsaktivität des Drüsenepithels und des Stromas im Endometrium von Frauen ohne und mit Endometriose detektiert werden. Im Gegensatz

hierzu war eine signifikant reduzierte Proliferationsaktivität in den Endometrioseherde zu beobachten. Auch andere Arbeitsgruppen fanden keine signifikanten Unterschiede in der Teilungsaktivität der endometrialen Zellen (Jones et al., 1995; Jürgensen et al., 1996), wohingegen die Proliferationsaktivität in den Endometrioseherden im Vergleich zum eutopen Endometrium signifikant reduziert war (Klein et al., 1992; Jones et al., 1995). Die geringe Proliferationsaktivität der endometriotischen Läsionen ist nicht erstaunlich, in anbetracht der Tatsache, dass die in dieser Studie analysierten Herde, mit im Durchschnitt 1-4 mm Durchmesser, sehr klein waren. Dennoch gibt es auch Studien, die eine starke Teilungsaktivität des endometriotischen Drüsenepithels postulieren (Li et al., 1993; Wingfield et al., 1995).

Die reduzierte Proliferationsaktivität ist korreliert mit einer schwächeren Expression von EGF und EGF-R im Drüsenepithel der ektopen im Vergleich zu den eutopen Endometrien.

Durch die Bindung an seinen Rezeptor beeinflusst EGF das Wachstum und die Differenzierung von Zellen über autokrine und parakrine Mechanismen. Die Expression von EGF und seinem Rezeptor werden während des Menstruationszyklus Östrogen-abhängig reguliert (Bonaccorsi et al., 1989; Troche et al., 1991; Imai et al., 1995; McBean et al., 1997). In Tiermodellen wurde gezeigt, dass Östrogen in der Lage ist, den EGF-R-Level zu steigern (Muccu und Stancel, 1985). Die östrogene Wirkung auf Wachstum und Differenzierung im Genitaltrakt der Maus kann zudem durch EGF ersetzt werden (Nelson et al., 1991).

Die in dieser Studie beobachtete Reduktion des Expressionslevel von EGF-R in Endometrioseherden im Vergleich zu den eutopen Endometrien wird von Huang und Yeh auf mRNA- nicht aber immunhistochemisch auf Proteinebene bestätigt (Huang und Yeh, 1994).

Die östrogene Wirkung auf die Proliferation der Endometrioseherde ist nicht nur gestört durch die zum Teil geringe Östrogenrezeptordichte der endometriotischen Läsionen (Prentice et al., 1992; Bergqvist und Ferno, 1993; Bergqvist, 1995), sondern auch durch die Reduktion des EGF-R-Levels in den Herden. Die östrogene Wirkung kann nicht durch EGF ersetzt werden, da auch die Expression des Wachstumsfaktors in den Herden geringer ist. Alle diese Beobachtungen zusammengefasst erklären die geringe Proliferationsaktivität der Endometrioseherde und die in den meisten Fällen geringe Größe der Läsionen. Die Proliferationsaktivität scheint aber ausreichend zu sein, um die Herde zu erhalten.

Das Zell-Adhäsionsprotein E-Cadherin ist als Tumorsuppressor bekannt (Behrens et al., 1989; Frixen et al., 1991; Vleminckx et al., 1991; Becker et al., 1994; Christofori und Semb, 1999; zur Übersicht: Birchmeier et al., 1995). Es besteht eine Korrelation zwischen dem Verlust der

interzellulären Adhäsion, die durch den Cadherin-Catenin-Komplex vermittelt wird, und dem invasiven Wachstum der betroffenen Zellen und Geweben und deren Metastasierung (zur Übersicht: Birchmeier et al., 1995; Aberle et al., 1996). Die in dieser Arbeit dargestellten immunhistochemischen Analysen haben gezeigt, dass in den endometriotischen Läsionen und tendenziell auch in den Endometrien von Endometriose-Patientinnen, der gesamte Zell-Zell-Adhäsionskomplex, bestehend aus E-Cadherin, α - und β -Catenin, schwächer exprimiert wird. Auch die Studien von van der Linden et al. und Gaetje et al. beschrieben eine reduzierte Immunreaktion gegen E-Cadherin im Drüsenepithel von Endometrioseherden im Vergleich zu eutopen Endometrien (van der Linden et al., 1994; Gaetje et al., 1997). Die E-Cadherin-negativen endometriotischen Zellen zeigen zudem ein ähnliches invasives Potential wie Blasenkarzinom-Zelllinien (Gaejje et al., 1995; 1997; Starzinski-Powitz et al., 1998; 1999). Gegensätzliche Ergebnisse wurden von Beliard et al. publiziert, die keine Unterschiede im Expressionslevel von E-Cadherin in eutopen und ektopen Endometrien fanden (Beliard et al., 1997).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Veränderungen in der Expression oder Struktur einer der Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes zu einem Verlust der Adhäsionsfähigkeit führen.

Mutationen oder das Fehlen der extrazellulären Domäne stören die Zelladhäsion (Kintner, 1992; Fujimori und Takeichi, 1993). Alleine eine Punktmutation in einer Ca^{2+} -Bindungsstelle resultiert in einem funktionslosen Adhäsionsmolekül (Ozawa et al., 1989). Ebenso unterbleibt die Ausbildung von Zellverbindungen, wenn die cytoplasmatische Domäne verändert ist. Cadherine können in diesem Fall nicht mehr mit den Cateninen interagieren (Nagafuchi und Takeichi, 1988; Ozawa et al., 1990b).

Mutationen im Bereich des N-Terminus von α -Catenin unterbinden ebenso die Adhäsion und resultieren in einem Differenzierungsverlust der Zelle, wie die Phosphorylierung des β -Catenins (Behrens et al., 1993; Matsuyoshi et al., 1992; Hamaguchi et al., 1993; Roe et al., 1998; zur Übersicht: Birchmeier und Behrens, 1994).

Die Funktionalität des Cadherin-Catenin-Komplexes ist nicht nur für die Zelladhäsion, sondern auch für die Polarisierung und Differenzierung der Zelle sowie die Embryogenese notwendig (Larue et al., 1994; Riethmacher et al., 1995).

β -Catenin spielt nicht nur eine Rolle für die Zelladhäsion, indem es E-Cadherin über α -Catenin mit dem Aktin-Filamenten des Cytoskeletts verbindet, sondern interagiert auch mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 (,leukaemia enhancer factor-1'). Bei der Bindung von β -

Catenin an LEF-1 ist die Wnt/Wg-Signalkaskade maßgeblich beteiligt. Wnt ist ein Signalprotein, das an einen membranständigen Rezeptor „frizzled“ bindet (Miller und Moon, 1996; Brown und Moon, 1998; Cadigan und Nusse, 1998; Dale, 1998). Dieser aktiviert das Phosphoprotein „dishevelled“ (dsh), das wiederum die Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β) inhibiert (Klingensmith et al., 1994; Theisen et al., 1994; Woodgett, 1994; Cook et al., 1996). Hierdurch unterbleibt die Phosphorylierung von β -Catenin, einem Substrat der GSK-3 β , und die Degradation durch den Ubiquitin-Proteasom-Mechanismus (Aberle et al., 1997). β -Catenin kann nun im Zellkern an den Transkriptionsfaktor LEF-1 binden (Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996; Papkoff et al., 1996; Porfiri et al., 1998). Der β -Catenin/LEF-1-Komplex aktiviert die Transkription verschiedener Gene, die an der Transformation der Zelle vom epithelialen zum mesenchymalen Typ beteiligt sind (Huber et al., 1996; Novak et al., 1998). Zudem fördert bzw. induziert der β -Catenin/LEF-1-Komplex die Cyclin D1-Expression (Shtutman et al., 1999).

Obwohl eine Immunreaktion gegen β -Catenin aus diesen Überlegungen heraus auch im Zellkern des Drüsenepithels zu erwarten gewesen wäre, konnte dieses Protein nur an der Zellmembran lokalisiert werden.

Fasst man die immunhistochemischen Untersuchungen zusammen, dann sind endometriotische Läsionen charakterisiert durch eine reduzierte Proliferationsaktivität und den Verlust bzw. die Reduktion der Zelladhäsionseigenschaften (Scotti et al., 2000). Dennoch können die Beobachtungen nicht generalisiert werden, da die Reduktion des Expressionslevels der drei Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes in den Herden unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Es ist zu vermuten, dass die Dedifferenzierung der peritonealen Endometrioseherde milieuabhängig ist (Koninckx et al., 1998; Starzinski-Powitz et al., 1998). Starzinski-Powitz et al. zeigten, dass die Invasivität der endometriotischen Zelllinien durch Zugabe der Peritonealflüssigkeit zum Kulturmedium gesteigert werden kann. Der Differenzierungszustand der Herde wird vermutlich auch durch den Grad der Neoangiogenese (Grümmer et al., eingereicht; Nisolle et al., 2000), sowie der lokalen Entzündungsreaktion beeinflusst. Die Konzentration des Cytokins IL-6 ist bei Frauen mit Endometriose in der Peritonealflüssigkeit und in den Stromazellen höher als bei Frauen ohne Endometriose (Akoum et al., 1996; Tseng et al., 1996). Desweiteren wurde sowohl eine erhöhte Konzentration der proinflammatorischen Cytokine IL-1 β - und TNF- α als auch von Prostaglandinen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen detektiert (Fakih et al., 1987; Mori et al., 1991; Bergqvist et al., 1997).

Um zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen Entzündungsreaktionen bei Endometriose und der NO- und Prostaglandin-Synthese gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von eNOS, iNOS, COX-1 und -2 in eutopen und ektopen Endometrien immunhistochemisch analysiert. Sowohl NO, das bei der Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin mittels NO-Synthasen entsteht (zur Übersicht: Parkinson, 1997), als auch Prostaglandine, an deren Synthese die Cyclooxygenasen beteiligt sind (Vane et al., 1998), induzieren Entzündungsreaktionen (Salvemini, 1997) und beeinflussen die Gefäßfunktionen (Palmer et al., 1987; Magness, 1991; Silver et al., 1995).

NO spielt im humanen Endometrium vor allem bei der Menstruation (Tseng et al., 1996; Tschugguel et al., 1998) und der Regulation der Gefäßfunktionen (Palmer et al., 1987; Furchgott und Vanhoutten, 1987; Moncada, 1992) eine Rolle. Aber auch an der Implantation, beim Erhalt der Schwangerschaft und dem Auslösen des Geburtsvorganges ist NO als Schlüsselsignal beteiligt (Garfield et al., 1997; Tschugguel et al., 1998b).

Das endotheliale NOS wird im humanen Endometrium zyklusabhängig reguliert. Die eNOS-Expression im Drüsenepithel ist in der mittleren bis späten Sekretionsphase am höchsten, (Tseng et al., 1996; Ota et al., 1998, 1999). eNOS, das an der Zellmembran lokalisiert ist, wird nicht nur im endometrialen Drüsenepithel sondern auch im vaskulären Endothel exprimiert (Bentz et al., 1997).

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie konnte eine durchschnittlich mittlere Immunreaktion gegen eNOS im Endometrium von Frauen ohne und mit Endometriose in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus detektiert werden. Im Vergleich zu den eutopen Endometrien war eNOS in den endometriotischen Läsionen tendenziell schwächer exprimiert. Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Ota et al., deren endometriotische Biopsien während des Zyklus generell eine stärkere Immunreaktion gegen eNOS zeigten als die eutopen Endometrien (Ota et al., 1998).

Die induzierbare Isoform der NO-Synthasen, deren Aktivität durch proinflammatorische Cytokine induziert wird, konnte in der Proliferationsphase nur in 10 % der eutopen Endometrien von Frauen ohne bzw. 25 % der Frauen mit Endometriose detektiert werden. Der geringe prozentuale Anteil iNOS-positiver Endometrien ist durch die Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen erklärbar, die iNOS lediglich in der Sekretionsphase (Tschugguel et al., 1998) bzw. im menstrualen Endometrium (Tseng et al., 1996) im Drüsenepithel detektiert konnten. Im Gegensatz zu den eutopen Endometrien, zeigen aber die Hälfte der untersuchten Endometrioseherde eine Immunreaktion gegen iNOS in der Proliferationsphase. Die generell durch eNOS katalysierte Synthese von NO in den

endometriotischen Läsionen wird durch iNOS gesteigert. Die hierdurch bedingte erhöhte NO-Konzentration in den Endometrioseherden könnte eine Rolle bei der Regulation der Gefäßfunktionen der Endometrioseherde sowie inflammatorischen Prozesse spielen.

Nicht nur NO sondern auch Prostaglandine können Entzündungsreaktionen und die Angiogenese beeinflussen (Huang et al., 1998; Tsujii et al., 1998). Die limitierenden Enzyme der Prostaglandin-Synthese sind die Cyclooxygenasen. Es sind derzeit zwei Isoformen, COX-1 und COX-2, bekannt. COX-1 wird in nahezu allen Zelltypen konstitutiv exprimiert und ist für die Aufrechterhaltung des basalen Prostaglandin-Levels verantwortlich. Die COX-2-Expression hingegen wird durch proinflammatorische Cytokine induziert. Untersuchungen an knock out-Mäusen haben gezeigt, dass COX-2 eine entscheidende Rolle bei der Implantation und Dezidualisierung spielt (Lim et al., 1997). Desweiteren wird eine Überexpression von COX-2 mit der Tumorgenese assoziiert (Copeland et al., 1994).

Die vergleichenden immunhistochemischen Analysen der COX-Expression in eutopen und ektopen Endometrien schließt eine erhöhte Prostaglandin-Synthese in den endometriotischen Läsionen aus. Die konstitutiv exprimierte Cyclooxygenase-Isoform, COX-1, wird in ektopen Endometrien tendenziell etwas schwächer exprimiert als in den eutopen Endometrien. Im Gegensatz zur induzierbaren NO-Synthase, die durch dieselben proinflammatorischen Cytokine wie COX-2 induziert wird, zeigt COX-2 keine wesentlichen Unterschiede im Expressionslevel in den endometrialen und endometriotischen Biopsien.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der Prostaglandin-Synthese in den endometriotischen Läsionen und inflammatorischen Prozessen am Implantationsort gibt.

Eine Aussage über die Rolle der NOS- bzw. COX-Expression bei der Aufrechterhaltung und Entwicklung der Endometriose, ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich. Ob und welche Funktionen NO in den Endometrioseherden hat, könnte z.B. mit Hilfe des Nacktmaus-Modells, das von Grümmer et al. etabliert wurde (Grümmer et al., eingereicht), analysiert werden.

5.2 Vergleichende Analyse der endometrialen Genexpression

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Ursache für die Entstehung der Endometriose und mit ihr einhergehenden Symptomen im Ausgangsgewebe, dem eutopen Endometrium, zu suchen sind. Die retrograde Menstruation ist ein physiologisches Phänomen (Blumenkrantz et al., 1981; Halme et al., 1984; Liu und Hitchcock, 1986) und dennoch haben lediglich etwa 10 % aller Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter Endometriose. Auch das gehäufte

Auftreten von Endometriose bei Verwandten ersten Grades und in Zusammenhang mit Infertilität bestärken diese Theorie.

Desweiteren wurden Veränderung im endometrialen Expressionsmuster bei Endometriose-Patientinnen aufgezeigt, die zur Klärung der Ursache verschiedener Symptome der Endometriose beitragen können. Beispiele hierfür sind die veränderte Expression des Transkriptionsfaktors HOXA10 und Aromatase P450 (P450arom).

Untersuchungen von homozygoten Hoxa10 knock out-Mäusen zeigten, dass die Hoxa10-Expression essentiell für die Fertilität ist. Obwohl die Ovulation und die Entwicklung von der Eizelle zur Blastozyste bei den knock out-Mäuse normal verläuft, ist die Blastozyste nicht in der Lage, zu implantieren (Satokata et al. 1995). Es wird vermutet, dass das HOXA10-Gen beim Menschen eine ähnliche Rolle spielt wie in der Maus. HOXA10 wird in der Implantationsphase des humanen Endometriums hormonabhängig hochreguliert (Taylor et al., 1998). Im Gegensatz zu den Kontroll-Patientinnen wird bei Endometriose-Patientinnen das HOXA10-Gen während der mittleren Sekretionsphase nicht hochreguliert (Gui et al., 1999; Taylor, 1999). Dies führt zu einer veränderten Differenzierung des Endometriums und könnte eine Ursache für die Infertilität bei Endometriose-Patientinnen sein.

Die Aromatase P450 katalysiert die Bildung von Östrogen aus C₁₉-Steroiden. P450arom wird in den unterschiedlichsten Geweben exprimiert, z.B. in den Granulosazellen des Ovars (Mc Natty et al., 1984), im Syncytiotrophoblast der Plazenta (Ryan, 1959) und im Gehirn (Price et al., 1992). Lediglich im Endometrium und Myometrium wird dieses Enzym nicht transkribiert (Bulun et al., 1993). In Endometrioseherden und eutopen Endometrien von Endometriose-Patientinnen hingegen konnte das Transkript der Aromatase P450 mittels RT-PCR detektiert werden (Noble et al., 1996). Diese Beobachtungen weisen auf eine veränderte Östrogen-Produktion bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu Kontroll-Patientinnen hin (Nobel et al., 1996).

5.2.1 Unterschiede im endometrialen Expressionsmuster von Frauen mit und ohne Endometriose

Um zu analysieren, ob die Endometrien von Endometriose-Patientinnen genetisch bedingte Veränderungen im Differenzierungsablauf während des Menstruationszyklus aufweisen, wurde das endometriale Expressionsmuster von Frauen ohne und mit Endometriose mit Hilfe der Microarray-Technologie erfasst.

21 von 208 detektierten Transkripten unterschieden sich signifikant in ihrem relativen Expressionslevel im Endometrium von Frauen ohne und mit Endometriose. 7 der 21 Faktoren

waren aufgrund ihrer Funktionen für die Differenzierung des Endometriums und / oder für die Entstehung und Entwicklung von Endometrioseherden von besonderer Bedeutung.

Zu diesen Faktoren gehörten EAR-2, HSP27 und IGFII, die alle drei in den endometrialen Biopsien von Frauen mit Endometriose signifikant herunterreguliert waren, sowie VEGF-R1, ICAM-1, RANTES und β_1 -Integrin, die in den Endometrien von Endometriose-Patientinnen signifikant stärker exprimiert wurden.

EAR-2, ein Mitglied der Steroidrezeptor-Superfamilie, weist hohe strukturelle Homologien zur DNA-Bindungsregion des Östrogenrezeptors auf.

EAR-2 supprimiert die Östrogen-stimulierte Transkription des Oxytocin-Gens im humanen und Ratten-Endometrium durch die Bindung an HRE („hormone response element“) im Promotor des Oxytocin-Gens. Oxytocin reguliert die myometriale Kontraktion und wird zum Auslösen von Wehen eingesetzt. Durch die Bindung von EAR-2 an HRE, ist ERE („estrogen response element“) blockiert. Die Transkription des Gens kann nicht mehr durch Östrogen induziert werden (Richard und Zingg, 1990; Chu und Zingg, 1997; Chu et al., 1998). Aber nicht nur die Expression von Oxytocin sondern auch die des humanen LHRs („lutening hormone receptor“) wird durch EAR-2 und andere Orphan-Rezeptoren inhibiert (Zhang und Dufau, 2000).

Die Herunterregulation von EAR-2 im Endometrium von Endometriose-Patientinnen führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Östrogen und EAR-2, was wiederum in einer Veränderung des endometrialen Expressionsmusters resultieren kann.

IGFII spielt bei der Differenzierung und Proliferation des Endometriums eine Rolle (Rutanem, 1998). Die Expression erreicht im Verlauf der Sekretionsphase ihr Maximum (Giudice et al., 1993; Zhou, 1994; Sbracia et al., 1997). Verschiedene Studien beschreiben zudem eine Erhöhung des IGFII-Levels während der Menstruation bzw. in der frühen Sekretionsphase (Boehm et al., 1990; Roy et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass IGFII eine Rolle bei der Regeneration des Endometriums spielt (Roy et al., 1999). Desweiteren sind sowohl IGFII als auch IGFI an der Regulation der Implantation und Embryonalentwicklung beteiligt (Ko et al., 1994). IGFII ist im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose schwächer exprimiert als bei Patientinnen, die nicht von dieser Erkrankung betroffen sind (Sbracia et al., 1997). Chang und Ho konnten IGFII in eutopen und ektopen Endometrien von Endometriose-Patientinnen nur sehr schwach detektieren (Chang und Ho, 1997). Sbracia et al. konnten IGFII in Endometrioseherden immunhistochemisch nicht nachweisen (Sbracia et al., 1997). Diese Studien bestätigen die mittels cDNA Array beobachtete Abnahme der

IGFII-Transkription in eutopen Endometrien von Frauen mit Endometriose. Der geringere Expressionslevel von IGFII bei Endometriose-Patientinnen könnte eine Ursache für die erhöhte Infertilitätsrate dieser Frauen sein.

Der Vergleich des IGFII-Levels in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit und ohne Endometriose ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede (Kim et al., 2000).

Neben dem Schutz des Endometriums vor schädlichen Einflüssen, wie Überhitzung, Sauerstoffradikalen und Denaturierung von Proteinen (Neuer et al., 2000), hemmt das ‚heat shock protein‘ HSP27 die cytotoxische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ insbesondere während der Implantationsphase (Tabibzadeh und Broome, 1999). $\text{TNF}\alpha$ hemmt die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen und supprimiert die Prolaktin-Expression (Inoue et al., 1994). *In vitro*-Studien zeigten, dass die Expression von HSP27 im endometrialen Drüsenepithel durch Östradiol gesteigert und durch Progesteron gehemmt werden kann (Padwick et al., 1994). Der HSP27-Level erreicht in der späten Proliferationsphase und frühen Sekretionsphase, insbesondere nach der Ovulation, seinen Höhepunkt. Im Verlauf der Sekretionsphase nimmt der Expressionslevel wieder ab (Tabibzadeh et al., 1996; Tabibzadeh und Broome, 1999). Der Vergleich der endometrialen Expression von HSP27 bei Frauen ohne und mit Endometriose zeigte, dass HSP27 in den Endometrien von Endometriose-Patientinnen herunterreguliert wird. Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Ota et al. (Ota et al., 1997). Sie detektierten eine stärkere Immunreaktion gegen HSP27 in eutopen Endometrien von Frauen mit Endometriose.

Zu den hochregulierten Genen gehören u.a. RANTES und ICAM-1, Faktoren, die an der Immunreaktion beteiligt sind.

ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das die Interaktion endometrialer Stromazellen mit lymphoiden Zellen vermittelt und die Leukozyten-Migration im Endometrium reguliert (Thomson et al., 1999). Dieses Adhäsionsmolekül wird nicht nur in den endometrialen Stromazellen sondern auch im Drüsenepithel und vaskulären Endothel während des Menstruationszyklus exprimiert. Die Expression im Stroma wird im menstrualen Gewebe hochreguliert (Thomson et al., 1999). ICAM-1 wird durch zahlreiche inflammatorische Cytokine induziert, z.B. durch $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{IL}1\beta$ (Simmons, 1995; Sterner-Kock, 1996; Vigano et al., 1998; Thomson et al., 1999). Eine weitere für die Entstehung der Endometriose entscheidende Eigenschaft von ICAM-1 ist die Hemmung der cytotoxischen Wirkung von NK-Zellen („natural killer cells“). Es wird vermutet, dass ICAM-1 die Lysis der retrograd in die Bauchhöhle transportierten endometrialen Gewebefragmente durch NK-Zellen hemmt.

Dies ermöglicht es den endometrialen Fragmenten, der Immunabwehr zu entgehen und zu Endometrioseherden heranzuwachsen (Vigano et al., 1994; Somigliana et al., 1996). Bestätigt wird diese Theorie durch die Beobachtungen, dass der Level des ungebundenen ICAM-1 (sICAM-1) in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen erhöht ist (Fukaya et al., 1999) und dass die Expression von ICAM-1 und sICAM-1 sowie die Sekretion der ungebundenen Form bei kultivierten endometrialen Stromazellen von Endometriose-Patientinnen höher ist als bei Stromazellen der Kontrollgruppe (Somigliana et al., 1996;). Desweiteren wird ICAM-1 und sICAM-1 in Endometrioseherden stärker transkribiert als in eutopen Endometrien von Endometriose-Patientinnen (Vigano et al., 1998).

RANTES ist ein Cytokin mit chemotaktischer Wirkung auf Eosinophile und Leukozyten (Arima et al., 2000; Blumenthal et al., 2000). Seine Expression wird durch verschiedene inflammatorische Cytokine induziert, wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ (Hornung et al., 1997; Altman et al., 1999; Blumenthal et al., 2000). Nachgewiesen werden konnte RANTES sowohl in der Peritonealflüssigkeit als auch im endometrialen Epithel und Stroma (Altman et al., 1999; Blumenthal et al., 2000). Der RANTES-Level ist bei Endometriose-Patientinnen in der Peritonealflüssigkeit, sowie dem endometrialen Stroma höher als bei Frauen ohne Endometriose (Blumenthal et al., 2000), was den Ergebnissen der cDNA-Expressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit entspricht.

Es besteht zudem eine positive Korrelation zwischen der RANTES-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit und dem Schweregrad der Endometriose (Khorram et al., 1993; Hornung et al., 1997). Die RANTES-Konzentration in den Endometrioseherden ist signifikant höher als in eutopen Endometrien. Dies wird vermutlich bedingt durch den direkten Einfluss von proinflammatorischen Cytokinen auf das endometriotische Stroma (Oral et al., 1996; Giudice et al., 1998), die die Hochregulation von RANTES in den Herden bewirken.

Es gibt Hinweise darauf, dass Integrin β_1 , ebenso wie E-Cadherin, entscheidend bei der Adhäsion endometrialer Fragmente an das Peritoneum mitwirkt (van der Linden, 1995). Begünstigt wird dies durch die Hochregulation dieser Untereinheit im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose. Allerdings ergab der immunhistochemische Vergleich der Expression dieser Integrin-Untereinheit in Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose keine signifikanten Unterschiede (Regidor et al., 1998). Zudem spielt Integrin β_1 sowohl bei der Blastozystenimplantation als auch ihrer Differenzierung nach der Implantation eine Rolle (Yoshimura et al., 1995; Shiokawa et al., 1996).

Der letzte Faktor, der laut cDNA-Expressionsanalysen im Endometrium von Frauen mit Endometriose hochreguliert ist, ist VEGF-R1 (flt-1).

Die Angiogenese ist ein grundlegender Mechanismus der endometrialen Differenzierung und der Implantation. Aber auch für die Entwicklung ektooper Endometrien ist die Angiogenese essentiell. Durch die Bindung von VEGF an VEGF-R1 formen die Endothelzellen Tubuli, und die Bildung von tight junctions zwischen den Endothelzellen wird induziert (Fong et al., 1995). VEGFR-1 vermittelt die Wirkung von VEGF auf die Mitogenität, Chemotaxis und Kapillarpermeabilität der Endothelzellen (Meduri et al., 2000). VEGFR-1 ist im Verlauf des gesamten Zyklus nachweisbar. Eine besonders hohe VEGF-R1-Expression konnte immunhistochemisch während der späten Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase sowie in prämenstrualen dilatierten Kapillaren, detektiert werden (Meduri et al., 2000). Die ungebundene Form des VEGF-R1 (sflt-1) wird während der mittleren und späten Proliferationsphase hochreguliert. Der mRNA-Level von VEGF-R1 hingegen ist während des gesamten Zyklus konstant (Krussel et al., 1999).

5.2.2 Validierung der endometrialen Expressionsunterschiede mittels semiquantitative RT-PCR

Zur Validierung der mit Hilfe der cDNA-Expressionsanalysen detektierten Unterschiede im endometrialen Expressionsmuster von Frauen ohne und mit Endometriose wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt.

Obwohl sich der relative Expressionslevel laut cDNA-Expressionsanalysen sowohl von EAR-2, IGFII, HSP27 als auch von ICAM-1, RANTES, VEGF-R1 und Integrin β_1 signifikant in eutopen Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose unterschied, obwohl die Herunterregulation von IGFII sowie die Hochregulation von ICAM-1 und RANTES bereits in der Literatur beschrieben wurde, konnten diese Ergebnisse mittels semiquantitativer RT-PCR nur teilweise verifiziert werden.

Die Expression von RANTES nimmt laut semiquantitativer Analyse tendenziell im Endometrium von Endometriose-Patientinnen ab, was im Widerspruch zu den Ergebnisse des DNA-Arrays steht. Obwohl auch entsprechend der cDNA-Arrays HSP27 herunter- und VEGF-R1 in Endometrien von Endometriose-Patientinnen hochreguliert sein sollte, zeigte die densitometrische Auswertung der RT-PCR eine entgegengesetzte Tendenz.

Lediglich für EAR-2 und IGFII konnte bei 67 % der analysierten Probenpaare tendenzielle eine geringere und für ICAM-1 und Integrin β_1 in 67 bzw. 50 % der Probenpaare eine Zunahme der Expressionsrate beobachtet werden. Die Unterschiede waren aber im

Gegensatz zu den mit Hilfe der Microarray-Technologie ermittelten Ergebnisse nicht signifikant.

Die immunhistochemischen Studien ergaben eine tendenzielle Reduktion der α - und β -Catenin-Expression in Endometrien von Endometriose-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die cDNA-Analysen haben gezeigt, dass β -Catenin signifikant in den endometrialen Biopsien von Frauen mit Endometriose herunterreguliert wird. Derzeit wird untersucht, ob sich diese Beobachtung auch mittels semiquantitativer RT-PCR bestätigen lässt. Die α -Catenin-Expression unterscheidet sich auf transkriptionaler Ebene nicht signifikant zwischen Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose (E5g; Tab.16). Die cDNA des E-Cadherins ist auf dem verwendeten Atlas Array nicht vertreten.

Die Unterschiede der mittels DNA-Array und semiquantitativer RT-PCR erzielten Ergebnisse lassen sich zum einen durch Schwankungen im relativen Expressionslevel der Gene innerhalb der beiden endometrialen Gruppe erklären. Aber dies alleine begründet nicht, warum z.B. EGF-R und ZO-1 auf keinem der sieben analysierten Autoradiogramme (E1e, A2g; Tab. 16, Abb. 14b) detektierbar waren, obwohl die in dieser Arbeit beschriebenen immunhistochemischen Analysen gezeigt haben, dass EGF-R und ZO-1 im humanen Endometrium exprimiert werden. Diese Tatsache stellt die Sensitivität und Zuverlässigkeit des hier verwendeten Array-Systems in Frage.

Die in Verbindung mit der Microarray-Technik gemachten Erfahrungen zeigen, dass die Validierung der Expressionsunterschiede durch andere Methoden, wie z.B. der Real-Time PCR, quantitativer bzw. semiquantitativer RT-PCR oder Northern-Analysen, essentiell ist, um eine zuverlässige Aussage über Veränderungen des Expressionsmusters, z.B. beim Vergleich maligner Gewebe mit Ursprungsgewebe oder Gewebeproben unterschiedlicher Organe, machen zu können.

Die mit der Chip-Technik von Affymetrix erzielten Expressionsmuster und -unterschiede scheinen zuverlässiger zu sein. In den meisten Publikationen konnten die Ergebnisse mittels Northern-Analysen oder quantitativer PCR bestätigt werden (Iyer et al., 1999; Coller et al., 2000). Aber auch bei diesem System ist die Überprüfung der Ergebnisse durch eine unabhängige Methode notwendig. Zhu et al. konnten zwar einen Teil, aber nicht alle ihrer mit Hilfe der Chip-Technik erzielten Ergebnisse, durch Northern-Analysen oder anhand von publizierten Daten bestätigen (Zhu et al., 1998).

5.3 Endometriale Zelllinien: Werkzeuge zur Charakterisierung der Endometriose und für die Entwicklung von Therapieschemata ?

Ein Ziel dieser Arbeit war u.a. die Etablierung von endometrialen Zelllinien. Diese Zelllinien sollten als Kulturmodell für die Analyse Endometriose-relevanter Gene und damit zur Untersuchung der Entstehungsursache der Endometriose dienen.

Das Endometrium besteht aus unterschiedlichen Zelltypen, dem luminalen und glandulären Epithelzellen, sowie den Stromazellen, die sich wiederum in Fibroblasten, Myofibroblasten und hämatopoetischen Zellen unterteilen lassen (Merviel et al., 1994).

Um endometriale Zellkulturmodelle etablieren zu können, musste zuerst eine geeignete Methode zur Separation von Epithel- und Stromazellen aus humanem Endometrium entwickelt werden. Die Filtrationstechnik stellte sich als schonenstes Isolierungsverfahren heraus, das zudem einen sehr hohen Reinheitsgrad und zum anderen eine geringe Mortalität der epithelialen und stromalen Primärkulturen gewährleistete. Die zusätzliche Epithelextraktion mit Hilfe von Antikörper-beschichteten Magnetpartikeln erhöhte zwar den Reinheitsgrad der Zellsuspensionen, konnte aber bei anschließender immunhistochemischer Charakterisierung und *in situ*-Elektroporation der Epithelzellen nicht angewandt werden, da sich die Magnetpartikel und der auf dem Magnetpartikel sitzende Antikörper nicht von den Epithelzellen entfernen ließen und sich störend auf diese Experimente auswirkten.

Die Analyse der optimalen Kulturbedingungen ergab, dass endometriale Epithelzellen in Standardkulturmedium bestehend aus DMEM / Ham's F12 und 10 % FCS die höchste Teilungsaktivität zeigen und diese am längsten beibehalten, wenn sie zusätzlich Östradiol und den Wachstumsfaktor EGF erhalten. Dennoch stellten die epithelialen Primärkulturen ihre Proliferationsaktivität innerhalb von 1 Woche ein und ließen sich nicht subkultivieren. Diese Beobachtungen, dass sich endometriale Epithelzellen nicht erfolgreich subkultivieren lassen und nur wenige Wochen in Kultur überleben, wurden auch von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen gemacht (Liszcak et al., 1977; Satyaswaroop et al., 1979; Trent et al., 1980; Varma et al., 1982; Matthews et al., 1992). Die Untersuchungen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zeigten, dass endometriale Stromazellen für eine optimale Proliferationsaktivität keinerlei Zusätze benötigten. Sie konnten, im Gegensatz zu den endometrialen Epithelzellen, im Standardkulturmedium bis zu durchschnittlich 11-mal passagiert werden, was etwa 22 Populationsverdoppelungen entspricht. Auch Merviel et al. (Merviel et al., 1994) und Rinehart et al (Rinehart et al., 1993) ermittelten die maximale Lebensspanne primärer Stromazellen in Kultur. Merviel et al. gelang es, endometriale Stromazellen 75 Tage zu kultivieren bzw. 8-10-mal zu passagieren (Merviel et al., 1994). Bei

Rinehart et al. verdoppelten sich die Stromapopulationen zwischen 10- und 25-mal (Rinehart et al., 1993).

Im Gegensatz zu Keimzellen und den meisten Tumorzellen kommt es in somatischen Zellen mit jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomerlänge. Weinrich et al. (Weinrich et al., 1997) konnten zeigen, dass in humanen somatischen Zellen, die im Gegensatz zu Keimzellen und Tumorzellen keine Telomerase-Aktivität besitzen, nur noch die RNA-Komponente (hTR) nicht aber mehr die Telomerase Reverse Transkriptase Untereinheit (hTRT) der Telomerase exprimiert wird. Es wird vermutet, dass das Erreichen einer kritischen Telomerlänge den Eintritt in einen teilungsinaktiven Zustand, die replikative Seneszenz, auslöst (Harley et al., 1990; Allsopp et al., 1992; Vaziri et al., 1993; Hastie et al., 1990; Wright und Shay, 1992; Wynford-Thomas, 1996). Die replikative Seneszenz ist dadurch charakterisiert, dass die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verbleiben (Goldstein, 1990) und mit zahlreichen morphologischen und physiologischen Veränderungen einhergeht, wie z.B. der Störung der Genregulation und Protein-Synthese (Sierra et al., 1989; Adler et al., 1996; Dimri et al., 1996; Halle et al., 1997).

Um Langzeitstudien an den endometrialen Zellkulturen durchführen zu können, war eine Verlängerung der Lebensspanne der Stromazellen und insbesondere der Epithelzellen notwendig. Die Verlängerung der Lebensspanne und sogar die Immortalisierung von Primärzellen ist durch die stabile Integration des SV40LT-Antigen bzw. von E1A, einem Protein des Adenovirus Serotyp 12, möglich (Houweling et al., 1980; Sack, 1981; Jochemsen et al., 1982; Bernards et al., 1983; Ruley, 1983; Chang, 1986; Hibi et al., 1991).

Die Immortalisierung humaner Zellen durch das SV40-LT erfolgt in zwei Phasen. In der ersten Phase dehnt sich der teilungsaktive Zustand der Zellen, die SV40LT exprimieren, über die maximale replikative Lebensspanne der untransfizierten Zellen, dem sogenannten Hayflick-Limit (Hayflick und Moorhead, 1961; Hayflick, 1965), aus. Der Eintritt in die replikative Seneszenz unterbleibt. Bedingt wird dies, durch die Fähigkeit der LT-Antigens an die Wachstumssuppressoren p53 und pRB zu binden und diese zu inaktivieren (zur Übersicht: Ozer, 2000). Aber auch SV40-LT exprimierende Zellen treten irgendwann in die replikative Seneszenz ein. Nur ein geringer Teil der Zellen, bei Fibroblasten jede $3 \cdot 10^{-7}$ Zelle, bei Mamma-Epithelzellen jede $1 \cdot 10^{-5}$ Zelle, überwindet die sogenannte Zellkrise und wird immortalisiert (Reddel et al., 1995). Dies wird als zweite Phase der SV40LT-induzierten Immortalisierung angesehen (Reddel et al., 1995; Ozer, 2000).

Hierzu ist nicht nur die Inaktivierung von p53 und pRB sondern auch die von SEN6, einem Seneszenzgen, notwendig. Desweiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Stabilisierung der Telomere, eventuell sogar die Wiederherstellung der Telomeraseaktivität, gewährleistet sein muss, um Zellen zu immortalisieren (zur Übersicht: Ozer, 2000).

E1A spielt eine Rolle sowohl bei der onkogenen Transformation, die für die Immortalisierung von Zellen notwendig ist, als auch bei der Regulation der Transkription und des Zellwachstums (Moran und Mathews, 1987; zur Übersicht: Brockmann und Esche, 1995). E1A interagiert mit Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt sind, z.B. p105 RB, dem RB-verwandten Protein p107, sowie dem DNA-Bindeprotein p300 und einem p300-verwandten p400-Polypeptid, die mit den transformierenden Eigenschaften von E1A korreliert sind (Whyte et al., 1988, 1989; Egan et al., 1988, 1989; Ewen et al., 1991; Barbeau et al., 1994).

Zur Immortalisierung der endometrialen Primärzellen wurden diese mit SV40LT-Antigen, E1A bzw. mit E1A in Kombination mit E1B, das durch E1A immortalisierte Zellen vollständig transformiert (Bernharts et al., 1983), transfiziert.

In Rahmen der hier vorliegenden Studie wurden 7 Stromazelllinien und 6 Epithelzelllinien von 126 Zellklonen, die nach der Transfektion mit SV40LT gewachsen waren, sowie 4 von 6 E1A-positiven stromalen Zelllinien, eine davon war zu Anfang der Langzeitkultur auch E1B positiv, auf ihre Proliferationsaktivität, morphologischen Eigenschaften und die Expression verschiedener Differenzierungsmarker untersucht und mit den Primärkulturen verglichen.

Alle SV40LT-positiven Zelllinien exprimierten das virale Gen stabil bis zum Eintritt in die replikative Seneszenz. Die E1A-Expression war in späten Passagen schwächer als zu Beginn der Langzeitkultivierung. E1B konnte in Zelllinie 12S E1A lediglich bis Passage 7 mittels RT-PCR detektiert werden.

Trotz der Verlängerung der replikativen Lebensspanne der endometrialen Stroma- und Epithelzellen, gelang es nicht, die Zellen zu immortalisieren. Alle Zelllinien stellten im Verlauf der Langzeitkultivierung, die je nach Zelllinien zwischen 4 und 10 Monaten lag, ihre Teilungsaktivität ein. Obwohl die teilungsinaktiven Zellen bis zu 8 Wochen weiter kultiviert wurden, konnte keine Wiederaufnahme der Proliferationsaktivität beobachtet werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht, endometriale Zelllinien zu immortalisieren. Rinehart et al. (Rinehart et al., 1993) transfizierte endometriale Stromazellen mit einer temperatursensitiven Variante des SV40LT. Dieser Arbeitsgruppe gelang es, zwei

Stromazelllinien zu immortalisieren. Bei diesen beiden Linien setzte nach 28 bzw. 58 Populationsverdopplungen die replikative Seneszenz ein. Nach 8 bzw. 12 Wochen nahmen einige Zellen ihre Teilungsaktivität wieder auf und es bildeten sich erneut Kolonien (Rinehart et al., 1993). Merviel et al. gelang es, mit SV40LT-transformierte endometriale Epithel- und Stromazellen 10 bis 11 Monate zu kultivieren, ohne dass die Zellen in die replikative Seneszenz eintraten (Merviel et al., 1994).

Bis transformierte Zellen die Zellkrise überwinden, können auch mehrere Monate vergehen. Reddel et al. (Reddel et al., 1995) zeigte, dass bronchiale Epithelzellen, die mit SV40LT-transformiert wurde, nach etwa 20 Passagen in die replikative Seneszenz eintraten und z.T. erst nach 9 Monaten ihre Teilungsaktivität wieder aufnahmen.

Die Etablierung stabiler Zelllinien des humanen Endometriums mit E1A wurde bisher noch nicht beschrieben. Lediglich Zellen des Ratten-Endometriums wurden mit E1A immortalisiert (Helftenbein et al., 1993; Hyder et al., 1995).

Transformierte Zelllinien eignen sich nur dann als Zellkulturmodell, wenn sie den Primärkulturen und auch dem Endometrium als Ausgangsgewebe in ihren morphologischen und molekularen Eigenschaften ähneln. Nur dann ist eine Aussage z.B. über die Wirkung verschiedener Mediatoren und Therapeutika auf das humane Endometrium möglich.

Die transformierten epithelialen und stromalen Zelllinien sind daher in bezug auf ihr Proliferationsverhalten, ihre Morphologie und die Expression verschiedener Differenzierungsmarker mit den Primärkulturen und, soweit dies möglich war, auch mit dem Endometrium verglichen worden.

Die Proliferationsaktivität epithelialer und stromaler Zelllinien ist generell höher als die der Primärkulturen unabhängig davon, ob die Zellen SV40LT oder E1A exprimierten.

Eine erhöhte Proliferationsaktivität bei SV40LT-transformierten endometrialen Epithel- und Stromazellen im Vergleich zu den Primärzellen wurde auch von Merviel et al. beschrieben (Merviel et al., 1994). Verursacht wird dies vermutlich durch die Interaktion des SV40LT-Antigen mit p53 und pRB, die beide an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind und als Wachstumssuppressoren fungieren.

Die epithelialen Zelllinien verlieren im Vergleich zu den epithelialen Primärkulturen im Verlauf der Langzeitkultur ihren epithelialen Charakter. Mit Ausnahme von Zelllinie 184E SV40LT, die Areale platersteinförmiger Zellen enthielt, war die Morphologie aller anderen

epithelialen Zelllinien sehr heterogen und ähnelte z.T. eher einer Fibroblastenkultur. Das einzige morphologische Merkmal das auf den epithelialen Charakter der Zelllinien hindeutete, war die Ausbildung sekretorischer Vesikel auf der Zelloberfläche. Die typische epitheloide Gestalt der primären Epithelzellen konnte in keiner transformierten Zellkulturen beobachtet werden. Bei allen Epithelzelllinien nahm die Cytokeratin-Expression mit zunehmender Passagenzahl ab. Der Verlust von Cytokeratin wurde auch bei SV40LT-transformierten endometriotischen Epithelzelllinien (Starzinski-Powitz et al., 1998) und bei Epithelzelllinien des Ratten-Endometriums (Wiehle et al., 1990) beobachtet. Bei den endometriotischen Epithelzelllinien von Akoum et al. war das Cytokeratin-Netzwerk der transformierten Zellen im Gegensatz zu den Primärzellen fragmentiert (Akoum et al., 1999). Die von Merviel et al., etablierten Epithelzelllinien waren zu 100 % Cytokeratin-positiv. Es wird aber keine Aussage darüber gemacht, wann im Verlauf der Langzeitkultur die Cytokeratin-Expression analysiert wurde.

Auch die Fähigkeit zur Zell-Zell-Adhäsion ging bei allen Epithelzelllinien verloren. Nur in einem Teil der Epithelzelllinien konnten E-Cadherin und ZO-1 noch in frühen Passagen nachgewiesen werden. Aber auch bei diesen Zelllinien nahm die Expression von E-Cadherin und ZO-1 im Verlauf der Langzeitkultivierung ab.

Obwohl alle Primärkulturen EGF-R exprimierten und in den meisten Primärkulturen auch der Östrogenrezeptor detektierbar war, waren mit Ausnahme von 165E SV40LT alle Zelllinien ER-negativ. EGF-R war lediglich zu Anfang der Langzeitkultur in den analysierten Epithellinien nachweisbar. Auch Merviel et al. konnten in den endometriale Epithelzelllinien kein ER detektieren, allerdings waren auch deren Primärkulturen ER-negativ (Merviel et al., 1994).

Das Wachstum und die Proliferation der epithelialen Zelllinien kann aufgrund des Verlustes der beiden Rezeptoren nicht mehr über den EGF- und ER-Signalweg beeinflusst werden, die, wie Untersuchungen an ERKO-Mäusen haben gezeigt, miteinander gekoppelt sind (Curtis et al., 1996). Da die uterinen Funktionen durch die Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren und Steroidhormonrezeptoren reguliert werden (Irwin et al., 1991), haben die epithelialen Zelllinien ein entscheidendes Charakteristikum des endometrialen Epithels verloren.

Die Expression des Progesteron-Rezeptors, sowie die Expression der Integrin-Untereinheiten β_1 und β_2 ist sowohl im humanen Endometrium als auch in den Primärkulturen und den epithelialen Zelllinien identisch. Im Gegensatz zu Merviel et al. (Merviel et al., 1994), konnte eine Immunreaktion gegen PR in den Primärkulturen sowie in den Epithelzelllinien

beobachtet werden. Sowohl β_1 als auch β_2 -Integrin wird im Endometrium zyklusunabhängig exprimiert (Lessey et al., 1994; Regidor et al., 1998).

Desweiteren konnte in nahezu allen Zelllinien auch α_6 und in 30 % der Fälle die Expression von β_3 und α_3 nachgewiesen werden. Auch im humanen Endometrium wird α_6 (Lessey et al., 1994; Albers et al., 1995) und α_3 (Lessey et al., 1994; Regidor et al., 1998) exprimiert. Regidor et al. beschrieben zudem eine Abnahme des α_3 -Integrins in Endometrium von Endometriose-Patientinnen. Erstaunlicherweise exprimieren gerade die epithelialen Zelllinien, die von endometrialen Biopsien einer Endometriose-Patientin abstammen, diese Untereinheit. Lediglich in den Primärkulturen konnte α_6 nicht und α_3 nur einmal detektiert werden.

β_3 -Integrin konnte weder in endometrialen Biopsien, die alle während der Proliferationsphase entnommen wurden, noch in den Primärzellen beobachtet werden. α_v konnte nur in einer endometrialen Probe sehr schwach nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass sowohl β_3 - als auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in der Sekretionsphase, während des Implantationsfensters, exprimiert werden (Lessey et al., 1994; Albers et al., 1995; Creus et al., 1998). Es wird zudem eine Korrelation zwischen der aberrante $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression und Endometriose als auch Infertilität beschrieben (Lessey et al., 1994b, 1995, 1996). Die beiden Zelllinien, bei denen eine β_3 bzw. β_3 und α_v detektiert wurden, hatten ihren Ursprung in einer endometrialen Biopsie einer Endometriose-Patientin.

Unter den untersuchten epithelialen Zelllinien existieren nur zwei Linien, die zumindest in zu Beginn der Langzeitkultivierung (165E SV40LT, 178E SV40LT) ein zu dem humanen Endometrium identisches Expressionsmuster in bezug auf die analysierten Marker aufwiesen. Der einzige Unterschied zu den endometrialen Biopsien besteht im Verlust von E-Cadherin im Falle von 165E SV40LT bzw. ER im Falle von 178E SV40LT, sowie in der heterogenen Expression von Cytokeratin.

Dass es zu Dedifferenzierung bzw. Veränderungen des Phänotyps der epithelialen Zelllinien im Verlauf der Kultivierung kommt, wurde auch von Starzinski-Powitz et al. (Starzinski-Powitz et al., 1998) beschrieben. Deren endometriotische Zelllinie entwickelte nach mehreren Passagen einen nicht-invasiven Phänotyp, ohne dass sich das proliferative Potential veränderte. Auch Wiehel et al. beobachteten bei endometrialen Epithelzellen der Ratte, die mit SV40LT bzw. E1A transformiert waren, einen Verlust des epithelialen Charakters (Wiehle et al., 1990).

Die Stromazelllinien unterschieden sich in ihrem Expressionsmuster nicht wesentlich von den stromalen Primärkulturen und dem humanen Endometrium. Dies gilt sowohl für die heterogene Expression der Hormonrezeptoren ER und PR als auch der Expression der Integrin-Untereinheiten β_1 und β_2 . Lediglich α_6 -Integrin wird in den Zelllinien häufiger detektiert als in den endometrialen Biopsien. Die Primärkulturen waren α_6 -negativ. In der Proliferationsphase des Menstruationszyklus wurde im humanen Endometrium sowohl die Expression von β_1 als auch α_6 sowie schwach α_3 und in seltenen Fällen $\alpha_v\beta_3$ detektiert (Lessey et al., 1994).

Merviel et al. konnten weder in den primären Stromakulturen noch in den SV40LT-transformierten Kulturen ER und PR detektieren. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen konnte diese Arbeitsgruppe auch kein Desmin in den Stromazelllinien nachweisen.

EGF-R wird in allen drei Ansätzen heterogen oder schwach in einem Teil der analysierten Proben exprimiert. In drei Zelllinien und einer endometrialen Probe konnte auch α_v nachgewiesen werden.

Nur die SV40LT-transformierten Stromazellen von Endometriose-Patientinnen zeigen noch die typische fibroblastoide Gestalt. Alle übrigen Zelllinien setzten sich aus unterschiedlich geformten Zellen zusammen. Stromazelllinien lassen sich, ebenso wie primäre Stromazellen, *in vitro* dezidualisieren, was durch die erhöhte Expression von Prolaktin einem Dezidualisierungsmarker, bestätigt wurde. Ein weiterer Dezidualisierungsmarker ist IGFBP-1. Bronsens et al., die ebenfalls SV40LT transformierte endometriale Stromazellen mit MPA und 8-Bromo-cAMP dezidualisiert haben, wiesen einen Anstieg der IGFBP-1-Expression nach der Dezidualisierung der Zellen nach (Bronsens et al., 1996).

Da die in dieser Arbeit etablierten Stromazelllinien *in vitro* dezidualisiert werden können, kann unabhängig von frisch entnommenem Gewebematerial die Dezidualisierungsreaktion und der Einfluss verschiedener Faktoren auf diese Reaktion untersucht werden. Es wird vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen Endometriose und Infertilität besteht. Denn bei 60 bis 80 % der Frauen mit primärer und / oder sekundärer Sterilität wird auch Endometriose nachgewiesen (Kistner, 1979; Schindler, 1995; Christensen et al., 1995; Ledger, 1999). Die hier etablierten Stromazelllinien können damit als Modell dienen, um mögliche Störung der Dezidualisierungsfähigkeit des Endometriums bei Frauen mit Endometriose zu untersuchen.

Die stromalen Zelllinien ähneln in allen untersuchten Eigenschaften eher den Primärkulturen und dem humanen Endometrium als die epithelialen Zelllinien. Sie stellen daher ein geeignetes Werkzeug für weitere Untersuchungen zur Entstehung der Endometriose sowie der Wirkung von Substanzen auf das endometriale Stroma dar.

Bei den Epithellinien können lediglich 165E SV40LT und 178E SV40LT begrenzt in den frühen Passagen verwendet werden, um den Einfluss verschiedener Mediatoren und therapeutischen Substanzen zu analysieren. Langzeitstudien sind mit den epithelialen Zelllinien nicht möglich.

Ad12 gehört im Gegensatz zu z.B. Ad5 zu den onkogenen Adenoviren (Mukai und Kobayashi, 1972). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die vier stromalen Zelllinien 4S E1A, 12S E1A, 34S E1A und 55S E1A, die Ad12 E1A stabil exprimieren, onkogene Eigenschaften besitzen. Um dies zu analysieren, müsste ein Softagar-Assay durchgeführt werden. Zellen mit onkogenen Eigenschaften sind in der Lage, nicht nur im adhären Zustand sondern auch in Softagar Kolonien zu bilden. Desweiteren sollte die Expression des MHC Klasse I-Gens in den Zelllinien untersucht werden, da gezeigt wurde, dass Ad12 im Gegensatz zu Ad5 E1-transformierten Zellen einen reduzierte MHC Klasse I-Antigen Level besitzen (Vasavada et al., 1986; Friedmann und Ricciardi, 1988).

Auch eine Veränderung des Karyotyps ist bei den transformierten endometrialen Zellen nicht auszuschließen und sollte in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

Bei vielen mit SV40LT transformierten Zelllinien wurde eine Veränderungen des Karyotyps beobachtet. Akoum et al. wies bei 96 % seiner endometriotischen Zelllinien einen polyploiden Karyotyp nach (Akoum et al., 1999). Immortalisierte humane Leberzellen waren je nach Zelllinie und Passage hypodiploid, hypotriploid bzw. hypotetraploid (Miyazaki et al., 1993).

6 Ausblick

Das Ziel zukünftiger Experimente ist es, die replikative Lebensspanne endometrialer Zellen durch die Wiederherstellung der Telomerase-Aktivität zu erhöhen (Bodnar et al., 1998). Der Vorteil dieser Strategie ist, dass die Verlängerung der replikativen Lebensspanne der Zellen nicht durch zellfremde Faktoren erfolgt, deren Eigenschaften den zellulären Stoffwechsel und den Zellzyklus verändern, sondern lediglich ein natürlicher, inaktiver Vorgang in der Zelle neu induziert wird.

Zudem werden derzeit die mittels Microarray-Technologie detektierten Expressionsunterschiede zwischen eutopen Endometrien von Frauen ohne und mit Endometriose der übrigen, in dieser Arbeit nicht näher untersuchten, Gene verifiziert. Parallel zu der Erfassung des endometrialen Expressionsmusters mittels der Atlas Arrays von CLONTECH, erfolgten im Rahmen einer Kooperation Expressionsanalysen mit Oligonukleotid-Chips von Affymetrix.

Die Dedifferenzierung endometrialer Gewebefragmente in der Bauchhöhle werden zudem an einem Tiermodells analysiert (Grümmer et al., eingereicht). Mit diesem Modell soll der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Pathogenese der Endometriose untersucht werden.

7 Zusammenfassung

Die molekular- und zellbiologischen Mechanismen, die die Pathogenese der Endometriose beeinflussen, sind bis heute nicht geklärt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Dedifferenzierungsprozesse während der Pathogenese der peritonealen Endometriose anhand von Markergenen zu analysieren. Hierzu wurden vergleichende immunhistochemische Untersuchungen an eutopen und ektopen Endometrien durchgeführt.

Da die Endometriose in der Literatur häufig als proliferative Erkrankung beschrieben wird, die ektopen Läsionen in der Mehrzahl aber sehr klein sind, wurde, um diesen Widerspruch aufzuklären, im Rahmen dieser Arbeit das Proliferationsverhalten der ektopen Läsionen untersucht. Die Erhebung des Proliferationsindex hat gezeigt, dass die Proliferationsaktivität der Endometrioseherde reduziert ist, gestützt wird dies durch die geringere Expression von EGF und EGF-R in den ektopen Läsionen.

Durch den Verlust der Adhäsionsfähigkeit erlangen die Endometrioseherde die Fähigkeit invasiv zu wachsen, was bereits von Gaetje et al. beschrieben wurde (Gaejje et al., 1995, 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Expression von E-Cadherin

sondern auch die von α - und β -Catenin, zwei essentiellen Komponenten des Adhäsionskomplexes, ebenfalls in den Herden abnimmt bzw. vollständig reduziert wird.

Die Endometrioseherde sind somit charakterisiert durch einen invasiven Phänotyp, weisen aber nur eine schwache Proliferationsaktivität auf.

Da in Verbindung mit der Endometriose inflammatorische Reaktionen beobachtet wurden, wurde immunhistochemisch analysiert, ob eine Korrelation zwischen der NO- und Prostaglandin-Synthese und mit der Endometriose einhergehenden Entzündungsreaktionen besteht. Lediglich für iNOS, nicht aber für eNOS, COX-1 und -2, konnte in den Endometrioseherden im Vergleich zu den eutopen Endometrien eine leicht erhöhte Expression detektiert werden. Eine generelle Hochregulation von Mediatoren der inflammatorischen Kaskade konnte nicht gezeigt werden.

Es gibt verschiedene medizinische und molekularbiologische Hinweise darauf, dass die Entstehung der Endometriose und die mit ihr auftretenden Symptome durch Dedifferenzierungen des Endometriums von Endometriose-Patientinnen bedingt sein können. Um diese Theorie zu bestätigen, wurde das endometriale Genexpressionsmuster von Frauen ohne und mit Endometriose verglichen. Die gezielte Erfassung der im Endometrium exprimierten Gene und die Detektion möglicher Dedifferenzierungen erfolgte mit der Array-Technologie. 21 von 208 auf dem Array nachgewiesenen Genen zeigten einen signifikant veränderten Expressionslevel in den Endometrien von Frauen mit Endometriose im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Proliferationsphase. Die Expressionsunterschiede von 7 der 21 Gene wurden mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft. Zu diesen Genen gehörten EAR-2, IFGII, HSP27 sowie VEGF-R1, ICAM-1, RANTES und Integrin β_1 . Nur EAR-2 und IFGII zeigten bei 67 % der anhand der Serumhormonwerte zusammengestellten Probenpaare eine tendenzielle Abnahme und ICAM-1 und Integrin β_1 bei 67 % bzw. 50 % der Probenpaare eine tendenzielle Zunahme der Expression in den eutopen Endometrien von Endometriose-Patientinnen im Vergleich zu den Biopsien von Frauen ohne Endometriose. Weiterführende Experimente werden zeigen, ob auch unter der noch nicht untersuchten Gen-Gruppe weitere Faktoren zu finden sind, deren Expressionsunterschiede im Endometrium von Frauen mit Endometriose validiert werden können.

Um den Einfluss zell- und molekularbiologischer Marker, sowie die veränderte Regulation der in den cDNA-Expressionsanalysen detektierten Gene auf die Entwicklung endometrialer

Zellen untersuchen zu können, wurden Stroma- und Epithelzelllinien etabliert. Desweiteren sollte das Zellkulturmodell dazu dienen, neue Therapieansätze zu entwickeln.

Für die Etablierung des Zellkulturmodells mussten zunächst die Zellen aus dem humanen Endometrium isoliert und als Primärkultur angelegt werden. Die Filtrationstechnik erwies sich in Hinblick auf die Reinheit der epithelialen und stromalen Zellsuspensionen und die geringe Mortalitätsrate als geeignetste Methode.

Zur Etablierung stabiler Zelllinien, die als Zellkulturmodell eingesetzt werden sollten, wurden die Primärkulturen mit dem SV40 ,large T'-Antigen-Gen und dem E1A-Gen bzw. dem E1A-Gen in Kombination mit dem E1B-Gen, transfiziert. Die Transfektion der Stromazellen erfolgte mittels Lipofektion, die der Epithelzellen mittels *in situ*-Elektroporation.

Die Lebensdauer, Proliferationsaktivität, Morphologie, sowie die Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker verschiedener mit SV40LT- und E1A-exprimierender Stromazelllinien bzw. SV40LT-positiver Epithelzelllinien wurden untersucht und die Ergebnisse mit den Eigenschaften der Primärkulturen verglichen.

Die replikative Lebensspanne der Epithelzelllinien war 15- bis 25-mal länger als die der primären Epithelzellen, die nicht subkultiviert werden konnten. Die Stromazelllinien konnten zwischen 2,5- und 4-mal länger in Kultur gehalten werden als die Primärkulturen.

Nicht nur anhand der rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen, die Morphologie der epithelialen Zelllinien war sehr heterogen, sondern auch durch die Abnahme der Expression verschiedener Epithelmarker wird deutlich das die Epithelzelllinien ihren epithelialen Charakter im Verlauf der Langzeitkultur verlieren. Mit jeder Passagierung nahm der Anteil Cytokeratin-exprimierender Zellen ab. Auch ZO-1 und E-Cadherin konnten nur in einem Teil der Zellen in frühen Passagen beobachtet werden. Aber auch diese Zelllinien stellten die Expression dieser Marker im Verlauf der Langzeitkultur ein.

Der Progesteron-Rezeptor war im Gegensatz zum Östrogen-Rezeptor sowohl in den Primärzellen als auch in den epithelialen Zelllinien detektierbar. Das Integrin-Expressionsmuster der primären und transformierten Epithelzellen war nahezu identisch. Lediglich α_6 -Integrin wurde in den Zelllinien hochreguliert.

Das Expressionsmuster der Stromazelllinien war in bezug auf die analysierten Differenzierungsmarker im Vergleich zu den Primärzellen nahezu unverändert. Lediglich der Östrogen-Rezeptor war nur noch in einem Teil der Zelllinien detektierbar. α_6 -Integrin wurde

in den Zelllinien hochreguliert. Die Stromazelllinien konnte, ebenso wie die primären Stromazellen, *in vitro* dezidualisiert werden.

Da die transformierten Stromazelllinien in bezug auf die untersuchten Eigenschaften nur geringfügig Veränderungen im Vergleich zu den Primärkulturen aufwiesen, eignen sie sich generell als Zellkulturmodell. Die Epithelzelllinien hingegen sind nur eingeschränkt in frühen Passagen als Ersatz für die Primärkulturen einsetzbar, da sie im Verlauf der Langzeitkultur ihren epithelialen Charakter verlieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht nur die ektopen sondern auch die eutopen Endometrien von Frauen mit Endometriose Dedifferenzierungen bzw. Veränderungen im Genexpressionsmuster aufweisen. Welche Rolle diese veränderten Parameter bei der Pathogenese der Endometriose spielen, muss in zukünftigen Experimenten, z.B. anhand der etablierten endometrialen Zelllinien, analysiert werden.

8 Literatur

Aberle H, Schwartz H, Kemler R (1996): Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 61, 514-523

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997): Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804

Acosta AA, Buttram VC, Besch PK, Malinak LR, Franklin RR, Vanderheyden JD (1973): A proposed classification of pelvic endometriosis. *Obstet Gynecol* 42, 19

Adler V, Dolan LR, Kim J, Pincus M, Barret JC, Ronai Z (1996): Changes in jun N-terminal kinase activation by stress during aging of cultured normal human fibroblasts. *Mol Carcinog* 17, 8-12

Akoum A, Lemay A, Paradis I, Rheault N, Maheux R (1996): Secretion of interleukin-6 by human endometriotic cells and regulation by proinflammatory cytokines and sex steroids. *Hum Reprod* 11, 2269-2275

Akoum A, Lavoie J, Drouin R, Jolicoeur C, Lemay A, Maheux R, Khandijan EW (1999): Physiological and cytogenetic characterization of immortalized human endometriotic cells containing episomal simian virus 40 DNA. *Am J Pathol* 154, 1245-1257

Albers A, Thie M, Hohn HP, Denker HW (1995): Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cells during the menstrual cycle. *Acta Anat* 153, 12-19

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10114-10118

Altman GB, Gown AM, Luchtel DL, Baker C (1999): RANTES production by cultured primate endometrial epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 42, 168-174

American Fertility Society (1979): Classification of endometriosis. *Fertil Steril* 32, 631

Arima K, Nasu K, Narahara H, Fujisawa K, Matsui N, Miyakawa I (2000): Effects of lipopolysaccharide and cytokine on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 6, 246-251

Arumugam K, Templeton AA (1992): Endometriosis and race. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 32, 164-165

Asselin E, Lacroix D, Fortier MA (1997): IFN-tau increases PGE₂ production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 132, 117-126

Badawy SZA, Cuenca V, Frelich H, Stefanu C (1990): Endometrial antibodies in serum and peritoneal fluid of infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 53, 930-932

Barbeau D, Charbonneau R, Whalen SG, Bayley ST (1994): Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 9, 359-373

Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE (1991): Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 147, 4398-4401

- Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H** (1994): E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse-type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54, 3845-3852
- Behrens J, Mareel MM, van Roy FM, Birchmeier W** (1989): Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108, 2435-2447
- Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W** (1993): Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/ β -catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120, 757-766
- Behrens J** (1993): The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 24, 175-184
- Beliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM** (1997): Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 67, 266-272
- Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, Falck Larsen J, Hamberger L, Horn T** (1994): Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil* 101, 327-332.
- Bentz BG, Barnes MN, Haines GK, Lurain JR, Hanson DG, Radosevich JA** (1997): Cytoplasmic localization of endothelial constitutive nitric oxide synthase in endometrial carcinomas. *Tumour Biol* 18, 290-300
- Bergqvist A** (1995): Hormonal regulation of endometriosis and the rationales and effects of gonadotropin-releasing agonist treatment: a review. *Hum Reprod* 10, 446-452
- Bergqvist A, Ferno M** (1993): Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison according to localization and recurrence. *Fertil Steril* 60, 63-68
- Bergqvist A, Brunkwall J, Ploman F** (1997): Concentration of prostaglandin F₂alpha in follicular fluid from women with endometriosis. *Hum Reprod* 12, 1789-1793
- Bernhards R, Schrier PI, Bos JL, van der Eb AJ** (1983): Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology* 127, 45-53
- Birchmeier W, Behrens J, Weidner KM, Frixen UH, Schipper J** (1991): Dominant and recessive genes involved in tumor cell invasion. *Curr Opin Cell Biol* 3, 832-840
- Birchmeier W, Behrens J** (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26
- Birchmeier W, Hülsken J, Behrens J** (1995): E-cadherin as an invasion suppressor. In *Cell adhesion and human disease*. Ciba Found Symp 189, 124-141
- Blumenkrantz MU, Gallagher N, Basnore RA** (1981): Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 57, 667-670
- Blumenthal RD, Samoszuk M, Taylor AP, Brown G, Alisauskas R, Goldenberg DM** (2000): Degranulating eosinophils in human endometriosis. *Am J Pathol* 156, 1581-1588
- Bocker J, Tadmor OP, Gal M, Diamant YZ** (1994): The prevalence of adenomyosis and endometriosis in an ultra-religious Jewish population. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 20, 125-129

- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE** (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352
- Boehm, KD, Daimon M, Gorodeski IG, Sheean LA, Utian WH, Ilan J** (1990): Expression of the insulin-like and platelet-derived growth factor genes in human uterine tissues. *Mol Reprod Dev* 27, 93-101
- Brandenberger AW, Lebovic DI, Tee MK, Ryan IP, Tseng JF, Jaffe RB, Taylor RN** (1999): Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Mol Hum Reprod* 5, 651-655
- Bredt DS, Snyder SH** (1990): Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-required enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 682-685
- Bridges JE, Prentice A, Roche W, Englefield P, Thomas EJ** (1994): Expression of integrin adhesion molecules in endometrium and endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 101, 696-700
- Brockmann D, Esche H** (1995): Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. *Top Microbiol Immunol* 199, 81-112
- Brodth P, Dedhar S** (1996): The Integrins: Mediators of cell-extracellular matrix and intercellular communication. In *Cell Adhesion and Invasion in Cancer Metastasis*. Brodt P (eds), RG Landes Company, pp.35-60
- Brosens JJ, Hayashi N, White JO** (1999): Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 140, 4809-4820
- Brown J, Moon R** (1998): Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr Opin Cell Biol* 10, 182-187
- Bühler K** (1995): Therapieregime zur Behandlung der Endometriose: Einsatz in der täglichen Praxis. *Fertilität* 11, 1-4
- Bulun SE, Mahendroo MS, Simpson ER** (1993): Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 1458-1463
- Busacca M, Candiani M, Carlini L, Gonfiantini C, Vignali M** (1992): Clinical aspects of endometriosis; retrospective analysis of a personal study. Abstract P31, 3rd World Congress on Endometriosis, Brüssel 1992
- Cadigan K, Nusse R** (1998): Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-3305
- Cameron IT, Campbell S** (1998): Nitric oxide in the endometrium. *Hum Reprod Update* 4, 565-569
- Carpenter G** (1987): Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 56, 881-914
- Carpenter G, Cohen S** (1979): Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 48, 193-216
- Cary LA, Chang JF, Guan JL** (1996): Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci* 109, 1787-1794.

- Chang SE** (1986): In vitro transformation of human epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 823, 161-194
- Chang SY, Ho YS** (1997): Immunohistochemical analysis of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor I receptor and insulin-like growth factor II in endometriotic tissue and endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 76, 112-117
- Chegini N, Rossi MJ, Masterson BJ** (1992): Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF β -receptors in human endometrial tissue: localization and in vitro action. *Endocrinology* 130, 2373-2385
- Christensen B, Freie HM, Schindler AE** (1995): Endometriosis – diagnosis and therapy. Results of a current survey of 6700 gynecologists. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 55, 674-679
- Christofori G, Semb H** (1999): The role of the cell adhesion molecule E-cadherin as a tumour suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76
- Chu K, Zingg HH** (1997): The nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2 act as silencers of the human oxytocin gene promoter. *J Mol Endocrinol* 19, 163-172
- Chu K, Boutin JM, Breton C, Zingg HH** (1998): Nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2: presence in oxytocin-producing uterine cells and functional interaction with the oxytocin gene promoter. *Mol Cell Endocrinol* 137, 145-154
- Cirkel U, Ochs H, Mues B, Zwadlo G, Sorg C, Schneider HP** (1993): Inflammatory reaction in endometriotic tissue: an immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 48, 43-50
- Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR** (2000): Expression analysis with oligonucleotide microarray reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 97, 3260-3265
- Cook D, Fry M, Hughes K, Sumathipala R, Woodgett J, Dale T** (1996): Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J* 15, 4526-4536
- Copeland RA, Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto D, Pick S, Trzaskos JM** (1994): Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11202-11206
- Creus M, Balasch J, Ordi J, Fábregues F, Casamitjana R, Quinto L, Coutifaris C, Vanrell JA** (1998): Integrin expression in normal and out-of phase endometria. *Hum Reprod* 13, 3460-3468
- Cron RS, Gey G** (1927): The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 43, 645-647
- Curtis SW, Washburn T, Sewall C, Di Augustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS** (1996): Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: Estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12626-30
- Dale TC** (1998): Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329, 209-223
- Dedhar S** (1999): Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol* 6, 37-43

- Di Augustine RP, Petrusz P, Bell GI, Brown CF, Korach KS, McLachlan JA, Teng CT** (1988): Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 118, 138-142
- Dimri GP, Testori A, Acosta M, Campisi J** (1996): Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biol Signals* 5, 154-162
- DiZerega GS, Barber DL, Hadgen GD** (1980): Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation maintenance, and suppression. *Fertil Steril* 33, 649-653
- Dmowski WP, Cohen MR** (1978): Antigonadotropin (Danazol) in the treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 130, 41-48
- dos Reis RM, de Sa MF, de Moura MD, Nogueira AA, Ribeiro JU, Ramos ES, Ferriani RA** (1999): Familial risk among patients with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 16, 500-503
- Egan C, Jelsma TN, Howe JA, Bayley ST, Ferguson B, Branton PE** (1988): Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol Cell Biol* 8, 3955-3959
- Egan C, Bayley ST, Branton PE** (1989): Binding of the Rb1 protein to E1A products is required for adenovirus transformation. *Oncogene* 4, 383-388
- Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JMD, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, Karayiannakis AJ, Mortensen NJ McC., Kmiot W, Playford RJ, Pignatelli M, Bodmer WF** (1999): Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2316-2321
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz R** (1991): Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 7, 663-698
- Ewen ME, Xing Y, Bentley-Lawrence J, Livingston DM** (1991): Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66, 1155-1164
- Ewen ME, Faha B, Harlow E, Livingston DM** (1992): Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* 255, 85-87
- Fakih H, Baggett B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO** (1987): Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 47, 213-217
- Fanton JW, Goldon JG** (1991): Radiation-induced endometriosis in *Macaca mulatta*. *Radiat Res* 126, 141-146
- Fernandez-Shaw S, Hicks BR, Yudkin PL, Kennedy S, Barlow DH, Starkey PM** (1993): Anti-endometrial and anti-endothelial auto-antibodies in women with endometriosis. *Hum Reprod* 8, 310-315
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitmann ML** (1995): Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Friedman DJ, Ricciardi RP** (1988): Adenovirus type 12 E1A gene represses accumulation of MHC class I mRNA at the level of transcription. *Virology* 165, 303-305

- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W (1991):** E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113, 173-185
- Fujimori T, Takeichi M (1993):** Disruption of epithelioid cell-cell-adhesion by exogenous expression of a mutated nonfunctional N-cadherin. *Mol Biol Cell* 4, 37-47
- Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Tamaya T (1996):** Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol* 10, 187-191
- Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Tamaya T (1996b):** Expression of E-cadherin, alpha – and beta-catenin mRNAs in ovarian endometriosis. *Eur J Obstet Reprod Biol* 67, 179-183
- Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T (1999):** Expression of oestrogen receptor- alpha and –beta in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod* 5, 742-747
- Fujishita A, Nakane PK, Koji T, Masuzaki H, Chavez RO, Yamabe T, Ishimura T (1997):** Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil Steril* 67, 856-864
- Furchgott RF, Vanhoutte PM (1987):** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3, 2007-2018
- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A (1995):** Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 346, 1463-1464
- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A (1997):** Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol* 150, 461-467
- Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M, Cano A (1993):** Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 142, 987-993
- Garfield RE, Buhimschi I, Buhimschi C, Ali M, Saade G, Shi L, Shao-Ouig S, Chwalisz K (1997):** Regulation of uterine and cervical function by nitric oxide. In: Lancaster JR, Parkinson JF (Herausgeber) (1997): Nitric oxide, cytochromes P450, and sexual steroid hormones. Ernst Schering Research Foundation Workshop 21, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 61-73.
- Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP (1998):** Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 69, 1042-1047
- Gerzer R, Böhme E, Hofmann F, Schultz G (1981):** Soluble guanylate cyclase purified from bovine contains heme and copper. *FEBS Lett* 132, 71-74
- Giancotti FG, Ruoslati E (1999):** Integrin Signaling. *Science* 285, 1028-1032
- Giavazzi R, Chirivi RGS, Garofalo A, Rambaldi A, Hemingway I, Pigott R, Gearing AJ (1992):** Soluble intercellular adhesion molecule –1 is released by human melanoma cells and is associated with tumor growth in nude mice. *Cancer Res* 52, 2628-2630
- Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR (1993):** Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factor and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1115-1122

- Giudice LC, Tazuke SI, Swiersz L** (1998): Status of current research on endometriosis. *J reprod Med* 43, 252-262
- Goldstein S** (1990): Replicative senescence: the human fibroblasts comes of age. *Science* 249, 1129-1133
- Grosskinsky CM, Halme J** (1993): Endometriosis: the host response. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 7, 701-713
- Grümmer R, Schwarzer F, Balczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E** (eingereicht): Peritoneal endometriosis: validation of an in vitro model.
- Gui Y, Zhang J, Yuan L, Lessey BA** (1999): Regulation of HOXA-10 and its expression in normal and abnormal endometrium. *Mol Hum Reprod* 5, 866-873
- Hadfield R, Yudkin P, Coe C, Scheffler J, Uno H, Barlow DH, Kemnitz JW, Kennedy SH** (1997a): Risk factors for endometriosis in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*): A case control study. *Hum Reprod Update* 3, 109-115
- Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH** (1997b): Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril* 68, 941-942
- Haining REB, Cameron IT, van Papendorp C, Davenport AP, Prentice A, Thomas EJ, Smith SK** (1991): Epidermal growth factor in human endometrium: proliferative effects in culture and immunohistochemical localization in normal and endometriotic tissues. *Hum Reprod* 6, 1200-1205
- Halle JP, Müller S, Simm A, Adam G** (1997): Copy number, epigenetic state and expression of the rRNA genes in young and senescent rat embryo fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 74, 281-288
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF** (1984): Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64, 151
- Hamaguchi M, Matsuyoshi N, Ohnishi Y, Gotoh B, Takeichi M, Nagai Y** (1993): p60^{v-src} causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO* 12, 307-314
- Hansard LJ, Healy-Gardner BE, Drapkin AT, Bentley RC, McLachlan JA, Walmer DK** (1997): Human endometrial transforming growth factor- α : a transmembrane, surface epithelial protein that transiently disappears during the midsecretory phase of the menstrual cycle. *J Soc Gynecol Investig* 4, 160-166
- Harada M, Suganuma N, Furuhashi M, Nagasaka T, Nakashima N, Kikkawa F, Tomoda Y, Furui K** (1996): Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 2, 307-315
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW** (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC** (1990): Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 973-977
- Hayflick L** (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636
- Hayflick L, Moorhead PS** (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621

- Helftenbein G, Alvarez CV, Tuohimaa P, Beato M** (1993): Expression of epithelial phenotype is enhanced by v-Ha-ras in rat endometrial cells immortalized by SV40 T antigen. *Oncogene* 8, 2075-2085
- Hibi T, Fujisawa T, Kanai T, Akatsuka A, Habu S, Handa H, Tsuchiya M** (1991): Establishment of epithelial cell lines from human and mouse thymus immortalized by the 12S adenoviral E1a gene product. *Thymus* 18, 155-167
- Hornung D, Ryan IP, Chao VA, Vigne JL, Schriock ED, Taylor RN** (1997): Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1621-1628
- Horowitz GM, Scott RT Jr, Drews MR, Navot D, Hofmann GE** (1993): Immunohistochemical localization of transforming growth factor-alpha in human endometrium, decidua, and trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab* 3, 786-792
- Houweling A, van den Elsen PJ, Van der Eb AJ** (1980): Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* 105, 537-550
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL** (1998): Integrin signalling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* 10, 220-231
- Huang P L, Dawson T D, Bredt D S, Snyder S H, Fishman M C** (1993): Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273-1286.
- Huang JC, Yeh J** (1994): Quantitative analysis of epidermal growth factor receptor expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1097-1101
- Huang JC, Liu DY, Yadollahi S, Wu KK, Dawood MY** (1998): Interleukin-1 beta induces cyclooxygenase-2 gene expression in cultured endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 538-541
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R** (1996): Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10
- Hyder SM, Shipley GL, Stancel GM** (1995): Estrogen action in target cells: selective requirements for activation of different hormone response elements. *Mol Cell Endocrinol* 112, 35-43
- Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS** (1992): Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4658-4662
- Imai T, Kurachi H, Adachi K, Adachi H, Yoshimoto Y, Homma H, Tadokoro C, Takeda S, Yamagushi M, Sakata M, Sakoyama Y, Miyake A** (1995): Changes in epidermal growth factor receptor and the level of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. *Biol Reprod* 52, 928-938
- Inoue T, Kanzaki H, Imai K, Narukawa S, Higuchi T, Katsuragawa H, Mori T** (1994): Tumor necrosis factor α inhibits in-vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 9, 2411-2417
- Irwin JCM, Utian WH, Eckert RL** (1991): Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 129, 2385-2392
- Irwin JC, de las Fuentes L, Giudice LC** (1994): Growth factors and decidualization in vitro. *Ann NY Acad Sci* 734, 7-18

- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Boguski M, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO** (1999): The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 283, 83-87
- Jahn E, Classen-Linke I, Kusche M, Beier HM, Traub O, Grümmer R, Winterhager E** (1995): Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 10, 2666-2670
- Javert CT** (1949): Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis. *Cancer* 2, 399-410
- Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ, Watson RH, Englefield P, Thomas EJ, Campbell IG** (1996): Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res* 56, 3534-3539
- Jochensen AG, Daniels GSG, Hertoghs JJL, Schrier PI, van den Elsen PJ, Van der Eb AJ** (1982): Identification of adenovirus-type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis. *Virology* 122, 15-28
- Johnson JP** (1991): Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metast Rev* 10, 11-22
- Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G** (1989): De novo expression of intercellular-adhesion molecule-1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 641-644
- Johnston WIH** (1976): Dydrogesteron and endometriosis. *Br J Obstet Gynecol* 83, 77-80
- Jones RL, Kelly RW, Critchley HO** (1997): Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod* 12, 1300-1306
- Jones RK, Bulmer JN, Searle RF** (1995): Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. *Hum Reprod* 1, 3272-3279
- Jones RK, Searle RF, Bulmer JN** (1998): Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 13, 3496-3502
- Jürgensen A, Mettler L, Volkov NI, Parwaresch R** (1996): Proliferative activity of the endometrium throughout the menstrual cycle in infertile women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 66, 369-375
- Kanner J, Harel S, Granit R** (1991): Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 289, 130-136
- Kemler R** (1993): From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *TIG* 9, 317-321
- Kemler R, Ozawa M, Ringwald M** (1989): Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1, 892-897
- Kennedy S** (1997): Is there a genetic basis to endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol* 15, 309-318
- Kennedy S** (1998): The genetics of endometriosis. *J Reprod Med* 43, 263-268
- Kennedy S, Mardon H, Barlow D** (1995): Familial endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 12, 32-34

- Kennedy SH, Starkey PM, Sargent IL, Hicks BR, Barlow DH** (1990a): Localization of anti-endometrial antibody binding in women with endometriosis using a double labelling immunohistochemical method. *Br J Obstet Gynaecol* 97, 671-674
- Kennedy SH, Starkey PM, Sargent IL, Hicks BR, Barlow DH** (1990b): Anti- endometrial antibodies in endometriosis measured by an enzyme –linked immuno-absorbent assay before and after treatment with danazol and nafarelin. *Obstet Gynecol* 75, 914-918
- Khorram O, Taylor R, Ryan IP, Schall T, Landers D** (1993): Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 169, 1545-1549
- Kim JG, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Moon SY, Lee JY** (2000): Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP-3 protease activity in the peritoneal fluid of patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 73, 996-1000
- Kintner C** (1992): Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* 69, 225-236
- Kistner RW** (1979): Endometriosis and Infertility. *Clin Ostet Gynecol* 22, 101.
- Klein NA, Dey TD, Montoya IA, Schenken RS** (1992): Proliferative activity of endometrial and resident lymphoid cells in endometriosis. Present at the 48th Annual Meeting of American Fertility Society. New Orleans, LA, USA, 2-5 November 1992, Abstract P-059
- Klingensmith J, Nusse R, Perrimon N** (1994): The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* 273, 10823-10826
- Knapp VJ** (1999): How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertil Steril* 72, 10-14
- Knowles R G, Moncada S** (1994): Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.
- Ko Y, Choi I, Green ML, Simmen FA, Simmen RC** (1994): Transient expression of the cytochrome P450 aromatase gene in elongated porcine blastocysts is correlated with uterine insuline-like growth factor levels during peri-implantation development. *Mol Reprod Dev* 37, 1-11
- Koninckx PR, Braet P, Kennedy SH, Barlow DH** (1994): Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Hum Reprod* 9, 1001-1002
- Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH** (1998): Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 4, 741-751
- Krussel JS, Casan EM, Raga F, Hirchenhain J, Wen Y, Huang HY, Bielfeld P, Polan ML** (1999): Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor transmembraneous receptors Flt1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium. *Mol Hum Reprod* (5), 452-458
- Kuhn W, Staemmler HJ, Neckel E** (1981): Endometriosis--implantation or metaplasie ? *Geburtshilfe Frauenheilkd* 41, 698-701
- Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R** (1994): E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoctoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8263-8267
- Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H** (1990): Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelial from mesothelia. *J Clin Pathol* 43, 213-219

- Ledger WL** (1999): Endometriosis and infertility: an integrated approach. *Int J Gynaecol Obstet* 64, 33-40
- Lessey BA, Metzger DA, Haney AF, McCarty KS Jr** (1989): Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy. *Fertil Steril* 51, 409-415
- Lessey BA, Castlebaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J** (1994): Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 62, 497-506
- Lessey BA, Castlebaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL** (1994b): Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 643-649
- Lessey BA, Castlebaum AJ, Sawin SJ, Sun J** (1995): Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fert Steril* 63, 535, 542
- Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE, Chwalisz K** (1996): Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implication for implantation, contraception, and infertility. *AJRI* 35, 195-204
- Leyendecker G, Wildt L, Plath T, Kunz G** (1995): Endometriose - ein neues Modell ihrer Entstehung. In: *Der Frauenarzt, Endometriose*. Schweppe KW, Schindler AE, Semm K, Runnebaum B (eds) Demeter Verlag, Balingen, Germany, pp. 8-13.
- Leyendecker G, Kunz G, Wildt L, Beil D, Deininger H** (1996): Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunction of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod* 11, 1542-1551
- Li SF, Nakayama K, Masuzana H, Fujii S** (1993): The number of proliferating cell nuclear antigen positive cells in endometriotic lesions differs from the endometrium. *Virchows Arch Abt A* 423, 257-263
- Lim H, Paria B C, Das S K** (1997): Multiple female reproductive failure in cyclooxygenase 2 deficient mice. *Cell* 91, 197-208
- Liszcak TM, Richardson GS, MacLaughlin DT, Kornblith PL** (1977): Ultrastructure of human endometrial epithelium in monolayer culture with and without steroid hormones. *In Vitro* 13, 344-356
- Liu DT, Hitchcock A** (1986): Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 93, 859-862,
- MacKenzie WF, Casey HW** (1975): Animal model of human disease. Endometriosis. Animal model: Endometriosis in rhesus monkeys. *Am J Pathol* 80, 341-344
- Magness RR** (1991): Endothelium-derived vasoactive substances and uterine blood vessels. In: Chaudhuri G, Ignarro LJ, McNellis D (Herausgeber) (1991): *National Institutes of Health Symposium, Seminars in Perinatology*, Philadelphia, WB Saunders Co. 139, 765-771
- Mahboubi S, Rostain A** (1987): Computed tomography finding in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome associated with endometriosis: a case report. *J Comput Tomogr* 11, 301-302
- Malik E, Mangold R, Rossmanith WG** (1997): Laparoscopic extirpation of an aplastic ectopic uterus in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Hum Reprod* 12, 1298-1299

- Malinak LR, Hofstadter A, Del Junco DJ** (1992): Recurrence of endometriosis after combined GnRH-agonist surgical therapy. Anstract P20, 3rd World Congress on Endometriosis, Brüssel 1992
- Marions L, Danielsson KG** (1999): Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* 5, 961-965
- Marquart H, Hunkapillar MW, Hood LE, Twardzik DR, DeLarco JE, Stevenson JR, Todaro GJ** (1983): Transforming growth factors produced by retrovirus transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells. Amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 4684-4688
- Masferrer JL, Seibert K** (1994): Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor* 94, 25-30
- Matsuyoshi N, Hamguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi** (1992): Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 118, 703-714
- Matthews CJ, Redfern CPF, Hirst BH, Thomas EJ** (1992): Characterization of human purified epithelial and stroma cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril* 57, 990-997
- Mayani A, Barel S, Soback S, Almagor M**(1997): Dioxin concentration in women with endometriosis. *Hum Reprod* 12, 373-375
- Mayer B, Johnson JP, Leiti F, Jauch KW, Heiss MM, Schildberg FW, Birchmeier W, Funke I** (1993): E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 53, 1690-1695
- McCullagh, Nelder** (1989): *Generalized Linear Models*. 2. Auflage, Chapman and Hall, UK, 124-125
- Mc Natty KP, Heath DA, Henderson KM, Lun S, Hurst PR, Ellis LM, Montgomery OW, Morrison L, Thurley DC** (1984): Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 72, 39-53
- Meduri G, Bausero P, Perrot-Appianat M** (2000): Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 62, 439-447
- Merviel P, Degeorges A, Salat-Baroux J, Calvo F** (1994): Normal human endometrial cells in culture: Characterization and immortalization of epithelial and stromal cells by SV 40 large T antigen. *Biol Cell* 80, 187-193
- Meyer R** (1919): Über den Stand der Frage Adenomyositis und Adenomatome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis serosoepithelialis und Adenomyometritis sacromatosa. *Zbl f Gynäk* 43, 745-750
- Miller J, Moon R** (1996): Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Gene Dev* 10, 2527-2539
- Miyazaki M, Mihara K, Bai L, Kano Y, Tsuboi S, Endo A, Seshimo K, Yoshioka T, Namba M** (1993): Immortalization of epithelial-like cells from human liver tissue with SV40 T-Antigen gene. *Exp Cell Res* 206, 27-35
- Miyazawa K** (1976): Incidence of endometriosis among Japanese women. *Obstet Gynecol* 48, 407-409

- Moen MH** (1994): Endometriosis in monozygotic twins. *Acta Obstet Gynecol Scand* 73, 59-62.
- Moen MH, Magnus P** (1993): The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72, 560-564
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H** (1996): XTCTF-3 transcription factor mediates β -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-399
- Moncada S** (1992): The L-arginine:nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145, 201-227
- Moncada S, Higgs A** (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 329, 2002-2012
- Moran E, Mathwes MB** (1987): Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene. *Cell* 48, 177-178
- Morgenstern JP und Land H** (1990): Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Research* 18, 3587-3596
- Mori H, Sawairi M, Nakagawa M, Itoh N, Wada K, Tamaya T** (1991): Peritoneal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease. *Am J Reprod Immunol* 26, 62-67
- Mukai N, Kobayashi S** (1972): Indifferentiated intraperitoneal tumors induced by human adenovirus type 12 in hamsters. *Am J Pathol* 69, 331-348
- Mukku VR, Stancel GM** (1985): Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J Biol Chem* 260, 9820-9824
- Mulligan MS, Moncada S, Ward PA** (1992): Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase in immun complex-induced vasculitis. *Br J Pharmacol* 107, 1159-1162
- Miyazaki M, Mihara K, Bai L, Kano Y, Tsuboi S, Endo A, Seshimo K, Yoshioka T, Namba M** (1993): Immortalization of epithelial-like cells from human liver tissue with SV40 T-antigen gene. *Exp Cell Res* 206, 27-35
- Nagafuchi A, Takeichi M** (1988): Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7, 3679-3684
- Nathan C** (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051-3064
- Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA** (1991): Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 21-25
- Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetke NC, Bossert NL, Ross K, Eitzman BE, McLachlan JA** (1992): Transforming growth factor- α is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 131, 1657-1664
- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS** (2000): The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* 6, 149-159
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Wyns C, de Menten Y, Mathieu PE, Donnez J** (1994): Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: a new quantitative method. *Fertil Steril* 62, 751-759

- Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J** (1997): Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 68, 912-919
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Marbaix E, Jadoul P, Donnez J** (2000): Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Hum Reprod* 15, 572-577
- Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE** (1996): Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 174-179
- Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S** (1998): Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and β -catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4374-4379
- Novak E** (1931): Pelvic endometriosis. *Am J Gynecol* 22, 826-837
- Odukoya OA, Wheateroft N, Weetman AP, Cook ID** (1995): The prevalence of endometrial immunoglobulin G antibodies in patients with endometriosis. *Hum Reprod* 10, 1214-1219
- Oral E, Olive D, Arici A** (1996): The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 2, 385-398
- Osten KG, Hil GA, Hargrove JT und Gorstein F** (1989): Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens. *Fertil Steril* 52, 965-972
- Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T** (1998): Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril* 69, 303-308
- Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T** (1999): Endometriosis and free radicals. *Gynecol Obstet Invest* 48, 29-35
- Overton CE, Barlow DH, Fernandez-Shaw S, Starkley P, Hicks B** (1997): In vitro culture endometrial stroma and gland cells as a model for endometriosis: the effect of peritoneal fluid on proliferation. *Fertil Steril* 67, 51-56
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R** (1989): The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8, 1711-1717
- Ozawa M, Engel J, Kemler R** (1990): Single amino acid substitutions in one Ca^{2+} -binding site of uvomorulin abolished the adhesive function. *Cell* 63, 1033-1038
- Ozer HL** (2000): SV40-mediated immortalization. In: Macieira-Coelho A (Ed.) (2000): *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 24, 119-153; Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Padwick ML, Whitehead M, King RJ** (1994): Hormonal regulation of HSP27 expression in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 102, 9-14
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S** (1987): Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526
- Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P** (1996): Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol* 16, 2128-2134

- Parkinson JF** (1997): Nitric oxide synthase isoforms and nitric oxide biosynthesis. In: Lancaster JR, Parkinson JF (Herausgeber) (1997): Nitric oxide, cytochromes P450, and sexual steroid hormones. Ernst Schering Research Foundation Workshop 21, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1-25.
- Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Kloppel G, Lemoine NR** (1994): Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* 174, 243-248
- Porfiri E, Rubinfeld B, Albert I, Hovanes K, Waterman M, Polakis P** (1998): Induction of a beta-catenin-LEF-1 complex by Wnt-1 and transformation mutants of beta-catenin. *Oncogene* 15, 2833-2839
- Prentice A., Randall BJ, Weddell A, McGill A, Henry L, Horne CH, Thomas EJ** (1992): Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: endometrium and peritoneal mesothelium. *Hum Reprod* 7, 1318-1325
- Prentice A., Thomas EJ, Weddell A, McGill A, Randall BJ, Horne CH** (1992b): Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: an immunohistochemical study. *Br J Obstet Gynaecol* 99, 395-398
- Price T, Aitken J, Simpson ER** (1992): Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissue as determined by competitive polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 879-883
- Raff MC** (1992): Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400
- Rai V, Hopkisson J, Kennedy SH, Bergqvist A, Barlow DH, Mardon HJ** (1996): Integrins alpha 3 and alpha 6 are differentially expressed in endometrium and endometriosis. *J Pathol* 180, 181-187
- Reddle RR, De Silva R, Duncan EL, Rogan EM, Whitaker NJ, Zahra DG, Ke Y, McMenamin MG, Gerwin BI, Harris CC** (1995): SV40-induced immortalization and ras-transformation of human bronchial epithelial cells. *Int J Cancer* 61, 199-205
- Reddy VB, Thimmappaya B, Dhar R, Subramaniam KN, Zain BS, Pan J, Ghosh PK, Celma ML, Weissmann SM** (1978): The genome of simian virus 40. *Science* 200, 494-502
- Regidor PA, Regidor M, Schindler AE, Winterhager E** (1997): Aberrant expression pattern of gap junction connexins in endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 3, 375-381
- Regidor PA, Vogel C, Regidor M, Schindler AE, Winterhager E** (1998): Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium. *Hum Reprod Update* 4, 710-718
- Richard S, Zingg HH** (1990): The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem* 265, 6098-6103
- Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL** (1993): Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorobenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 21, 433-441
- Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C** (1995): A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 855-859
- Rinehart CA, Laundon CH, Mayben JP, Lyn-Cook BD, Kaufman DG** (1993): Conditional immortalization of human endometrial stromal cells with a temperature-sensitive simian virus 40. *Carcinogenesis* 14, 993-999

- Roe S, Koslov ER, Rimm DL** (1998): A mutation in α -catenins disrupts adhesion in clone cells without perturbing its actin and β -catenin binding activity. *Cell Adhesion & Communication* 5, 283-296
- Roy RN, Gerulath AH, Cecutti A, Bhavnani BR** (1999): Discordant expression of insulin-like growth factors and their receptor messenger ribonucleic acids in endometrial carcinomas relative to normal endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 153, 19-27
- Ruley HE** (1983): Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304, 602-606
- Rutanen EM** (1998): Insulin-like growth factors in endometrial function. *Gynecol Endocrinol* 12, 399-406
- Ryan KJ** (1959). Biological aromatization of steroids. *J Biol Chem* 234, 268-272
- Sack GH** (1981): Human cell transformation by Simian Virus 40- a review. *In Vitro* 17, 1-19
- Salvemini D** (1997): Nitric oxide and cyclooxygenases. In: Lancaster JR, Parkinson JF (Herausgeber) (1997): Nitric oxide, cytochrome P450, and sexual steroid hormones. Ernst Schering Research Foundation Workshop 21, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 61-73.
- Salvemini D, Misko T P, Maferrer J L, Seibert K, Currie M G, Needleman P** (1993): Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7240-7244
- Sampson JA** (1921): Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary, their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type. *Arch Surg* 3, 245-323
- Sangi Haghpeykar H, Poindexter AN** (1995): Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol* 85, 983-992
- Satokata I, Benson G, Maas R** (1995) Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa-deficient mice. *Nature* 374, 460-463.
- Satyaswaroop PG, Bressler RS, De La Pena MM, Gurpide E** (1979): Isolation and culture of human endometrial glands. *J Clin Endocrinol Metab* 48, 639-641
- Sbracia M, Zupi E, Alo P, Manna C, Marconi D, Scarpellini F, Grasso JA, Di Tondo U, Romanini C** (1997): Differential expression of IGF-I and IGF-II in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis and in women without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 37, 326-329
- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parson JT** (1995): Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 130, 1181-1187
- Schindler AE** (1995): Endometriose und Fertilitätsstörungen. *Der Frauenarzt* 2: 211-214.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J** (1993): The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123, 513-522
- Schmeißer JO, Krausen T, Lober R, Köhler G** (1996): Zusammenhänge zwischen Endometriose und Tubendurchgängigkeit bei Sterilitätspatientinnen insbesondere nach mikrochirurgischer Sterilitätsoperation. *Zentralbl Gynakol* 118, 397-400

- Schmidt M, Regidor PA, Engel K, Regidor M, Winterhager E, Scotti S, Schindler AE** (2000): E- and P-selectin expression in endometriotic tissues and the corresponding endometria. *Gynecol Endocrinol* 14, 111-117
- Schuermann M** (1990): An expression vector system for stable expression of oncogenes. *Nucleic Acids Research* 18, 4945-4946
- Schweppe KW, Wynn RM** (1984): Endocrine dependency of endometriosis: an ultrastructural study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 17, 193
- Schweppe KW** (1987): Therapieerfolge und Rezidivrate nach Endometriosebehandlung mit Danazol. *Endometriose* 5, 4-12
- Schweppe KW** (1989): Aetiologie, Histologie und Pathophysiologie der Endometriose. In: Endometriose- neue Therapiemöglichkeiten durch Buserelin. Schindler AE, Schweppe KW (eds), de Gruyter, Berlin, pp.3-22
- Schweppe KW, Dmowski WP, Rolland R** (1990): Endometriose, Pathophysiologie, Klinik und neue Behandlungsmöglichkeiten. *Aktuelles Wissen Hoechst*. Hoechst, Frankfurt am Main p. 26.
- Scotti S, Regidor P-A, Schindler AE, Winterhager E** (2000): Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 6, 610-617
- Semm K** (1983): Endoscopic Endometriosis Classification (EEC). Frauenklinik der Universität Kiel.
- Shiokawa S, Yoshimura Y, Nagamatsu S, Sawa H, Hanashi H, Koyama N, Katsumata Y, Nagai A, Nakamura Y** (1996): Function of beta 1 integrins on human decidua cells during implantation. *Biol Reprod* 54, 745-752
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A** (1999): The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5522-5527
- Sierra F, Fey GH, Guigoz Y** (1989): T-kininogen gene expression is induced during aging. *Mol Cell Biol* 9, 5610-5616
- Silver RM, Edwin SS, Trautmann MS, Simmons DL, Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD** (1995): Bacterial lipopolysaccharid-mediated fetal death: production of a newly recognized form of inducible cyclooxygenase (COX-2) in murine decidua in response to lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95, 725-731
- Simmons DL** (1995): The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surv* 24, 141-155
- Simons JWIM, van den Broek C** (1970): Comparison of ageing in vitro and ageing in vivo by means of cell size analysis using a coulter counter. *Gerontology* 16, 340-351
- Smith SK** (1994): Growth factors in the human endometrium. *Hum Reprod* 9, 936-946
- Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B, Guarneri D, Busacca M, Vignali M** (1996): Human endometrial stromal cells as a source of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 molecules. *Hum Reprod* 11, 1190-1194
- Starzinski-Powitz A, Gaetje R, Zeitvogel A, Kotzian S, Handrow-Metzmacher H, Herrmann G, Fanning E, Baumann R** (1998): Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Hum Reprod Update* 4, 724-729.

- Starzinski-Powitz A, Handrow-Metzmacher H, Kotzian S** (1999): The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumor metastasis? *Mol Med Today* 5, 304-309
- Sterner-Kock A, Braun RK, Schrenzel MD, Hyde DM** (1996): Recombinant tumor necrosis factor-alpha and platelet-activated factor synergistically increase intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin-dependent neutrophil adherence to endothelium in vitro. *Immunology* 87, 454-460
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A** (1994): Expression of adhesion molecules in human endometrial vasculature throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1024-1032
- Tabibzadeh S, Babaknia A, Kong QF, Zupi E, Marconi D, Romanini C, Satyaswaroop PG** (1995): Menstruation is associated with disordered expression of desmoplakin I/II and cadherin/catenins and conversion of F- to G-actin in endometrial epithelium. *Hum Reprod* 10, 776-784
- Tabibzadeh S, Kong QF, Satyaswaroop PG, Babaknia A** (1996): Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 11, 633-640
- Tabibzadeh S, Broome J** (1999): Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Infect Dis Obstet Gynecol* 7, 5-9
- Taga M, Saji M, Suyama K, Minaguchi H** (1996): Transforming growth factor-alpha, like epidermal growth factor, stimulates cell proliferation and inhibits prolactin secretion in the human decidual cells in vitro. *J Endocrinol Invest* 19, 659-662
- Takeichi M** (1994): The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neotrogenesis. *Prog Clin Biol Res* 390, 145-153
- Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P** (1998): HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in human endometrium. *J Clin Invest* 101, 1379-1384
- Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A** (1999): HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 14, 1328-1331
- Telfer JF, Irvine GA, Kohnen G, Campbell S, Cameron IT** (1997): Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium. *Mol Hum Reprod* 3, 69-75
- Theisen H, Purcell J, Bennett M, Kansagara D, Syed A, Marsh J** (1994): Dishevelled is required during wingless signaling to establish both cell polarity and cell identity. *Development* 120, 347-360
- Thomson AJ, Greer MR, Young A, Boswell F, Telfer JF, Cameron IT, Norman JE, Campbell S** (1999): Expression on intercellular adhesion molecule ICAM-1 and ICAM-2 in human endometrium: regulation by interferon-gamma. *Mol Hum Reprod* 5, 64-70
- Trent JM, Davis JR, Payne JM** (1980): The establishment and morphologic characterization of finite cell lines from normal human endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 136, 352-362
- Troche V, O'Connor DM, Schaudies RP** (1991): Measurement of human epidermal growth factor receptor in the endometrium during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 165, 1499-1503
- Tschugguel E, Schneeberger C, Unfried G, Czerwenka K, Weninger W, Mildner M, Bishop JR, Huber JC** (1998): Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium. *Hum Reprod* 13, 436-444

- Tschugguel E, Schneeberger C, Unfried G, Brautigam G, Wiesner F, Czerwenka K, Vytiska-Binstorfer E, Kurz C, Weninger W, Mildner M, Waselmayr B, Bursch W, Kaidler A, Waldhor T, Breitschopf H, Ellinger A, Huber JC (1998b):** The role of nitric oxide in reproduction. *Gynecol Geburtshilfliche Rundsch* 38, 44-46.
- Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN (1996):** Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stroma cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1118-1122
- Tseng L, Zhang J, Peresleni TY, Goligorsky MS (1996):** Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial glands of human endometrium. *J Soc Gynecol Invest* 3, 33-38
- Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN (1998):** Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93, 705-716
- Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB (1992):** Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 52, 5104-5109
- Van der Linden PQJ, de Goeij AFPM, Dunselmann GAJ, van der Linden EPM, Ramaekers FCS, Evers JLH (1994):** Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril* 61, 85-90
- Van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselmann GA, Erkens HW, Evers JL (1995):** Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril* 63, 1210-1216
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998):** Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 97-120
- van Voorhis BJ und Stovall DW (1997):** Autoantibodies and infertility: a review of the literature. *J Reprod Immunol* 33, 239-256
- Varma VA, Melin SA, Adamec TA, Dorman BH, Siegfried JM, Walton LA, Carney CN, Norton CR, Kaufman DG (1982):** Monolayer culture of human endometrium: Methods of culture and identification of cell types. *In Vitro* 18, 911-918
- Vasavada R, Eager KB, Barbanti Brodano G, Caputo A, Ricciardi RP (1986):** Adenovirus type 12 early region E1A proteins repress class I HLA expression in transformed human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5257-5261
- Vaziri H, Schächter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB (1993):** Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 52, 661-667
- Vigano P, Pardi R, Margi B, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M (1994):** Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on cultured human endometrial stromal cells and its role in the interaction with natural killers. *Am J Reprod Immunol* 33, 47-53
- Vigano P, Gaffuri B, Somigliana E, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M (1998):** Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod* 4, 1150-1156
- Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M Jr, Fiers W, van Roy F (1991):** Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119

- von Rokitsansky C** (1860): Ueber Uterusdrusen-Neubildung in Uterus und Ovarilsarcomen. Z Gesellschaft Aerzte Wien 37, 577-593
- Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR** (1988): Patterns of cell death. Meth Archiev Exp Pathol 13, 18-54
- Waller KG, Shaw RW** (1993): Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of women with symptomatic endometriosis. I. efficacy results. Am J Obstet Gynecol 167, 1367-1371
- Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dadhar S, Briand P, Lupu R, Bissell MJ** (1998): Reciprocal interactions between β_1 -integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: A different perspective in epithelial biology. Proc Natl Acad Sci 95, 14821-14826
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Oullette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB** (1997): Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. Nature Genetics 17, 498-502
- Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E** (1988): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind the retinoblastoma gene product. Nature 334, 124-129
- Whyte P, Williamson NM, Harlow E** (1989): Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. Cell 56, 67-75
- Wiehle RD, Helftenbein G, Land H, Neumann K, Beato M** (1990): Establishment of rat endometrial cell lines by retroviral mediated transfer of immortalizing and transforming oncogenes. Oncogene 5, 787-794
- Wild RA, Hirisave V, Podczaski ES, Coulam C, Shivers CA, Satyaswaroop PG** (1991): Autoantibodies associated with endometriosis: can their detection predict presence of the disease? Obstet Gynaecol 77, 927-931
- Wild RA, Satyaswaroop PG, Shivers AC** (1987): Epithelial localization of antiendometrial antibodies associated with endometriosis. Am J Reprod Immunol Microbiol 13, 62-65
- Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PA** (1995): Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. Fertil Stril 64, 340-346
- Woodgett J** (1994): Regulation and function of the glycogen synthase kinase-3 subfamily. Semin Cancer Biol 5, 269-275
- Wright WE und Shay JW** (1992): Telomere positional effects and the regulation of cellulare senescence. Trends genet 8, 193-197
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR** (1980): Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68, 251-306
- Wynford-Thomas D** (1996): Telomeres, p53 and cellular senescence. Oncology Res. 8, 387-398
- Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM** (1998): The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. J Cell Biol 141, 779-789

Yoshimura Y, Shiokawa S, Nagamatsu S, Hanashi H, Sawa H, Koyama N, Katsumata Y, Kakamura Y (1995): Effects of beta-1 integrins in the process of implantation. *Horm Res* 44, 36-41

Yoshimura Y, Miyakoshi K, Hamatani T, Iwahashi K, Takahashi J, Kobayashi N, Sueoka K, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M (1998): Role of beta 1 integrins in human endometrium and decidua during implantation. *Horm Res* 50, 46-55

Zhang Y, Dufau ML (2000): Nuclear orphan receptors regulate transcription of the gene for the human luteinizing hormone receptor. *J Biol Chem* 275, 2763-2770

Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, Bondy CA (1994): Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1723-1734

Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T (1998): Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: Global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci* 95, 14470-14475

Zorn JR (1990): Medical treatment of endometriosis. *Rev Prat* 40, 1097-1099

9 Anhang

Tab. 14: Serumhormonwerte der Patientinnen, deren Endometrien für die cDNA-Expressionsanalysen verwendet wurden

	E ₂ [pg/ml]	P [ng/ml]	LH [mU/ml]	FSH [mU/ml]
En9	81,91	0,52	7,81	4,26
En10	38,37	0,37	2,97	5,16
En25	39,67	0,60	5,40	4,43
En44	34,73	0,20	4,64	5,49
EnEMT10	86,68	0,26	5,35	4,88
EnEMT31	64,48	0,26	8,42	4,99
EnEMT34	24,09	0,49	0,88	2,36

Tab. 15: Serumhormonwerte der Patientinnen, deren Endometrien für die semiquantitative RT-PCR verwendet wurden

	E ₂ [pg/ml]	P [ng/ml]	LH [mU/ml]	FSH [mU/ml]
En56	14,84	0,61	6,59	12,15
EnEMT20	13,34	0,55	1,02	4,16
En49	43,73	0,23	9,21	6,65
EnEMT18	36,09	1,00	11,10	6,07
En44	34,73	0,20	4,64	5,49
EnEMT52	25,16	0,23	6,82	5,8
En55	82,86	0,38	1,62	7,01
EnEMT55	72,91	0,58	7,33	4,34
En33	52,02	0,20	4,77	8,79
EnEMT28	76,09	0,28	6,56	5,03
En25	39,67	0,60	5,40	4,43
EnEMT34	24,09	0,49	0,88	2,36

Tab. 16: Expressionsprofil des humanen Endometriums ermittelt mit Hilfe des „Atlas Human cDNA Expression Array“ (Clontech)

	Gen-/Proteinbezeichnung	Genbank
	<u>Onkogene / Tumorsuppressoren</u>	
A1a	c-myc oncogene	V00568
A1e	transforming growth factor beta receptor III precursor (TGF beta receptor III; TGFR3); betaglycan	L07594
A1f	B-myb	X13293
A1h	v-erbA related protein (EAR2)	X12794
A1i	v-erbA related protein (EAR3); COUP transcription factor (COUP-TF)	X12795;
A1l	c-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1	J04111
A2b	insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	M35410
A2d	tyrosine-protein kinase receptor tyro3 precursor; rse; sky; dtk	D17517
A2c	vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1); tyrosine-protein kinase receptor flt + soluble VEGFR; tyrosine-protein kinase receptor SFLT	X51602;U01134
A3a	ski oncogene	X15218
A3f	proto-oncogene tyrosine-protein kinase abl; p150; c-abl	M14752; 14753
A3i	transforming protein rhoA H12 (RHO12; ARH12; ARHA)	L25080
A3j	shb proto-oncogene	X75342
A4e	fos-related antigen 2 (FRA2)	X16706
A4f	fos-related antigen (FRA1)	X16707
A4g	ezrin; cytovillin 2; villin 2 (VIL2)	X51521
A4h	jun-D	X56681
A4i	c-src kinase (CSK); protein-tyrosine kinase cpl	X59932
A4j	ETS oncogene (PEP1)	L16464
A4k	EB1 protein	U24166

	Gen-/Proteinbezeichnung	Genbank
A4m	transforming growth factor-beta signaling protein 1 (BSP1); mothers against dpp homolog (MAD); MADR1; MSMAD1	U57456
A4n	neogenin	U61262
	<u>Zellzyklusproteine</u>	
A5c	tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor; axl oncogene	M76125
A5e	DNA-binding protein inhibitor ID-1; Id-1H	D13889
A5f	early response protein NAK1; TR3 orphan receptor	L13740
A5g	cdc2-related protein kinase PISSLRE	L33264
A5h	prothymosin alpha (ProT-alpha; PTMA)	M26708
A5i	40S ribosomal protein S19 (RPS19)	M81757
A5n	p55CDC	U05340
A6b	<i>proliferating cell nucleolar antigen P120; NOL1</i>	X55504
A6h	G1/S-specific cyclin D2 (CCND2) + KIAK0002	M90813;
A7c	cyclin A1 (CCNA1)	U66838
A7e	transducer of erbB2 (TOB)	D38305
A7g	CDC-like kinase 3 (CLK3)	L29220
A7h	CDC-like kinase 1 (CLK1)	L29222
A7j	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (CDKN1C); p57-KIP2	U22398
A7k	erythrocyte urea transporter (UTE; UT1); SLC14A1; HUT11; RACH1	U35735
A7m	CDC25B; CDC25HU2; M-phase inducer phosphatase 2	M81934;
	<u>Ionenkanäle</u>	
B1c	dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel beta-3 subunit (CAB3A/CAB3B); CACNLB3	U07139
	<u>Modulatoren / Effektoren / Intrazelluläre Mediatoren</u>	
B1f	thrombin receptor (TR); F2R; PAR1	M62424
B1g	tyrosine kinase receptor tie-1 precursor	X60957;
B1k	ephrin type-B receptor 3 precursor; tyrosine-protein kinase receptor HEK-2	X75208
B1l	neurotrophic tyrosine kinase receptor-related 3; TKT precursor	X74764
B1n	ephrin type-A receptor 1 precursor; tyrosine-protein kinase receptor eph	M18391
B2a	urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form precursor (U-PAR); monocyte activation antigen MO3; CD87	U08839;
B2c	protein-tyrosine phosphatase gamma precursor (R-PTP-gamma)	L09247
B2i	protein kinase C delta (NPKC-delta)	D10495
B2m	focal adhesion kinase (FADK); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)	L13616
B2n	tyrosine-protein kinase ack	L13738
B3a	NF-kappaB transcription factor p65 subunit; RELA; NFkB3	L19067
B3f	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV catalytic subunit (CAMK IV); CAM kinase-GR	L24959
B3h	protein kinase MLK-3; sprk	L32976
B3j	protein kinase C alpha polypeptide (PKC-alpha; PKCA)	M22199
B4c	cAMP response element binding protein (CRE-BP1); transcription factor ATF2; HB16	M31630
B4d	cAMP-response element binding protein (CREB)	M34356
B4e	guanine nucleotide-binding protein G-i/G-s/G-t beta subunit 2; transducin beta 2 subunit 2	M36429
B4f	guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) beta subunit 1 (GNB1); transducin beta-1 subunit	M36430
B4g	neuro epithelioma transforming gene 1 (NEP1; NET1); guanine nucleotide regulatory protein	U02081
B4i	dioxin-inducible cytochrome P450 1B1 (CYP1B1)	U03688
B4l	epidermal growth factor receptor substrate 15 (EPS15); AF-1P protein	U07707;
B4m	serine kinase	U09564
B5a	signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6); IL-4 STAT	U16031
B5b	macMARCKS; MARCKS-related protein (MRP); MLP	X70326
B5c	epithelial discoidin domain receptor 1 precursor (EDDR1; DDR1); cell adhesion kinase (CAK); TRKE; RTK6	X74979
B5f	mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38); cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein (CSAID MAX-interacting protein 2 (MXI2)	L35253; L35263
B5g	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MAP kinase 3; MAPKK 3; MKK3); ERK activator kinase 3;	L36719
B5n	extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2); mitogen-activated protein kinase 2 (MAP kinase 2; MAPK 2); p42-MAPK	M84489
B6b	cAMP-dependent protein kinase alpha-catalytic subunit (PKA C-alpha)	X07767
B6e	extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3); MAP kinase 3 (MAPK3; p97-MAPK); PRKM5	X80692
B6g	c-jun N-terminal kinase 2 (JNK2); JNK55	L31951
B6i	C-jun N-terminal kinase 3 alpha2 (JNK3A2); PRKM10 + MAP kinase p493F12	U34819;
	<u>Stressantwort</u>	
B7h	natural killer cell enhancing factor (NKEFB) + thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1 (TDPX1); peroxide reductase 1	L19185;
B7i	heat-shock protein 40 (HSP40)	M34664
B7k	heat shock 90-kDa protein A (HSP90A; HSPCA); HSP86	X07270
B7l	<i>27-kDa heat-shock protein (HSP27); stress-responsive protein 27 (SRP27); estrogen-regulated 24-kDa protein; HSPB1</i>	X54079
B7m	70-kDa heat shock protein 1 (HSP70.1; HSPA1)	M11717
	<u>Apoptose-assoziierte Proteine</u>	
C1a	insulin-like growth factor I receptor (IGF1R)	X04434;
C1c	tumor necrosis factor receptor (TNFR) + tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2); tumor necrosis factor binding protein 2	M32315;
C1e	tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin	X01394
C1m	tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1); tumor necrosis factor binding protein 1 (TBP1); CD120A antigen	M33294
C2e	caspase-3 (CASP3); apopain precursor; cysteine protease CPP32; YAMA protein; SREBP cleavage activity 1; SCA-1	U13737
C2f	defender against cell death 1 (DAD1)	D15057
C2g	c-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB) + nm23-H2S	L16785;
C2i	growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform; GRB3-3; SH2/SH3 adaptor GRB2; ASH protein + epidermal growth protein 2 (EGFRBP-GRB2)	L29511;
C2j	clusterin precursor (CLU); complement-associated protein SP-40,40; complement cytolysis inhibitor (CLI); apolipoprotein J sulfated glycoprotein 2	M74816
C2k	retinoic acid receptor beta (RXR-beta; RXRB)	M84820;
C2l	caspase-2 precursor (CASP2); ICH-1L protease + ICH-1S protease	U13021;
C2m	glutathione reductase (GRase; GSR; GR)	X15722

Gen-/Proteinbezeichnung	Genbank
C3a glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1); HB subunit 4; GTH4	X08020
C3b glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3)	X08058;
C3c glutathione S-transferase A1 (GTH1; GSTA1); HA subunit 1; GST-epsilon	M25627
C3e apoptosis regulator bcl-x	Z23115;
C3f cytochrome P450 reductase	S90469
C3g glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1)	X79389
C3l Fas-activated serine/threonine (FAST) kinase	X86779
C4g caspase-4 precursor (CASP4); ICH-2 protease; TX protease; ICE(REL)-II + caspase-5 precursor (CASP5); ICH-3 protease; TY	U28014;
C4n caspase-10 precursor (CASP10); ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4; fas-associated death interleukin-1-beta-converting enzyme 2 (FLICE2)	U60519
C5c WSL protein + TRAMP + Apo-3 + death domain receptor 3 (DDR3)	Y09392; U7538
C5e cytoplasmic dynein light chain 1 (HDLC1); protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN)	U32944
C5f cysteine protease ICE-LAP3	U39613
C5h cytoplasmic antiproteinase 3 (CAP3); protease inhibitor 19 (PI9)	U71364
<u>DNA-Synthese / -Reparatur / -Rekombination</u>	
C5j excision repair protein ERCC6; Cockayne syndrome protein CSB	L04791
C5l replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit	L07541
C5m xeroderma pigmentosum group G complementing protein (XPG); DNA excision repair protein ERCC5	L20046; X69978
C6b xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB); DNA excision repair protein ERCC3; basal transcription factor (BTF2-p89); TFIIH 89-kDa subunit	M31899
C6f ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa (UBE2A); ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein; HR6A	M74524
C6h activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4	M87339
C6j purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha (PURA)	M96684
C6l DNA topoisomerase II alpha (TOP2A)	J04088
C7a DNA excision repair protein ERCC1	M13194
C7b cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)	K00065;
C7c mutL protein homolog; DNA mismatch repair protein MLH1; COCA2	U07418
C7e HHR23A; UV excision repair protein RAD23A	D21235
C7f growth arrest & DNA-damage-inducible protein (GADD45); DNA-damage-inducible transcript 1 (DDIT1)	M60974
C7h DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) + DNA-PK catalytic subunit (DNA-PKCS)	U35835;
<u>DNA-Bindungsproteine / Transkriptionsfaktoren</u>	
D1b endothelial transcription factor GATA2	M68891
D1c CCAAT-binding transcription factor subunit B (CBF-B); NF-Y protein subunit A (NF-YA); Hap2; CAAT-box DNA-binding protein	M59079
D1g helix-loop-helix protein; DNA-binding protein inhibitor Id-2	M97796
D1l 60S ribosomal protein L6 (RPL6); TAX-responsive enhancer element binding protein 107 (TAXREB107); neoplasm-related protein C140	X69391
D1n cellular nucleic acid binding protein (CNBP); sterol regulatory element-binding protein	M28372
D2a CCAAT displacement protein; CUTL1; CASP	L12579
D2d estrogen receptor hSNF2b; global transcription activator SNF2L4; brg-1 protein; mitotic growth and transcription activator;	D26156
D2f cAMP-dependent transcription factor ATF-4; DNA-binding protein TAXREB67; cAMP-response element binding protein	D90209
D2i heat shock factor protein 1 (HSF1); heat shock transcription factor 1 (HSTF1); TCF5	M64673
D2n ZFM1 protein alternatively spliced product	D26121
D3a transcriptional activator hSNF2-alpha	D26155
D3b putative transcription activator DB1	D28118
D3c DNA-binding protein TAXREB302; albumin D box-binding protein (DBP)	D28468
D3e zinc finger protein 91 (ZNF92); HPF7; HTF10	L11672
D3g paired box homeotic protein (PAX8) isoforms 8A/8B + isoforms 8C/8D	L19606
D3k guanine nucleotide-binding protein G-s alpha subunit (GNAS); adenylate cyclase-stimulating G alpha protein	M14631
D3l homeobox protein HOXB7; HOX2C; HHO.c1	M16937
D4f early growth response protein 1 (hEGR1); transcription factor ETR103; KROX24; zinc finger protein 225; AT225	M62829;
D4g transcription factor ETR101	M62831
D5a nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP)	M83234
D5b transcriptional regulator interferon-stimulated gene factor 3 gamma subunit (ISGF3G); interferon-alpha (IFN-alpha) responsive	M87503
D5d tristetraproline (TTP); TIS11; ZFP36; growth factor-inducible nuclear protein 475 (NUP475)	M92843
D5e fli-1 oncogene; ergB transcription factor	M93255
D5f nucleobindin precursor (NUC)	M96824
D5i MSX-1 homeobox protein; HOX7	M97676
D5n transcription factor LSF	U03494
D6a lmi1	U04847
D6d R kappa B DNA-binding protein	U08191
D6e transcription factor 11 (TCF11); HBZ17; locus control region-factor 1 (LCR-F1)	U08853
D6f cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein	U09579; L25610
D6h nuclear factor NF90	U10324
D7b zinc finger X-chromosomal protein (ZFX)	X59738
D7c thioredoxin peroxidase 2 (TDPX2); thioredoxin-dependent peroxide reductase 2; proliferation-associated gene (PAG); natural factor A (NKEFA)	X67951
D7d transcription factor Sp1 (TSFP1)	J03133
D7e I-rel (RELB)	M83221
D7f Sp2 protein	M97190
D7h homeobox protein HOX-D3; HOX-4A	D11117
D7j transcription factor TFIIIB 90 kDa subunit (HTFIIIB90)	U28838
D7k transcription initiation factor TFIIID 31-kDa subunit; TAFII31; TAF2G	U30504
<u>Wachstumsfaktoren / Chemokin-Rezeptoren</u>	
E1a ERBB-3 receptor protein-tyrosine kinase precursor; epidermal growth factor receptor	M29366;
E1h endothelin receptor type B (EDNRB; ETB); endothelin receptor non-selective type	L06623
E1j platelet-derived growth factor receptor alpha subunit (PDGFRA); CD140A antigen	M21574
E1k platelet-derived growth factor receptor beta subunit (PDGFRB); CD140B antigen	M21616
E2b neuromedin B receptor (NMBR); neuromedin-B-preferring bombesin receptor	M73482
E2c related to receptor tyrosine kinase (RYK)	S59184

Gen-/Proteinbezeichnung	Genbank	
E2h	activin type 1 receptor; serine/threonine-protein kinase receptor R2 (SKR2); activin receptor-like kinase 4 (ALK4)	U14722
E2j	CDW40 antigen; CD40L receptor precursor; nerve growth factor receptor-related B-lymphocyte activation molecule	X60592
E2k	corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1)	X72304
Interleukin- / Interferon-Rezeptoren		
E2m	interleukin-2 receptor alpha subunit precursor (IL-2 receptor alpha subunit; IL2RA); p55; TAC antigen; CD25	X01057;
E2n	interleukin-6 receptor alpha subunit precursor (IL-6R-alpha; IL6R); CD126 antigen	M20566;
E3l	interleukin-1 receptor type I precursor (IL-1R1); IL-1R-alpha; p80; CDW121A antigen	M27492
Hormonrezeptoren		
E4b	androgen receptor (AR)	M20132;
Rezeptoren für Neurotransmitter		
E5a	5-hydroxytryptamine 3 receptor precursor (5-HT-3); serotonin-gated ion channel receptor	D49394
Zelloberflächen Antigene / Adhäsion		
E5g	alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin	D13866;D14705
E5h	intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen	J03132
E6a	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1	M33374
E6h	neural cell adhesion molecule phosphatidylinositol-linked isoform precursor (NCAM120); CD56 antigen	X16841;
E6j	platelet membrane glycoprotein IIIa precursor (GP3A); integrin beta 3 (ITGB3); CD61 antigen	J02703;
E6l	integrin beta 5 subunit precursor (ITGB5)	J05633
E7f	fibronectin receptor beta subunit (FNRB); integrin beta 1 (ITGB1); VLA4 beta subunit; CD29 antigen	X07979
E7g	integrin alpha 6 precursor (ITGA6); VLA6; CD49F antigen	X53586;
E7h	integrin beta 4 (ITGB4); CD104 antigen	X53587;
E7j	integrin alpha 7B precursor (IGA7B)	X74295
E7k	leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor; leukocyte function-associated molecule 1 alpha chain; CD11A	Y00796
E7l	focal adhesion kinase 2 (FADK2; FAK2); cell adhesion kinase beta (CAKbeta); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)	L49207; U43522
E7m	beta catenin (CTNNB)	X87838; Z19054
Wachstumsfaktoren / Cytokine / Chemokine		
F1a	insulin-like growth factor II (IGF2); somatomedin A	M29645
F1e	transforming growth factor-beta (TGF-beta; TGFB)	X02812; J05114
F1f	granulocyte colony-stimulating factor precursor (G-CSF); pluripoietin; CSF3	X03438
F1m	macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1; MCSF)	M37435
F2a	hepatoma-derived growth factor (HDGF)	D16431
F2e	neuroleukin (NLK); glucose-6-phosphate isomerase (GPI); phosphoglucose isomerase (PGI); phosphohexose isomerase (PHI)	K03515
F2k	bone morphogenetic protein 1 (BMP1) + procollagen C-proteinase (pCP-2)	M22488;U50330
F2j	T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine	M21121
F3a	monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP1); monocyte chemotactic and activating factor (MCAF); monocyte secretory chemoattractant protein 1; HC11; small inducible cytokine A2 (SCYA2)	M24545
F3e	insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1); placental protein 12 (PP12)	M31145
F3f	vascular endothelial growth factor precursor (VEGF); vascular permeability factor (VPF)	M32977;
F3g	N-sam; fibroblast growth factor receptor1 precursor (FGFR1); basic fibroblast growth factor receptor precursor (bFGFR); fms-like heparin-binding growth factor receptor (HBGF-R-alpha-A1) + HBGF-R-alpha-A2 + HBGF-R-alpha-A3	X66945;
F3h	pleiotrophin precursor (PTN) + osteoblast specific factor 1 (OSF-1) + heparin-binding neurite outgrowth promoting factor 1 growth-associated molecule (HB-GAM); heparin-binding growth factor 8 (HBGF-8)	M63887;M6388
F4d	thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10	M92381
F4k	migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8); calgranulin A; leukocyte L1 complex light subunit; S100 calcium-binding antigen (CFAG)	X06234
F4j	migration inhibitory factor-related protein 14 (MRP14); calgranulin B; leukocyte L1	X06233
F4l	platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF1)	X06374
F5c	placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2)	X54936
Interleukine / Interferone		
F5m	interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin	K02770
F6f	interleukin-10 precursor (IL-10); cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)	M57627
F7a	ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI); placental ribonuclease inhibitor; RNH	M36717
F7b	erythroid differentiation protein (EDF); inhibin beta A subunit precursor; activin beta-A subunit	J03634
F7c	angiotensin-converting enzyme (ACE)	A00914
F7h	acyl-CoA-binding protein (ACBP); diazepam binding inhibitor (DBI); endozepine (EP)	M14200
F7i	insulin-like growth factor-binding protein 3 precursor (IGF-binding protein 3; IGFBP3; IBP3)	M31159;
F7j	cellular retinoic acid-binding protein II (CRABP2)	M68867
F7k	folistatin-related protein precursor	U06863
konstitutiv exprimierteGene		
G5	ubiquitin	M26880
G6	phospholipase A2	M86400
G12	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	X01677
G13	brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1)	K00558
G14	HLA class I histocompatibility antigen C-4 alpha subunit (HLAC)	M11886
G19	cytoplasmic beta-actin (ACTB)	X00351
G20	23-kDa highly basic protein; 60S ribosomal protein L13A (RPL13A)	X56932
G21	40S ribosomal protein S9	U14971

dunkelgrau: in allen Proben exprimiert

hellgrau: Transkript in einem der Endometrien nicht betroffener Frauen und /oder einer der Endometrien von Endometriose-Patientinnen nicht detektiert

kursiv: signifikante Unterschiede im endometrialen Expressionslevel von Frauen mit und ohne Endometriose

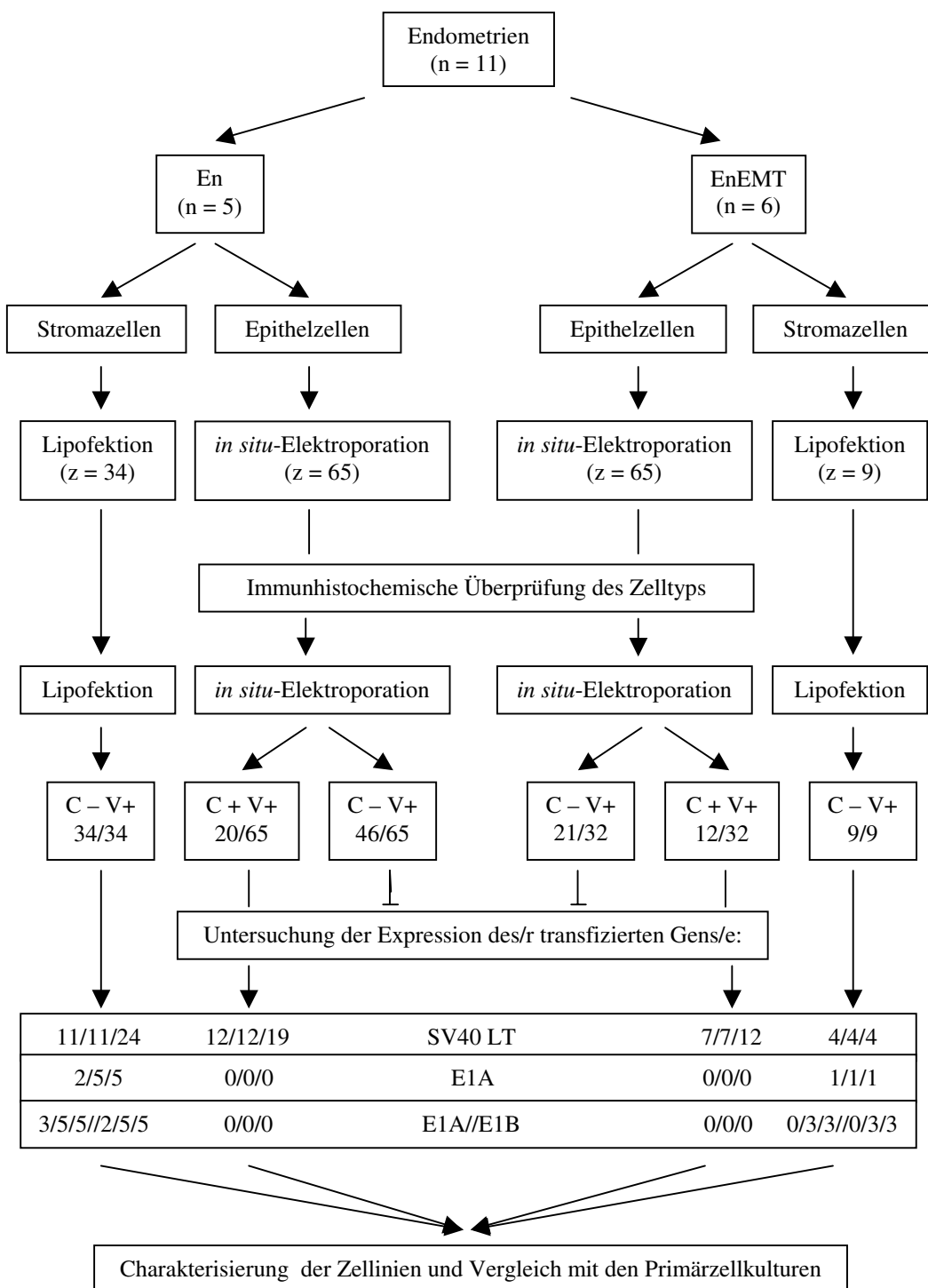


Abb. 38: Schematische Darstellung der Etablierung und Charakterisierung permanenter endometrialer Zelllinien

Epithel- und Stromazellen wurden aus humanem Endometrium (n = Anzahl der Endometrien) von Frauen ohne (En) und mit Endometriose (EnEMT) isoliert und kultiviert. Nach der Transfektion der Primärzellen und Vereinzelung der unter Selektionsdruck gewachsenen Zellkolonien (z = Anzahl der Zellkolonien) wurde der Zelltyp durch immunhistochemische Analyse der Cytokeratin-Expression (C = Cytokeratin, V = Vimentin) ermittelt. Die Expression des transfizierten Gens wurde mittels RT-PCR überprüft (Anzahl der positiven Kolonien / Anzahl der getesteten Kolonien / Gesamtzahl der vereinzelten Kolonien). Eine Auswahl der Zellkolonien wurde morphologisch, immunhistochemisch und auf ihr Proliferationsverhalten im Vergleich zu den epithelialen und stromalen Primärkulturen untersucht.

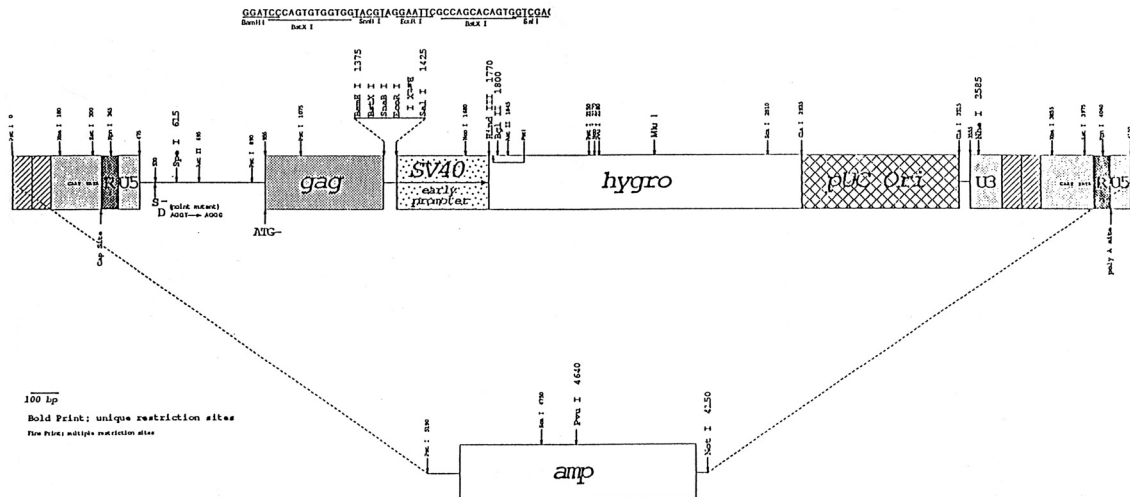


Abb. 39: pBabe /Hygro

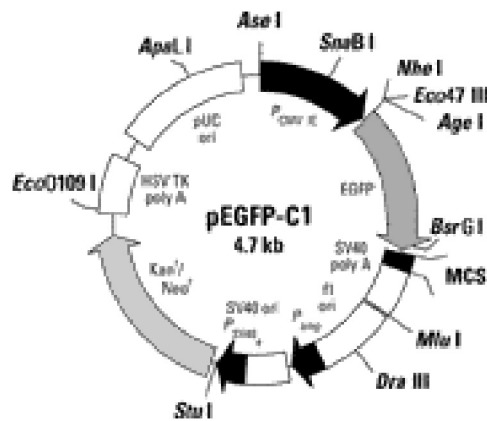


Abb. 40: pEGFP-C1

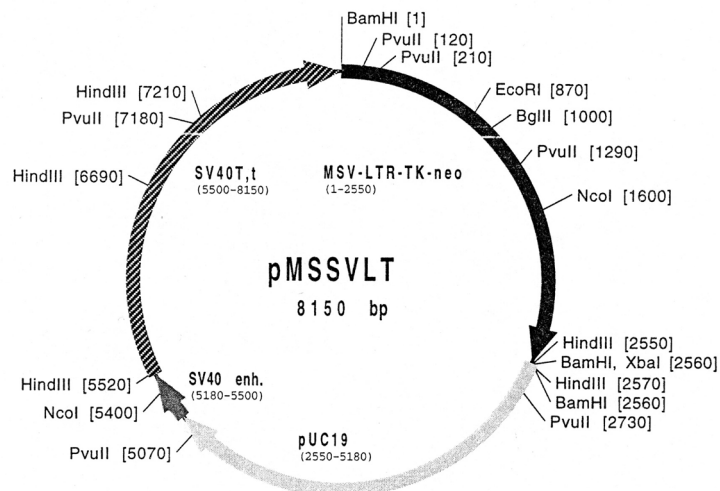


Abb. 41: pMSSVLT

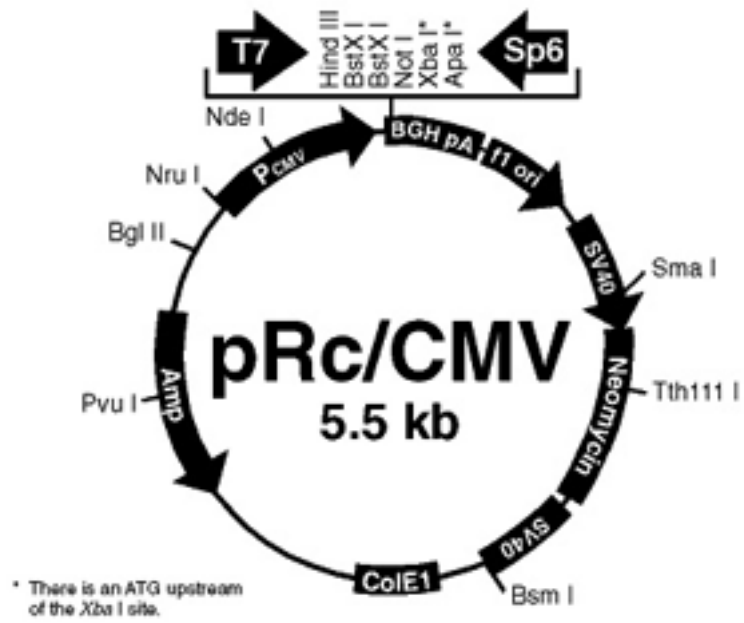


Abb. 42: pRc/CMV

Tab. 17: Immunhistochemische Analyse der Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker im Drüsenepithel humaner Endometrien sowie in epithelialen Primärkulturen und Zelllinien des Endometriums

	transfiziertes Plasmid	Ausgangsgewebe	Passage	Cyto-keratin	Vimentin	PR	ER	EGF-R	E-Cad-herin	ZO-1	α_3 -Integrin	α_6 -Integrin	α_v -Integrin	β_1 -Integrin	β_2 -Integrin	β_3 -Integrin
Krvostatschnitte des humanen Endometriums																
A		En		+	+	+	+	+	+	+	het	+	(+)	+	+	-
B		En		+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+	(+)	-
C		EnEMT		+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	+	-	-
Epitheliale Primärkulturen																
E 131	-	En	0	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	n.d.	-
E 135	-	En	0	+	+	+	(+)	+	+	+	(+)	-	n.d.	+	+	-
E 147	-	EnEMT	0	+	+	n.d.	het	+	+	+	-	n.d.	-	n.d.	+	n.d.
Epitheliale Zelllinien																
145E SV40LT	pMSSVLT	En	7	het	+	het	-	-	-	+	-	(+)	-	(+)	+	-
			22	het	+	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	+	-
148E SV40LT	pMSSVLT	En	10	het	+	het	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
			22	het	+	het	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
165E SV40LT	pMSSVLT	EnEMT	6	het	+	+	het	+	-	+	-	+	-	(+)	+	-
			14	het	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
178E SV40LT	pMSSVLT	EnEMT	10	het	+	+	-	het	het	het	(+)	+	-	+	+	-
			24	het	+	het	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	het
174E SV40LT	pMSSVLT	EnEMT	7	het	+	+	-	-	-	het	(+)	+	-	+	+	het
184E SV40LT	pMSSVLT	EnEMT	6	het	+	+	-	het	het	n.d.	-	+	-	+	het	het

het: Expression heterogen verteilt

n.d.: nicht untersucht

(): schwach exprimiert

Tab. 18: Immunhistochemische Analyse der Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker im Stroma des humanen Endometriums sowie in primären Stromakulturen und Stromazelllinien des Endometriums

	transfiziertes Plasmid	Ausgangsgewebe	Passage	Cyto-keratin	Vimentin	Desmin	PR	ER	EGF-R	E-Cad-herin	ZO-1	α_3 -Integrin	α_6 -Integrin	α_v -Integrin	β_1 -Integrin	β_2 -Integrin	β_3 -Integrin	
Kryostatsschnitte des humanen Endometriums																		
A		En		-	+	-	het	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	+	-	
B		En		-	+	-	het	het	het	-	-	-	+	-	+	+	-	
C		EnEMT		-	+	-	-	het	(+)	-	-	-	-	-	(+)	+	-	
Primäre Stromakulturen																		
S 131	-	En	0	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	n.d.	-	
S 135	-	En	0	-	+	-	+	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	+	+	-	
S 144	-	EnEMT	0	-	+	-	n.d.	het	het	-	-	n.d.	-	-	n.d.	(+)	n.d.	
Stromazelllinien																		
6S SV40LT	pMSSVLT	En	11	-	+	-	+	+	-	-	-	-	het	-	+	-	-	
			21	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	-	+	-	(+)	+	-	
16S SV40LT	pMSSVLT	En	10	-	+	-	het	-	-	-	n.d.	-	+	-	+	+	-	
			23	-	+	-	het	-	-	-	n.d.	-	-	-	(+)	+	-	
28S SV40LT	pMSSVLT	En	9	-	+	-	het	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
			21 †															
67S SV40LT	pMSSVLT	En	8	-	+	-	-	-	(+)	-	-	-	+	-	+	+	-	
			21	-	+	-	het	het	-	-	n.d.	-	+	-	(+)	+	-	
1S SV40LT	pMSSVLT	EnEMT	9	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	
			20 †															
2S SV40LT	pMSSVLT	EnEMT	9	-	+	-	+	+	-	-	-	het	-	-	+	+	-	
			24	-	+	-	het	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
50S SV40LT	pMSSVLT	EnEMT	9	-	+	-	het	-	-	-	n.d.	-	-	-	+	-	-	
			23	-	+	-	het	-	-	-	n.d.	-	(+)	(+)	+	+	-	
4S E1A	pRC/E1A	En	9	-	+	-	het	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
			18	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	(+)	+	-	
12S E1A	pRC/E1A*	En	9	-	+	-	+	-	-	-	-	-	het	-	+	-	-	
			24	-	+	-	het	-	-	-	n.d.	-	+	-	+	+	-	
55S E1A	pRC/E1A	En	9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
			24	-	+	-	-	het	(+)	-	n.d.	-	+	+	+	+	-	
34S E1A	pRC/E1A	EnEMT	9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	
			22	-	+	-	-	+	(+)	-	n.d.	-	+	-	+	+	-	

* Klon 12S E1A wurde mit pRC/E1A und pBabe/Hygro/E1B cotransfiziert; die Expression von E1B konnte ab Passage 8 nicht mehr nachgewiesen werden

het: Expression heterogen verteilt

n.d.: nicht untersucht

(): schwach exprimiert

