

Aus dem Department für Frauengesundheit Tübingen
Universitäts-Frauenklinik

Analyse der Funktionalität von Hormonrezeptoren und der
HOXA10-Expression endometrialer Stromazellen zur Ursa-
chenforschung bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

König, Juliana Leonie Berit

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Brucker

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Fuchs

Tag der Disputation: 24.02.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	12
1.1 Einführung in die Thematik.....	12
1.2 Grundlagen des MRKH-Syndroms	13
1.2.1 Embryologische Entwicklung des weiblichen Urogenitaltraktes	13
1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild und assoziierte Fehlbildungen	14
1.2.3 Ätiopathogenese des MRKH-Syndroms.....	17
1.2.4 Wichtige Differentialdiagnosen.....	19
1.3 Der Uterus: Anatomie und seine Fehlentwicklung.....	19
1.3.1 Endometrium.....	20
1.3.2 Myometrium	20
1.3.3 Uterusrudimente.....	20
1.4 Fragestellung.....	21
2. Material und Methoden	24
2.1 Materialliste	24
2.2 Methoden	24
2.2.1 Einverständniserklärung und Ethikkommission.....	24
2.2.2 Gewinnung von Studiengewebe.....	24
2.2.2.1 Kontrollgewebe und Patientenkollektiv	24
2.2.2.2 MRKH-Gewebe.....	25
2.2.2.3 Hormonprofile und Zyklusphase der MRKH-Patientinnen.....	25
2.2.3 Reagenzien und Geräte für die Zellkultivierung	26
2.2.3.1 Kollagenase Typ IV (0,5 %)	26
2.2.3.2 Kollagenase Typ XI (10%)	26
2.2.3.3 Enzymlösung 1 und 2 (Mischkultur).....	26
2.2.3.4 Zellkulturmedium.....	27
2.2.3.5 Inkubator.....	28
2.2.4 Präparation von Uterusgewebe.....	28

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.1 Endometrium	28
2.2.4.2 Myometrium	29
2.2.5 Endometriumkultur	29
2.2.5.1 Gewinnung endometrialer Stromazellen	29
2.2.6 Myometriumkultur.....	30
2.2.6.1 Allgemein	30
2.2.6.2 Reinkultur.....	30
2.2.6.3 Mischkultur.....	31
2.2.7 Kultivierung von primären Zellkulturen	31
2.2.7.1 Mediumwechsel	31
2.2.7.2 Passagierung.....	32
2.2.7.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	32
2.2.7.4 Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.8 Immunhistochemische Färbung: Spezifische Antikörper und Zielantigene	34
2.2.8.1 CD10.....	34
2.2.8.2 Aktin.....	34
2.2.8.3 Pan Cytokeratin	34
2.2.8.4 Collagen Type 1	34
2.2.8.5 Estrogenrezeptor	34
2.2.8.6 Progesteronrezeptor	35
2.2.8.7 Durchführung der immunhistochemischen Färbung	35
2.2.8.8 Positiv- und Negativkontrolle für Hormonrezeptorfärbungen	36
2.2.9 Hormonelle Stimulation endometrialer Zellen.....	37
2.2.9.1 Dezidualisierung <i>in vitro</i>	37
2.2.9.2 ELISA: Ansetzen von Reagenzien	38
2.2.9.3 Durchführung: ELISA	39
2.2.9.4 Dezidualisierungseffekt.....	40
2.2.10 Hormonelle Stimulation myometrialer Zellen.....	40
2.2.10.1 Allgemein	40
2.2.10.2 Giant cells	40
2.2.10.3 Proliferation Rein- und Mischkultur	41

Inhaltsverzeichnis

3.4.1 Erfolgreiche Kultivierung von Myometrium.....	68
3.4.2 Geringe Proliferationsunterschiede der Myometriumzellen.....	68
3.4.3 Giant cells: ausbleibende Größenzunahme	70
3.5 Gewebeschnitte: HOXA10, Pax8, CD31	71
3.5.1 HOXA10-Expressionsunterschiede zwischen MRKH- und Kontroll-Basalis	71
3.5.2 Keine signifikanten Unterschiede der Pax8-Expression.....	75
3.5.3 Keine signifikanten Unterschiede der CD31-markierten Gefäßanschnitte.....	77
4. Diskussion	80
4.1 Herstellung von Primärkulturen endometrialer Stromazellen aus MRKH-Rudimenten.....	80
4.2 Immunhistochemische Färbungen	80
4.2.1 Funktionalität der Hormonrezeptorfärbungen.....	80
4.3 Beeinträchtigte Dezidualisierung in endometrialen Stromazellen von MRKH-Patientinnen.....	81
4.3.1 Vergleich der Messergebnisse beider Dezidualisierungsmarker.....	81
4.3.2 Beeinträchtigte Dezidualisierung von MRKH-Gewebe	81
4.3.3 Variierende Prolaktinsekretion der Uterusrudimente.....	83
4.4 Hormonrezeptoren bei aufsteigend passagierten und stimulierten endometrialen Stromazellen.....	85
4.5 Stimulationsversuche mit Myometrium aus MRKH-Rudimenten	86
4.5.1 Proliferation von Myometrium.....	87
4.5.2 Giant cells	88
4.6 HOXA10, Pax8 und CD31 Expression in MRKH- und Kontrollgewebe ...	88
4.6.1 Geringere HOXA10-Expression in MRKH-Endometrium vom Basalis Typ.....	88
4.6.2 Keine signifikanten Unterschiede in der Pax8-Expression zwischen Kontroll- und MRKH-Gewebe.....	91
4.6.3 Keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Gefäßanschnitten zwischen MRKH- und Kontrollgewebe.....	92

Inhaltsverzeichnis

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick.....	93
5. Zusammenfassung.....	95
6. Literaturverzeichnis.....	97
Materialliste	104
Tabellenverzeichnis.....	110
Abbildungsverzeichnis.....	112
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	114
8. Veröffentlichungen.....	115
Danksagung	116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMH	Anti-Müller-Hormon
BS	Blocking solution
CC1	Cell Condition Solution 1
CD	Clusters of Differentiation
CT-1	Collagen Type 1
Cy	Cyanine
d	Tag/e
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM/F-12	Dulbeccos modifies Eagle serum: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESC	endometriale Stromazellen
ESR1	Estrogenrezeptor alpha
E ₂	17β-Estradiol
FCS (FKS)	fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBSS-O	Hanks balanced salt solution without calcium and magnesium ions
HBSS-2	Regular Hanks Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOX	Homöobox
IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein 1
IRS	immunreaktiver Score
K	Kultur aus Kontrollgewebe
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Kultur aus MRKH-Gewebe
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MRKH	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
MRT	Magnetresonanztomographie
MURCS	Müllerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia
na	no available (deutsch: nicht verfügbar)
P	Passage
Pax	Paired-box
PBS	Phosphate Buffered Saline

Abkürzungsverzeichnis

pCK	Pancytokeratin
PGR	Progesteronrezeptor
Prog	Progesteron
RD	Reagenz Diluent
RNA	Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TEC	TRIS/EDTA/Citrat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Das Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom (MRKH-Syndrom) ist durch die kongenitale Aplasie (griechisch-neulateinisch: „aplastia“ - Nichtausbildung) des Uterus und der oberen Zweidrittel der Vagina charakterisiert [1] (s. Abbildung (Abb.) 1), welche auf eine embryonale Entwicklungsstörung mit fehlender Fusion der Müllergänge zwischen der 4. - 12. Schwangerschaftswoche (SSW) zurückzuführen ist [2]. Die sekundären Geschlechtsmerkmale sind währenddessen normal entwickelt [3], außerdem besitzen die Patientinnen einen unauffälligen, weiblichen 46 XX – Karyotyp [1].



Abbildung 1: Anatomische Verhältnisse, beim MRKH-Syndrom; Die gepunktete Linie zeigt die normale Lage von Vagina und Uterus.

Quelle: Henkel, Universitäts-Frauenklinik Tübingen.

Es handelt sich beim MRKH-Syndrom um ein außergewöhnliches und oft unerkanntes Krankheitsbild [4], mit einer Inzidenz von 1:4500 [1]. Hinsichtlich der häufigsten Ursache für eine primäre Amenorrhö steht es nach der Gonadendysgenese [5], mit 20 % an zweiter Stelle [4].

Beschrieben wurde es erstmals durch den Bonner Anatom und Physiologen Prof. C. A. Mayer, im Jahre 1829. Er beschrieb die Fehlbildung, anhand eines Einzelfalls, als „Uterus bipartitus“ [2, 6]. Daraufhin veröffentlichte Prof. C. Rokitansky im Jahre 1838 einen Fallbericht über gleichartige Fehlbildungen [7,

8]. Im Jahre 1910 verfasste Dr. H. Küster über die von seinen Vorgängern beschriebene Fehlbildung eine erste Literaturübersicht mit dem Titel „Uterus bipartitus solidus rudimentarius cum vagina solida“, in der er auch assoziierte Fehlbildungen beschrieb [8, 9]. In der Publikation von G.A. Hauser und W.E. Schneider im Jahre 1961 wurde das Syndrom erstmals als „Mayer-Rokitansky-Küster-Syndrom“ betitelt und von Differentialdiagnosen wie der testikulären Feminisierung (heute: komplette Androgenresistenz) abgegrenzt [8, 10, 11]. Schließlich wurde der Name „Hauser“ der Titelbezeichnung des Syndroms hinzugefügt und vervollständigte sie somit, zu dem heute bekannten „Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom“ [8].

1.2 Grundlagen des MRKH-Syndroms

1.2.1 Embryologische Entwicklung des weiblichen Urogenitaltraktes

Obwohl das Geschlecht des Embryos mit der Befruchtung durch das weitergegebene Chromosom des Vaters (X oder Y) bereits genetisch festgelegt wird [12], ist die Gonadenanlage des frühen Embryos indifferent [13]. In der 6. Embryonalwoche wandern die Urkeimzellen vom Dottersack in die Genitalleisten und stoßen die Gonadenentwicklung an [13]. Aus dem intermediären Mesoderm [14] entwickeln sich, während des indifferenten Stadiums zwei jeweils paarig angelegte Gänge, welche sich später zu den Genitalwegen differenzieren: der Wolff-Gang und der Müller-Gang [13]. Die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane wird durch die Expression des auf dem Y-Chromosom gelegenen SRY-Gen und die Wirkung von Testosteron induziert [15]. Die Müller-Gänge bilden sich durch die Wirkung des, von den Sertoli-Zellen produzierten Anti-Müller-Hormons (AMH) zurück [13]. Die weibliche Entwicklung ist währenddessen ein passiver Vorgang: durch den fehlenden Einfluss des SRY-Gens entwickelt sich die indifferente Gonadenanlage zum Ovar [15]; dies geschieht unabhängig von den Genitalgangsystemen [16]. Die Wolff-Gänge bilden sich aufgrund der ausbleibenden Testosteronwirkung zurück. Die Müller-Gänge bleiben durch die fehlende AMH-Wirkung erhalten [17] und bilden das innere Genital [15]: Der obere Teil der beidseits angelegten Müller-Gänge liegt lateral der Wolff-Gänge und entwickelt sich zu den späteren Tuben. In kaudaler Rich-

tung überkreuzen sie die Wolff-Gänge, fusionieren in der Mitte mit dem distalen Ende der Gegenseite und bilden die Anlage des Y-förmigen Uterovaginalkanals. Aus ihm entwickeln sich der Corpus uteri, die Cervix und der obere Abschnitt der Vagina [18, 19] (ihre oberen zwei Drittel [15]). Die am unteren Pol fusionierten Müller-Gänge induzieren [20] aus dem Sinus urogenitalis, die Bildung des unteren Drittels der Vagina [15]. Diese bildet im Verlauf ein mit dem Uterus kommunizierendes Lumen, welches zum Sinus urogenitalis durch das Hymen getrennt ist [20].

Bei einer fehlerhaften Fusion der Müller-Gänge kann es zu unterschiedlichen uterinen und vaginalen Fehlbildungen kommen [15]. Lagern sich die Müller-Gänge beispielsweise nicht vollständig aneinander kann eine Doppelbildung des Uterus entstehen, sogenannter (sog.) Uterus bicornis [20]. Bei der Vereinigung der Gänge besteht zwischen ihnen anfangs ein Septum [18, 21]. Bleibt dieses voll- oder unvollständig bestehen, kann es zu einem Uterus septus oder subseptus kommen [20].

Eine entwicklungs geschichtlich enge-, räumliche Beziehung besteht zwischen den Genitalorganen und den Harnwegen. Beide entwickeln sich jeweils aus dem intermediären Mesoderm, als Genital- und Nierenleiste, welche zusammen die Urogenitalfalte bilden. Diese ist über das Mesenterium urogenitale mit der hinteren Leibeswand verbunden [13]. Das Mesoderm stellt hierbei die entwicklungs geschichtliche Verbindung zwischen urogenitalem und skelettalem System dar und ist eine mögliche Erklärung dafür, warum das MRKH-Syndrom als genitale Fehlbildung, häufig mit renalen und auch mit skelettalen Fehlbildungen assoziiert ist [2, 5].

1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild und assoziierte Fehlbildungen

Das MRKH-Syndrom ist charakteristischerweise zunächst asymptomatisch [4], weshalb es oft erst zwischen dem 14. und 17. Lebensjahr [11] klinisch durch eine primäre Amenorrhö ohne zyklische Unterbauchbeschwerden und / oder eingeschränkte oder gar nicht vorhandene Kohabitationsfähigkeit auftritt [4]. Die Patientinnen entwickeln einen normalen weiblichen Phänotyp, mit regelrechter Thelarche und Pubarche und besitzen einen normalen weiblichen Karyotyp (46, XX) [2]. Aufgrund intakter Ovarien, weisen sie eine biphasische Temperaturkur-

ve auf [2, 22, 23], zudem sind im Vergleich mit gesunden Kontrollpatientinnen, im Blut der MRKH-Patientinnen ähnliche Hormonspiegel festzustellen. Folglich können sie ebenfalls in die normalen Zyklusphasen eingeteilt werden [3, 24]. Allgemein sind Fehlbildungen der Müller-Gänge nicht mit ovariellen Fehlbildungen assoziiert [1], da die Ovarien ihren Ursprung im primären Ektoderm haben und sich somit unabhängig vom Genitalwegsystem entwickeln, dessen Ursprung wiederum im intermediären Mesoderm liegt [8]. Ein weiterer Grund für die späte Diagnosestellung ist das regelrecht entwickelte äußere Genital, welches normale Labien und Klitoris aufweist. Die Vagina dagegen, ist auf ein blind endendes Grübchen variabler Tiefe reduziert [4]. Die Hymenalanlage fehlt nur in seltenen Fällen und ist beim MRKH-Syndrom in der Regel rosettenartig, hypoplastisch bis vollständig ausgeprägt. Der intraabdominelle Befund zeigt, wie in den Abb. 2 a - c ersichtlich, unterschiedliche Erscheinungsformen die von einer nicht sichtbaren Uterusleiste, bis zu einer rudimentären Uterusleiste mit Uterusknospen beziehungsweise Uterusrudimenten mit normalen Adnexen (häufigere Form) reichen [4]. Diese nur rudimentäre Anlage des Uterus kommt aufgrund der Hemmungsfehlbildung der Müller-Gänge zu Stande [25]. Dabei können die Rudimente gar nicht, unilateral oder bilateral angelegt sein [4]. Bereits G.A. Hauser und W.E. Schreiner beschrieben in ihrer Publikation im Jahre 1961 das „bogenförmige, unausgehöhlte Uterusrudiment mit Vaginalaplasie“ als eine häufige und charakteristische Erscheinungsform bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom [10, 11].

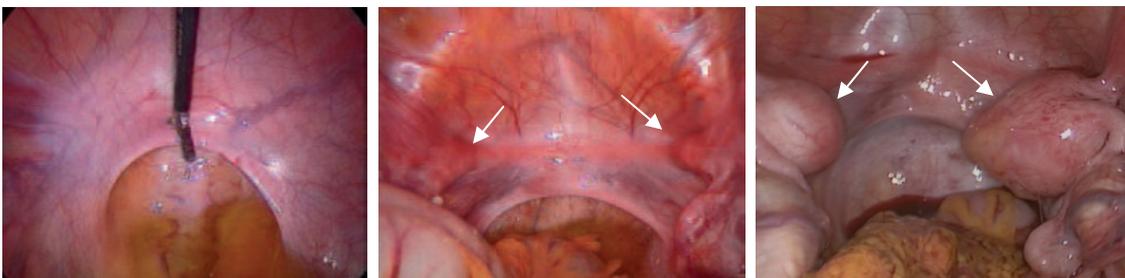


Abbildung 2 a - c (von links nach rechts): Abb. 2 a: keine Uterusleiste angelegt, keine Uterusrudimente; Abb. 2 b: angedeutete Uterusleiste, beidseits angelegte, kleine Uterusknospen (s. Pfeile); Abb. 2 c: zwei große Uterusknospen (s. Pfeile), mit deutlichem Größenunterschied.

Quelle: intraoperative Bilddokumente der Universitäts-Frauenklinik Tübingen.

Variabel ausgeprägte Reste von Endometrium in den Rudimenten, oder auch Herde von Endometriose können den Patientinnen zyklische Unterbauchschmerzen bereiten und eine operative oder medikamentöse Behandlung notwendig machen [26]. Desweiteren können sich unter anderem auch Myome in den Rudimenten bilden [4]. Die laparoskopische Entfernung der Rudimente stellt eine sichere Therapie der von ihnen ausgelösten Beschwerden dar [27]. Allerdings müssen zyklische Unterbauchbeschwerden laut Rall *et al.* (2013) nicht unbedingt mit dem Auffinden von Endometrium in den Rudimenten zusammenhängen. Unter anderem können sie auch auf Ovulationsschmerzen zurückzuführen sein [28]. Das Ausmaß des MRKH-Syndroms kann variabel und mit verschiedenen Fehlbildungen assoziiert sein, daher wird es je nach Erscheinungsbild in ein einfaches MRKH-Syndrom (Typ 1) und ein komplexes MRKH-Syndrom (Typ 2 und MURCS (Müllerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia) -Assoziation) eingeteilt [1]. Bei MRKH-Typ 1 handelt es sich um eine isolierte uterovaginale Aplasie/Hypoplasie, ohne weitere assoziierte Fehlbildungen. Der MRKH-Typ 2 ist dagegen mit zusätzlichen Fehlbildungen assoziiert [2]. Die Fehlbildungen des Harnsystems gehören zu den häufigsten assoziierten Malformationen des MRKH-Syndroms. In einer Kohorte von 284 Patientinnen werden sie von Oppelt *et al.* (2012), mit 29,6 % beschrieben. Die häufigste darunter ist die renale Agenesie mit 64,4 % aller renalen Fehlbildungen [8]. Desweiteren werden renale Ektopie und Hufeisennieren, skelettale Fehlbildungen wie Skoliose, Hörschäden und seltener kardiale und digitale Anomalien beobachtet [29]. Auch Assoziationen mit Leistenhernien sind keine Seltenheit [4]. Die MURCS-Assoziation stellt mit einer Kombination der uterovaginalen Aplasie mit zervikothorakalen und renalen Fehlbildungen eine ausgeprägte Form assoziierter Fehlbildungen dar [2, 30]. Bezüglich der Häufigkeit, beschreibt Rall *et al.* (2015) in einer Studie mit 346 Patientinnen, das MRKH-Syndrom Typ 1 mit 53,2 %, das MRKH-Syndrom Typ 2 mit 41,3 % und das MRKH-Syndrom mit MURCS-Assoziation mit 5,5 % [31]. Neben der VCUAM-Klassifikation (Vagina Cervix Uterus Adnex-associated Malformation) mit der verschiedene genitale Fehlbildungen, des inneren und / oder äußeren Genitals, präzise und individuell beschrieben werden können [32], dient vor allem das von Grimbizis *et al.* 2013

veröffentlichten ESHRE/ESGE-Klassifikationssystem (European Society of Human Reproduction and Embryology / European Society for Gynaecological Endoscopy) der Einteilung angeborener Anomalien des weiblichen Genitaltraktes [33].

1.2.3 Ätiopathogenese des MRKH-Syndroms

Das MRKH-Syndrom ist am ehesten auf eine unvollständige Fusion der Müller-Gänge während der 4. - 12. SSW zurückzuführen [2], aus welcher sich während der Embryonalentwicklung der Uterovaginalkanal und damit der Uterus, die Cervix und die oberen zwei Drittel der Vagina bilden sollte (s. 1.2.1). Die genaue Ursache ist allerdings bis heute unbekannt. Zunächst wurde es als eine sporadisch auftretende Anomalie betrachtet, bei deren Entstehung keine genetischen, sondern Umweltfaktoren [29, 34] wie Gestationsdiabetes [29, 35] oder teratogene Substanzen wie Thalidomide [10, 29, 36, 37], suggeriert wurden. Es gelang jedoch nicht, Krankheit, teratogene Faktoren oder auch Drogenkonsum der Mutter während der Schwangerschaft, als ursächlich nachzuweisen [38]. Berichte familiärer Häufung des MRKH-Syndroms lenkten die Aufmerksamkeit wiederum auf einen genetischen Ursprung [36, 39]. Genetische Untersuchungen konzentrierten sich zunächst vor allem auf das AMH und dessen Rezeptor [40], da die Wirkung dieses Hormons eine entscheidende Rolle in der embryonalen Rückbildung der Müller-Gänge spielt. Es konnten jedoch keine genetischen Auffälligkeiten der AMH-Promoterregion oder des AMH-Rezeptors, mit dem MRKH-Syndrom in Verbindung gebracht werden. Auch der AMH-Serumspiegel war nicht erhöht [40, 41]. Vor allem Gene die bei der Entwicklung des Urogenitaltrakts im Mausmodell eine Rolle spielen, wurden näher untersucht [42]. Dabei handelte es sich unter anderem um die Familie der HOX (Homöobox)-Gene, welche zur embryonalen Gliederung und Organogenese, insbesondere zur Entwicklung des Genitaltraktes und der Differenzierung von Nieren und Skelett, erheblich beitragen [39]. Besonders die Gene HOXA10, HOXA11 und HOXA13 sollen eine Auswirkung auf den Uterovaginaltrakt haben und führen an Knockout-Mäusen zu einer fehlerhaften Entwicklung der Müller-Gänge [40]. Dennoch ist es nicht gelungen Anomalien in den HOX-Genen bei MRKH-Patientinnen zu identifizieren [43]. Auch andere Gene, wie PAX (Paired-

box) 2 [44] und WT 1 [45], die in die embryonale Entwicklung verwickelt sind, konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Analysiert wurden auch das Gen für die Galactose-1-phosphat Uridyltransferase (GALT) [46] und das Gen welches für den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) [47] kodiert und bei zystischer Fibrose mutiert ist. Beide Studien erbrachten ein negatives Ergebnis. Einzig das Wnt4-Gen konnte bisher anhand von Einzelfällen mit dem MRKH-Syndrom in Verbindung gebracht werden, allerdings in Assoziation mit einer Hyperandrogenämie [40, 48, 49]. Im Maus-Modell führt der Defekt des Gens u.a. zu einer rudimentären Entwicklung der Müller-Gänge [50]. Ein vor allem für diese Dissertation interessanter Aspekt wird in der Studie von Rall *et al.* 2011 beschrieben. Hier wurden Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) aus Mischgewebe rudimentärer Uterusknospen von MRKH-Patientinnen und normal entwickelter Uteri von Kontrollpatientinnen extrahiert und in einer Mikro-Array Analyse auf Expressions- und Methylierungsunterschiede untersucht. Auffälligkeiten fanden sich in für die embryologische Entwicklung des Genitaltraktes relevanten Genen, unter anderem für HOXA und Hormonrezeptoren. Eine Hypomethylierung und korrespondierende Überexpression zeigte sich unter anderem für HOXA9 [39]. Hierfür kommt eine durch eine Diethylstilbestrol (DES) -ähnliche Substanz bedingte Umverteilung vom üblichen HOXA9 Expressionsort der Tuben in den Uterus, als Ursache in Frage [39, 51]. Zum anderen wird auch ein fehlerhaftes HOXA10 [39], welches für die Entwicklung eines normalen Uterus notwendig ist [52, 53], für möglich gehalten.

Desweiteren wurde eine Überexpression der Hormonrezeptoren für Estrogen (ESR1) und Progesteron (PGR) im Vergleich zu Patientinnen mit normal entwickeltem Uterus entdeckt, was einen funktionellen Defekt der Hormonrezeptoren vermuten lässt [39]. Die wichtige Rolle unter anderem des ESR1 für die Entwicklung des Reproduktionstraktes zeigt sich am Maus-Modell, bei dem sich durch Ausschalten des Genes Uterus und Vagina nur hypoplastisch entwickeln [39, 54]. Darauf aufbauend untersuchte Rall *et al.* (2013) Uterusrudimente anhand von Gewebeschnitten kombiniert mit immunhistochemischen Färbungen, im Vergleich zu Uterusgewebe gesunder Kontrollpatientinnen. Zwar zeigte sich

kein Unterschied in der Expression von Hormonrezeptoren, jedoch gemessen an dem Marker Ki67 eine deutlich schwächere Proliferationsaktivität des Endometriums von MRKH-Patientinnen [28].

Als Ursache für das MRKH-Syndrom wird nach aktuellem Forschungsstand ein autosomal-dominanter Erbgang mit unvollständiger Penetranz und variabler Expressivität [1, 38], bzw. eine polygene und multifaktorielle Pathogenese [29, 36] vermutet. Fälle von diskordanten, monozygoten Zwillingen lassen die Mitwirkung epigenetischer Faktoren vermuten [28].

1.2.4 Wichtige Differentialdiagnosen

Hier sollen zwei wichtige Differentialdiagnosen des MRKH-Syndroms näher erläutert werden. Auf andere Differentialdiagnosen, zum Beispiel bezüglich der primären Amenorrhö wird nicht näher eingegangen. Die häufigste Fehldiagnose des MRKH-Syndroms, ist die Hymenalatresie; eine angeborene Fehlbildung des Hymens, bei der die Vagina vollständig durch ein nicht perforiertes Hymen verschlossen ist, während Uterus und Vagina normal entwickelt sind [25]. Dies zieht nicht selten den fehlerhaften Versuch der Hymenalinzision nach sich, was für die Patientinnen unnötig traumatisierend ist. Bei primärer Amenorrhö und zyklischen, vor allem zunehmenden Unterbauchbeschwerden sollte die Differenzialdiagnose zum MRKH-Syndrom möglich sein [4]. Eine weitere wichtige Differenzialdiagnose ist die komplette Androgenresistenz (früher: testikuläre Feminisierung), welche ebenfalls mit einer Uterus- und Vaginalaplasie einhergeht. Im Gegensatz zum MRKH-Syndrom liegt hier allerdings ein männlicher Genotyp (46, XY) mit fehlender oder reduzierter Pubarche vor (sog. „hairless women“) [25].

1.3 Der Uterus: Anatomie und seine Fehlentwicklung

Der Uterus gliedert sich in die Abschnitte Cervix uteri (Gebärmutterhals), Isthmus uteri und Corpus uteri (Gebärmutterkörper), dieser enthält das Uteruslumen (Cavitas uteri). Er lässt sich von außen nach innen in die Wandschichten Perimetrium (Tunica serosa), Myometrium (Tunica muscularis) und Endometrium (Tunica mucosa) unterteilen [55].

1.3.1 Endometrium

Das Endometrium stellt die Schleimhaut des Uterus dar und unterteilt sich in das konstante Stratum basale, welches an das Myometrium angrenzt und in das periodisch abgestoßene Stratum functionale. Das Stratum functionale schließt das Endometrium mit einer einschichtig-, prismatischen Epithelzellschicht zum Cavum ab. Die darunter liegenden endometrialen Drüsen und Gefäße werden von einem stützenden Zellverband aus endometrialen Stromazellen (ESC) umgeben [56]. Das Endometrium unterliegt den hormonellen Einflüssen des weiblichen Zyklus. Nach der Periodenblutung baut es unter Östrogeneinfluss aus dem stehengebliebenen Stratum basale, ein neues Stratum functionale auf (Proliferationsphase). Postovulatorisch beginnt unter einem hohen Progesteroneinfluss die Sekretionsphase des Endometriums, dessen Stratum functionale sich dann in ein unteres Stratum spongiosum und ein oberflächliches Stratum compactum unterteilen lässt. Das Stratum compactum besteht zum Großteil aus Stromazellen, welche sich für den Fall einer Implantation zu Prädeziduazellen differenzieren [55]. Im Rahmen dieses Prozesses, der sogenannten Dezidualisierung ist die Sekretion der Proteine Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) und Prolaktin charakteristisch [57, 58] [59] [60].

1.3.2 Myometrium

Das Myometrium bildet den größten Anteil am Aufbau der Uteruswand. Es besteht aus Schichten glatter Muskulatur [55], durchsetzt von gefäßführendem Bindegewebe und kann sich in einer Schwangerschaft durch Hyperplasie (Vermehrung-, sog. Proliferation) und Hypertrophie (Vergrößerung-) der Muskelzellen an das Größenwachstum den Feten anpassen [56].

1.3.3 Uterusrudimente

Im Aufbau von Uterusrudimenten lässt sich ebenfalls eine intakte Schicht Myometrium und gelegentlich auch eine Schicht Endometrium wiederfinden (s. Abb. 3). In der folgenden Abb. 4 eines Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnittes eines Uterusrudiments mit Gangstruktur, ist der Übergang von Myometrium in das drüsenreiche Endometrium gut zu erkennen. Allerdings be-

sitzt nicht jedes Rudiment eine Gangstruktur mit Endometrium. In der Studie von Rall *et al.* 2013, werden Uterusrudimente daher in vier Gruppen unterteilt: ohne Lumen, mit Lumen und tubarer Schleimhaut, mit Endometrium vom Basalis-Typ und mit Endometrium vom Funktionalis-Typ. Von 42 der hier untersuchten Rudimente, enthielten nur 17 endometriales Epithel und Stroma, unabhängig von der Zyklusphase war dies zum Großteil vom Basalis-Typ. Zusammen mit einer niedrigen Expression von Ki67 zeigt dies eine niedrigere Proliferationsaktivität des Endometriums in Uterusrudimenten im Vergleich zu den Uteri gesunder Kontrollpatientinnen [28].

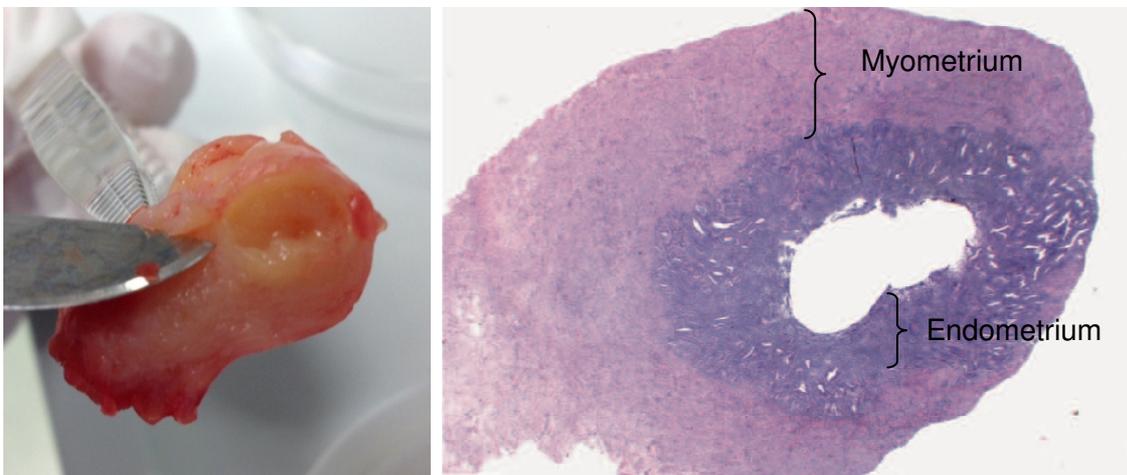


Abbildung 3: Makroskopie eines eröffneten Uterusrudimentes mit einer mit Endometrium ausgekleideten Gangstruktur (Quelle: Laboraufnahme).

Abbildung 4: Uterusrudiment mit Myometrium, deutlicher Gangstruktur und Endometrium, HE-Färbung, in 50-facher Vergrößerung aufgenommen [28].

1.4 Fragestellung

Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen, weder eine eindeutig genetische [40] oder epigenetische Ursache, noch Umweltfaktoren als Ursache für das MRKH-Syndrom zu identifizieren (s. 1.2.3). In einer an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen durchgeführte Mikro-Array Analyse zeigte sich unter anderem eine Überexpression von Hormonrezeptoren bei MRKH-Patientinnen, was als Kompensation aufgrund eingeschränkter Funktionsfähigkeit dieser Rezeptoren vermutet werden kann [39]. In der histologischen Studie von Rall *et al.* (2013) wurde in den Gewebeschnitten von MRKH-Rudimenten zwar kein quantitativer Unterschied der Hormonrezeptoren, zu gesunden Gewebe gefunden,

die vergleichsweise niedrige Proliferationsaktivität des Endometriums lässt ihre eingeschränkte Funktionsfähigkeit jedoch dennoch vermuten [28]. Diese Überlegung legte den Grundstein des ersten Teils der Dissertationsarbeit, in dem die Funktionalität der Hormonrezeptoren auf Proteinebene, mit Hilfe von Zellkulturen aus MRKH-Endometrium, analysiert und mit gesundem Kontrollgewebe verglichen werden sollte. Aufgrund der hormonell bedingten, ständigen zyklischen Veränderungen der Gebärmutter Schleimhaut [55], bietet die Zellkultur dabei die Möglichkeit einer von individuellen Schwankungen unabhängigen Untersuchung von Zellreaktionen auf genau festgelegte externe Stimuli [61]. Als experimenteller Ansatz diente die *in vitro* Dezidualisierung von ESC anhand der Protokolle nach Fluhr *et al.* (2006; 2008) [62, 63]. Als erster Schritt hierfür sollte im Rahmen dieser Arbeit die Kultivierung von ESC aus Uterusrudimenten von MRKH-Patientinnen etabliert werden. Desweiteren sollte ein Protokoll zur Kultivierung von myometrialen Primärkulturen aus Kontrollgewebe und MRKH-Rudimenten etabliert werden. Da die Überexpression von Hormonrezeptoren in der Studie von Rall *et al.* (2011) anhand einer Untersuchung von DNA und RNA aus nicht nach Endometrium und Myometrium isolierten Gesamtgewebe festgestellt wurde [39], sollten beide Gewebe auf ihre Rezeptorfunktion untersucht werden. Anhand myometrialer Primärkulturen sollte daher in einem zweiten Ansatz die Hormonrezeptorfunktionalität mittels hormoneller Stimulation und resultierender Proliferationsaktivität des Myometriums von MRKHs und Kontrollen untersucht und verglichen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte MRKH-Gewebe mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen auf die Proteine HOXA10, PAX8 und CD (Clusters of Differentiation) 31 untersucht und diese ebenfalls mit Kontrollgewebe gesunder Uteri verglichen werden. Da die Studie von Rall *et al.* (2011) eine Rolle der HOX-Gene in der Ätiopathogenese des MRKH-Syndroms vermuten lässt, sollte die Expression von HOXA10 in MRKH-Rudimenten untersucht werden. Desweiteren ist HOXA10 für die embryologische Entwicklung des Uterus entscheidend (s. 1.2.3) und wird auch im Endometrium des erwachsenen Uterus zyklusabhängig exprimiert, wo es in der mittleren sekretorischen Phase, einem charakteristischen Anstieg in den Drüsenzellen zeigt [64, 65]. Ein

entscheidendes Mitwirken von HOXA10 bei der Implantation und Dezidualisierung des Endometriums in der frühen Schwangerschaft wird vermutet [66]. Außerdem zeigen sich aberrante HOXA10-Expressionen bei Erkrankungen des weiblichen Reproduktionstrakts wie z.B. Endometriose [67], Karzinome [68] und Infertilität [66]. PAX8 ist bei dieser Untersuchung von Interesse, da es mit dem embryologisch relevanten PAX2 (s. 1.2.3) eng verwandt ist. Es wird bei der Entwicklung von Wolff-, Müller-Gang und Nieren, die in der Ätiopathogenese des MRKH-Syndroms eine Rolle spielt (s. 1.2.1), mit PAX2 co-exprimiert [69, 70]. Mit CD31, einem Marker für Blutgefäße, sollte die Angiogenese zwischen MRKH- und gesundem Kontrollgewebe verglichen werden. Hinweise hierfür lieferte die Studie von Rall *et al.* (2014), in der fünf MRKH-diskordante monozygote Zwillingspaare anhand von Blut, Speichel und uterinem Gewebe des betroffenen Zwilling, genetisch untersucht wurden. Hier konnte unter anderem der „Vascular endothelial growth factor (VEGF) C“, ein Regulator der Angiogenese, als möglicher Gen-Kandidat für das MRKH-Syndrom identifiziert werden [71].

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste

Siehe Anhang.

2.2 Methoden

2.2.1 Einverständniserklärung und Ethikkommission

Vor der Gewinnung von Studiengewebe, wurden die Patientinnen über die pseudonymisierte Verwendung und Asservierung von (Rest-) Gewebe zu Forschungszwecken aufgeklärt. Zusätzlich konnte nach deren Einverständnis Studienblut für die Tumorbank genetischer Studien entnommen werden. Alle Studienteilnehmerinnen haben der wissenschaftlichen Verwendung von Blut und Gewebe zugestimmt („Standardinformation und Einwilligungserklärung zur Entnahme und Aufbewahrung von Blut und (Tumor-) Gewebe im Rahmen ergänzender wissenschaftlicher Untersuchungen“ AZ 397/2006). Ein entsprechendes Votum zur Blut- und Gewebeentnahme, -Untersuchung, und -Asservierung lag von der Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen vor: Auf Basis des Ethikvotums AZ 397/2006 (überarbeitete Version vom 29. Oktober 2007) baute das bewilligte Ethikvotum von 2008 mit vorliegender Genehmigung zur Fortführung auf (Nr. 28/2008BO1). Im Schreiben der Ethikkommission vom 04.09.2012 wurde eine Verlängerung zugesagt. Im aktuellen Ethikvotum Tübingen Nr. 205/2014BO1 wurde im Schreiben vom 30.04.2014 einer Verlängerung zugestimmt.

2.2.2 Gewinnung von Studiengewebe

Bei jeder Gewebeentnahme (im Rahmen der operativen Therapie), wurde die zusätzliche Entnahme eines Wand-durchgreifenden Gewebestückes für die Kryokonservierung und -asservierung angestrebt. Pro Gewebe wurden bis zu vier Kryoröhrchen gefüllt und in Flüssigstickstoff für spätere Forschungszwecke aufbewahrt.

2.2.2.1 Kontrollgewebe und Patientenkollektiv

Für den Vergleich zu MRKH-Gewebe, wurde aus normal entwickelten Uteri prämenopausaler Frauen unter dem 45. Lebensjahr Kontrollgewebe gewonnen.

Bei ihnen erfolgte eine Hysterektomie (Entfernung des Uterus) aufgrund benigner Ursache (sog. hysterektomierte Kontrollpatientinnen), meist aufgrund eines Uterus myomatosus. Alle Studienteilnehmerinnen hatten einen regelrechten menstruellen Zyklus, keine relevanten Nebendiagnosen und 3 Monate vor der Uterusentnahme keine hormonelle Verhütung verwendet oder ein Intrauterin-pessar besessen, da durch diese die Uterusschleimhaut hypotroph oder atroph verändert werden könnte. Das Gewebe wurde aus dem nicht myomatös veränderten Bereich des Uterus entnommen. Patientinnen die an einer bekannten Endometriose und / oder Adenomyose litten, kamen für die Studie nicht in Frage. Das Einholen einer schriftlichen Einwilligung der Patientinnen und deren Aufklärung über die Verwendung eines Teiles des entfernten Gewebes zu Forschungszwecken wurden standardmäßig durchgeführt.

Den meist morcellierten Uteri von Kontrollpatientinnen nach Hysterektomie konnte in Absprache mit einem gynäkologisch spezialisierten Pathologen meist sowohl Endometrium, als auch Myometrium in ausreichender Menge, für eine Zellkultur entnommen werden.

2.2.2.2 MRKH-Gewebe

MRKH-Gewebe wurde durch eine laparoskopischen Uterusrudimententfernung, meistens im Rahmen einer Neovagina-Anlage, gewonnen. Die Rudimente wurden meist am Stück entfernt und das benötigte Gewebe mit sterilem Instrumentarium freipräpariert. In seltenen Fällen überschritten die Rudimente eine gewisse Größe und wurden bei der Entfernung morcelliert.

2.2.2.3 Hormonprofile und Zyklusphase der MRKH-Patientinnen

Da viele MRKH-Rudimente nicht genügend Endometrium hatten um die Zyklusphase histologisch zu bestimmen, wurde den MRKH-Patientinnen einen Tag vor oder nach der Operation peripheres Blut zur Hormonprofilbestimmung abgenommen. Aus den Blutseren wurden luteinisierendes Hormon (LH), follikelstimulierendes Hormon (FSH), Prog und E₂ mit einem Chemilumineszenz Immunoassay gemessen. Die Proliferationsphase (Zyklusphase 1) wurde durch ein Prog <2,5 ng/ml, die Sekretionsphase (Zyklusphase 2) durch ein Prog >5 ng/ml und einen LH:FSH Quotienten >1,5 definiert.

2.2.3 Reagenzien und Geräte für die Zellkultivierung

2.2.3.1 Kollagenase Typ IV (0,5 %)

Für die Herstellung einer Zellkultur wurde zum Herauslösen der Zellen aus ihrem Gewebsverband, 0,5 %ige Kollagenase-Lösung vom Typ IV benötigt. Um diese herzustellen wurde 1 g Kollagenaselyophilisat in 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) gelöst und in 40 x 250 µl Teilportionen aliquotiert, welche je 25 µg Kollagenase enthielten. Wurde ein 250 µl Aliquot zu 4750 µl normalen DMEM/F-12 (Dulbeccos modified Eagle serum: Nutrient Mixture F-12) Medium (ohne Zusätze) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, erhielt man 5 ml 0,5 %iger Kollagenase Typ IV. Die fertig beschriftete Kollagenase wurde bei -20 °C aufbewahrt und konnte unmittelbar vor dem Versuch aufgetaut werden.

2.2.3.2 Kollagenase Typ XI (10%)

Um eine Mischkultur aus Myometriummzellen anzufertigen, wurde Kollagenase vom Typ XI benötigt. Hierzu wurden 100 µg des Kollagenaselyophilisats in 1 ml PBS gelöst, in Anteilen mit je 100 µl auf Eppendorf Cups aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Enzymlösung 1 und 2 (Mischkultur)

Zur Myometriummkultivierung in einer Mischkultur benötigte man zwei verschiedene Enzymlösungen (s. Tab. 1):

Von Enzymlösung 1 wurden pro Kultur, 5 x 5 ml benötigt. Sie bestand aus HBSS-O (Hanks balanced salt solution without calcium and magnesium ions), welcher 0,1 mg Trypsin-EDTA(Ethylendiamintetraessigsäure)/ml, 5 µg DNase/ml und 2 % HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) hinzugegeben wurde. Die Reagenzien wurden, außer der DNase zusammen pipettiert und eingefroren. Die DNase wurde separat aufbewahrt und erst kurz vor dem Gewebeverdau hinzu pipettiert. Um das DNase-Lypholisat in Lösung zu bringen, wurden 0,5 mg davon in 500 µl 0,9 % NaCl gelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Enzymlösung 2 bestand aus HBSS-2 (Regular Hanks Salt Solution), welchem 2 mg Typ XI Kollagenase/ml (s. 2.2.3.2), 0,01 mg Typ 1 DNase/ml und

2 % HEPES hinzugegeben wurden. Pro Kultur wurden 1 x 5 ml dieser Lösung benötigt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Enzymlösungen 1 und 2 für die Ansetzung einer Mischkultur.

	Für 5 ml Enzymlösung 1	Für 5 ml Enzymlösung 2
DNase	25 µl	50 µl
HEPES	100 µl	100 µl
Trypsin/EDTA	1000 µl	
Kollagenase		100 µl
Typ XI (10 %ig)		
HBSS-0	3875 µl	
HBSS-2		4750 µl

2.2.3.4 Zellkulturmedium

Das Zellkulturmedium stellte eine Mischung verschiedener Reagenzien in flüssiger Form dar und bildete das Nährmedium für die Zellen. Seine Zusammensetzung bestand aus DMEM/F-12 (ohne Phenolrot) dem 10 % Fetales Kälberserum (FCS), 5 µg/ml Gentamycin und 1,1 % Antibiotikum/Antimykotikum zugefügt wurden.

Da FCS von Natur aus eine bestimmte Menge an Hormonen enthält, wurde bei hormonellen Stimulationsversuchen charcoal stripped FCS verwendet. In dieser Variante des FCS ist unpolares und lipophiles Material, wie z.B. die Hormone Estrogen und Progesteron, durch aktiviertes Karbon beseitigt. Dadurch wurde sichergestellt, dass es zu keinen Verfälschungen der Ergebnisse durch das Einbringen zusätzlicher, undefinierter Mengen an Hormonen über FCS kam.

Zu jedem Kulturgefäß, das der Zellaufbewahrung und -vermehrung diente, wurde die benötigte Menge Medium hinzu gegeben, um den Gefäßboden vollständig zu bedecken (s. Tab. 2):

Tabelle 2: Verwendete Kulturgefäße mit Flächenangabe und der benötigten Volumenge zur vollständigen Bedeckung.

Kulturgefäß	Fläche in cm²	Medium in ml
Kulturflasche	75 cm ²	10 ml
Kulturflasche	25 cm ²	5 ml
Petrischale	75 cm ²	10 ml
6-Well-Vertiefung	9,5 cm ²	1 ml
24-Well-Vertiefung	1,9 cm ²	0,4 ml

Vor der Herstellung bzw. Arbeit mit Zellkulturen sollten Lösungen mit denen gearbeitet wird vorher mindestens auf Raumtemperatur erwärmt werden.

2.2.3.5 Inkubator

Die Kultivierung der Zellen fand in einem Brutschrank (CO₂-Inkubator von Binder) in wasserdampfgesättigter Umgebung bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre statt, um die ideale Wachstums Umgebung zu schaffen.

2.2.4 Präparation von Uterusgewebe

Wurde ein Uterus im Rahmen einer Hysterektomie entfernt, durfte er nicht in Formalin gelangen, stattdessen wurde er (meist in bereits morcellierter Form) in die Pathologie gebracht, um das gewünschte Gewebe mithilfe eines Pathologen zu identifizieren und zu präparieren. Das Gewebe wurde bei Kontrollen stets fern von Myomen unter Anleitung eines Pathologen entnommen. Bei Erhalt eines MRKH-Rudiments wurde es zuerst in seiner Länge, Breite und Höhe vermessen (in cm). Anschließend wurde es mithilfe eines sterilen Skalpells eröffnet und in ca. 4 mm dicken Scheiben quer zur Längsachse lamelliert, da ein Cavum meist eine dezentrale Lage besaß.

2.2.4.1 Endometrium

Auf den meist morcellierten Uterusstreifen konnte die dünne, glänzende, rötliche Schleimhaut makroskopisch lokalisiert und mit einem Skalpell vorsichtig, oberflächlich von der darunter liegenden Myometriumschicht abgeschabt werden, um die Mitnahme der myometrialen Zellen zu vermeiden. Ziel war es möglichst viel Schleimhaut zu gewinnen, da das Zellwachstum bei zu geringer Zellmenge, durch mangelnde Zellkontakte ausbleiben konnte.

In MRKH-Rudimenten waren endometriale Anteile seltener makroskopisch zu erkennen. Konnte Endometrium identifiziert werden, wurde es ebenfalls mit einem Skalpell entfernt.

2.2.4.2 Myometrium

Die glatte Muskulatur der Gebärmutter war in der Regel in Kontroll-Uteri und oft auch in den MRKH-Rudimenten in ausreichender Menge vorhanden. Es konnte makroskopisch identifiziert und mit einem Skalpell herausgeschnitten werden. Bei der Präparation war es wichtig nicht in Myomnähe zu präparieren, um keine Myomanteile mit in die Kultur zu bringen (der Uterus myomatosus war eine häufige Ursache der benignen Hysterektomie). Myome konnten mit Hilfe der Beurteilung eines Pathologen durch ihre knorpelig, harte Struktur von dem weichen, gleichmäßig aufgebauten Myometrium abgegrenzt werden.

2.2.5 Endometriumkultur

2.2.5.1 Gewinnung endometrialer Stromazellen

Die Kultivierung von ESC wurde anhand des Protokolls von Fluhr *et al.* (2006; 2008) [62, 63] durchgeführt. Die abgetragene Uterusschleimhaut wurde in eine sterile Petrischale überführt und um Austrocknung zu vermeiden, sofort mit 5 ml 0,5 %iger Kollagenase-Typ IV- Lösung übergossen. Die Kollagenase ist eine Protease, welche die Zellen enzymatisch aus ihrem kollagenreichen Bindegewebsverband löst. Da sie am besten bei physiologischem pH-Wert und Körpertemperatur (37 °C) arbeitet, wurde die Petrischale für eine Stunde in einem Inkubator mit 37 °C und 5,0 % CO₂ inkubiert. Währenddessen wurde das Kollagenase-Gewebegemisch alle 15 min zunächst mit einer großen 5 ml und zuletzt mit einer kleinen 1 ml Pipette auf- und abpipettiert, um das Herauslösen der Zellen mechanisch zu unterstützen. Nach ca. einer Stunde sollte das Gewebe weitgehend homogen verdaut erscheinen (Gewebeschlieren, trübes Medium) und sich gut pipettieren lassen. War dies der Fall, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium abgestoppt. Die sich nun in der Petrischale befindliche Lösung wurde anschließend durch einen 40 µm Filter in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Der Filter sollte größere Zellen und Bindegewebsanteile zurückhalten, um eine möglichst reine

Kultur von ESC zu erhalten. Damit zurückgebliebene Zellen nicht verloren gingen, wurde die Petrischale mit 10 ml sterilem PBS durch Auf- und Abpipettieren ausgespült, welches hinterher ebenfalls durch den Filter in das Zentrifugenröhrchen gegeben wurde. Im Filter zurückgebliebenes Material wurde verworfen. Im Durchfluss befanden sich die ESC, die sich beim folgenden Zentrifugieren (300 g für 7 min) als Pellet absetzten. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen wurde, konnte das Zellpellet mit 1-2 ml Medium gelöst und in eine Petrischale oder Zellkulturflasche (ca. 75 cm²) ausplattiert werden. Damit die Schale komplett bedeckt war, wurden 10 ml Medium hinzugegeben und für ca. 40 min bei 37 °C inkubiert. Da sich Endometriumzellen früher absetzen und adhären werden, als zum Beispiel Myometriumzellen, wurde nach ca. 40 min, wenn unter dem Mikroskop bereits adhären Zellen sichtbar waren ein Mediumwechsel durchgeführt. Am darauf folgenden Tag waren in der mikroskopischen Kontrolle meist noch viele Erythrozyten in der Kultur sichtbar, weshalb eine ein- bis zweimalige Spülung mit 6 ml sterilem PBS und anschließende Zugabe von 10 ml Medium folgte. Die Zellkultur befand sich ab jetzt in der „Passage (P) 0“.

Die vollständige Beschriftung der Kulturschale enthielt neben der Passage, auch das aktuelle Datum, eine Bezeichnung der Gewebeherkunft („K“ für Kontroll- und „M“ für MRKH-Gewebe) und der Gewebeart (z.B. Myometrium oder Endometrium).

2.2.6 Myometriumkultur

2.2.6.1 Allgemein

Die Kultivierung von Myometrium wurde anhand des Protokolls von Kornyei *et al.* (1999) [72] durchgeführt. Es wurde sowohl das hier beschriebene Protokoll zur Herstellung einer Reinkultur welche überwiegend aus Myometriumzellen bestand, als auch die Herstellung einer Mischkultur, die einen ähnlichen Anteil von Myometriumzellen und Fibroblasten enthielt, angewendet.

2.2.6.2 Reinkultur

Von dem im Vergleich zur endometrialen Schleimhaut fester strukturierten Myometrium, wurde zunächst ein ca. 0,5-2 g schweres Stück aus dem ent-

nommenen Uterus oder Rudiment heraus präpariert und in einer sterilen Petrischale in 1-2 mm³ große Stückchen geschnitten. Nachdem 5 ml Kollagenase hinzugegeben wurden, wurde die Lösung über Nacht (ca. 12 h) bei 37 °C inkubiert, was zu dem ca. 90 %igen Anteil an Myometriummzellen in der Kultur beitrug. Am darauffolgenden Tag lösten sich die restlichen Gewebestückchen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Der Zell-Gewebe-Mischung wurden 5 ml Medium zum Stopp der Enzymaktivität der Kollagenase hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde durch einen 40 µm Filter gegeben, mit 10 ml PBS nachgespült und für 7 min bei 300 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet konnte nach Abnahme des Überstandes, mit 1-2 ml Medium gelöst und ausplattiert werden.

2.2.6.3 Mischkultur

Für die Herstellung einer Mischkultur wurden ca. 1-1,5 g der 1-2 mm großen Myometriummstückchen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen, mit 5 ml der Enzymlösung 1 gegeben und für 15 min bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurden Lösung und Gewebestückchen durch einen 40 µm Filter gegeben. Die im Filter zurückbleibenden Gewebestücke kamen erneut in ein 50 ml Falcon mit frischer Enzymlösung 1. Nach dem Vortexen folgte erneutes Inkubieren für 15 min bei 4 °C. Der Inkubationsvorgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt, beim vierten und fünften Mal je für 15 min bei 20 °C. Nach erneutem Filtrieren wurden die Gewebestücke in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Enzymlösung 2 gegeben und für 2 h, bei 37 °C inkubiert. Danach hatte sich das Gewebe weitestgehend gelöst. Die Lösung wurde erneut filtriert und das Filtrat zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nach drei maligem Waschen mit Zellmedium in eine Kulturflasche (75 cm²) mit 10 ml normalem Zellmedium ausplattiert. Der Anteil der Zelltypen ließ sich mit einer immunhistochemischen Färbung nachweisen.

2.2.7 Kultivierung von primären Zellkulturen

2.2.7.1 Mediumwechsel

Die fortschreitende Zellproliferation der Primärkulturen wurde alle 3 Tage mikroskopisch beurteilt. Hatten die Zellen noch keine Konfluenz erreicht, wurde ein

Mediumwechsel durchgeführt, indem das alte Medium ab- und frisches hinzu pipettiert wurde.

2.2.7.2 Passagierung

Sobald sich in der Petrischale ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, was bei Kontrollgewebe ca. 7 Tage dauerte, konnten die Zellen weiterverarbeitet werden. Dazu mussten sie wieder von der Petrischale gelöst werden. Diese wurde zunächst mit 6 ml sterilem PBS gespült, um tote Zellen und eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin hinzu pipettiert (der Boden der Petrischale musste vollständig bedeckt sein) und bei 37 °C inkubiert. Nach ca. 10 min hatten sich die Zellen durch die enzymatische Wirkung des Trypsins vom Boden abgelöst. Dies wurde zusätzlich durch kurzes Auf- und Abpipettieren des Trypsins über den Kulturboden, bzw. seitlich, manuelles Abklopfen bei Kulturflaschen, mechanisch unterstützt. Die enzymatische Wirkung wurde anschließend mit der Zugabe von Medium abgestoppt, dabei handelte es sich jeweils um die doppelte Menge des Trypsins. Die Zellsuspension konnte nun in bis zu drei Teile gesplittet werden, um sie beispielsweise einzufrieren, oder weiter zu kultiviert. Die Zelllösung wurde dazu in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 10 min bei 1200 Umdrehungen pro min (U/min) zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet konnte nach dem Abpipettieren des Überstands mit 1-3 ml Medium gelöst und nun auf die für Versuche vorgesehenen Gefäße verteilt werden. Dabei wurde die Zellkultur in die „Passage 1“ (P1) überführt (bei jeder weiteren Zellpassagierung wurde eine Passage hinzugezählt). Ob sich beim Vorgang der Trypsinierung, alle Zellen gelöst hatten wurde mikroskopisch kontrolliert. War ein Großteil der Zellen nicht gelöst, konnte eine weitere Trypsinierung für 5 min durchgeführt werden.

2.2.7.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für spätere Versuche aufzubewahren, konnten sie eingefroren werden. Das benötigte Einfriermedium erhielt man nach folgendem Pipettierschema: 70 % Zellkulturmedium, 20 % FCS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Beim Splitten einer Zellkultur, wurde der einzufrierende Teil nach dem Abstoppen der Trypsinierung in ein separates Röhrchen pipettiert und zentrifu-

giert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1-2 ml Einfriermedium gelöst und in ein Kryoröhrchen pipettiert (ein Drittel einer Kultur pro Kryoröhrchen). Die Röhrchen wurden schnell eingefroren, da das DMSO bei Raumtemperatur cytotoxisch wirkt. Um die Zellen schonend einzufrieren, wurde es in drei Temperaturschritte unterteilt: zuerst bei -80 °C in einer speziellen Einfrierbox für Kryoröhrchen (für schonendes Herunterkühlen), danach bei -80 °C in einem normalen Aufbewahrungskarton und anschließend in -150 °C kaltem Stickstoff, wo sie gelagert wurden.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstoff geholt und auf Eis transportiert, um sie anschließend im 37 °C warmen Wasserbad aufzutauen. Die aufgetauten Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und mussten zügig aus dem DMSO-haltigem Milieu entfernt werden. Dazu wurden sie zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das zurück bleibende Pellet in 10 ml vorgewärmten Kulturmedium gelöst. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Schrittes konnten die Zellen in ein Kulturgefäß ausplattiert werden.

2.2.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Für das Einsetzen einer bestimmten Zellzahl in den Stimulationsversuchen wurden die Zellen zunächst abtrysiniert und zu einem Pellet zentrifugiert. Dieses Pellet wurde nun in einer bestimmten Menge Medium (0,1-2 ml) zu einer Zellsuspension gelöst, wovon 20 µl entnommen und mit 20 µl Trypanblau gemischt wurden. Die entstandene Mischung wurde je in das obere und untere Zählkreuz einer Neubauer Zählkammer, seitlich aufpipettiert und saugte sich durch die Kapillarkraft in den Raum zwischen Zählkammer und Deckglas. Pro Zählkreuz wurden 4 große Quadrate (bestehend aus je 16 kleinen Quadraten) ausgezählt. Der Mittelwert wurde verdoppelt (aufgrund der 1:1 Verdünnung mit Trypanblau), mit der Menge an Medium (in ml) mit der das Pellet gelöst wurde multipliziert, und mit 10 000 (dem Faktor der Neubauer-Zählkammer) multipliziert. Die Berechnung des Mittelwerts zwischen oberen und unteren Zählkreuz, vergrößerte die Genauigkeit der ermittelten Zellzahl.

2.2.8 Immunhistochemische Färbung: Spezifische Antikörper und Zielantigene

Die immunhistochemische Färbung diente der Identifikation der einzelnen Gewebe-Zelltypen in einer Zellkultur. Diese enthalten je typische Zellbestandteile, deren Antigene mit spezifischen Antikörpern (AK) markiert werden konnten.

Folgende AK wurden verwendet:

2.2.8.1 CD10

CD 10: Der „monoclonal Mouse Anti-Human CD10“ - Erstantikörper (1. AK) markiert das zu der Familie der Typ-II-Transmembran-Metalloproteasen gehörende 90-100 kDa Protein Neprilysin, welches unter anderem in ESC vorkommt. Als zweckmäßiger Marker für ESC spielte CD10 [73], vor allem in der Ermittlung ihres Anteils in einer Endometriumkultur eine große Rolle.

2.2.8.2 Aktin

Aktin: Der „monoclonal Mouse Anti-Human smooth muscle actin“ – 1. AK markiert das zytoplasmatische Aktinprotein (gehört zum Mikrofilamentsystem der Zellskelettproteine). Es kommt unter anderem in Zellen der glatten Muskulatur vor. Der AK wurde bei Myometrium- und Endometriumkulturen verwendet.

2.2.8.3 Pan Cytokeratin

Pan Cytokeratin (pCK): Der „monoclonal Mouse Anti-Human pCK“ – 1. AK markiert eine große Breite an verschiedenen Epithelgeweben, unter anderem endometriale Epithelzellen und wurde daher sowohl für die Endometrium- als auch für die Myometrium-Mischkultur verwendet.

2.2.8.4 Collagen Type 1

Collagen Type 1 (CT1): Der „monoclonal Mouse Anti-Collagen Type 1“ – 1. AK markiert das von Fibroblasten produzierte Typ-1-Kollagen der extrazellulären Matrix und kam vor allem bei Myometrium-Mischkulturen zum Einsatz.

2.2.8.5 Estrogenrezeptor

Estrogenrezeptor (ESR1): Der „monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α “ – 1. AK markiert Östrogenrezeptor- α -positive Zellen in einem nukleären Färbemuster.

2.2.8.6 Progesteronrezeptor

Progesteronrezeptor (PGR): Der „monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor“ – 1. AK markiert PGR in einem nukleären Färbemuster.

2.2.8.7 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Vor der Färbung wurden die Zellen in die vorgesehenen Gefäße ausplattiert und bis zu ihrer Konfluenz kultiviert. Bei der sogenannten Deckglasfärbung wurden auf einer 6-Well-Platte je ein Deckgläschen pro Well verteilt, um hierauf die Zellen zu pipettieren und zu kultivieren. Auch hier fand während des Zellwachstums alle drei Tage ein Mediumwechsel (mit normalem FCS) statt. Waren die Wells vollständig bewachsen, begann der erste Teil der Färbung. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und jedes Well drei Mal mit 2 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 1 ml -20 °C kaltem Methanol pro Well und 10 minütiger Inkubation bei -20 °C, fixiert. Nach dem Abpipettieren des Methanols, folgte ein erneutes dreimaliges Spülen mit PBS und ein anschließendes Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit je 1ml Blocking solution (BS). Die BS wirkte für 10 min im Dunkeln, bei Raumtemperatur. Anschließend wurde sie abgenommen und durch die Antikörperlösung ersetzt. Diese wurde durch die Verdünnung der Antikörper mit BS angesetzt, dessen Verdünnungsschema in Tabelle 3 dargestellt ist. Um den Boden der Wells vollständig zu bedecken wurden jeweils 500 µl Antikörperlösung benötigt.

Tabelle 3: 1. AK-Verdünnungen bei immunhistochemischer Färbung.

1. AK	Zielstruktur	Verdünnung	Für 500 µl:
ESR	Östrogenrezeptoren	1:50	10 µl AK : 490 µl BS
PGR	Progesteronrezeptoren	1:50	10 µl AK : 490 µl BS
CD10	Endometriale Stromazellen	1:100	5 µl AK : 495 µl BS
Aktin	Glatte Muskelzellen	1:100	5 µl AK : 495 µl BS
panCK	Epithelzellen	1:200	3 µl AK : 597 µl BS
CT1	Bindegewebszellen	1:1000	2 µl AK : 1998 µl BS

Die Zusammenstellung der benötigten AK musste an das zu untersuchende Gewebe und die Fragestellung angepasst werden. Zudem wurde immer eine zusätzliche Negativkontrolle durchgeführt, indem ein Well keinen 1. AK erhielt

und in der später folgenden Fluoreszenzmikroskopie kein Signal liefern sollte. Dies diente zum Ausschluss unspezifischer Bindungen und Signale.

Der Erstantikörper inkubierte über Nacht, im Dunkeln bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde die Lösung abpipettiert und jedes Well drei Mal mit 2 ml PBS gespült. Der Zweitantikörper (2. AK) Alexa Fluor 594 Goat Anti-mouse IgG wurde 1:100 mit Blocking solution verdünnt. Pro Well wurden davon 500 µl Antikörperlösung angesetzt. Ausgenommen war die panCK-Färbung, da hier der 2. AK bereits in der Lösung des 1. AK mit enthalten war. Der 2. AK inkubierte für 30 min, im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde er abgenommen und die Deckgläschen mithilfe einer Pinzette und eines Skalpell aus der Well-Vertiefung herausgehoben und umgedreht auf ein Deckgläschen mit einem Tropfen Vectashield platziert, sodass die Zellen mit dieser Lösung in Kontakt kamen. Die Vectashield-Lösung diente der Färbung der Zellkerne.

Die Objektträger konnten nun unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Anhand des sog. DAPI-Filters (4',6-Diamidin-2-phenylindol) konnte durch die Vectashield-Färbung das Areal mit den meisten Zellkernen identifiziert werden. An einem möglichst zeldichtem Bereich wurde dann der für den zu untersuchenden AK entsprechenden Filter eingestellt (GFP (Grün fluoreszierendes Protein) bei pCK und Cy3.5 (Cyanine 3.5) bei den anderen). In der korrekten Filtereinstellung wurden die fluoreszierenden Zellen fotografiert.

Alternativ konnte anstatt der 6-Well-Platte auch ein Chamber slide verwendet werden. Es besteht bereits aus einem Objektträger der in acht Kammern geteilt ist in welche die Zellen direkt ausplattiert wurden. Die Färbung erfolgte nach demselben Vorgang, allerdings wurden weniger Zellen und nur 100 µl der Antikörperverdünnung benötigt, um den Boden einer Kammer zu bedecken.

2.2.8.8 Positiv- und Negativkontrolle für Hormonrezeptorfärbungen

Die Funktionalität der immunhistochemischen AK für Estrogen- und Progesteronrezeptoren wurde mithilfe einer Positiv- und einer Negativkontrolle überprüft. Als Negativkontrolle wurden MDA-MB-231-Zellen aus einer Zelllinie verwendet, da diese keine Hormonrezeptoren exprimieren. Das Ergebnis sollte hier folglich negativ sein, um unspezifisches Binden und Anfärben der AK auszuschließen. Für die Positivkontrolle wurden MCF-7 (Michigan Cancer Founda-

tion-7) Zellen verwendet, da hier die Existenz von Estrogenrezeptoren bekannt ist. Hier sollte das Ergebnis positiv sein, um von spezifischen Binden und Anfärben der AK ausgehen zu können.

2.2.9 Hormonelle Stimulation endometrialer Zellen

2.2.9.1 Dezidualisierung *in vitro*

Sie wurde nach dem Protokoll von Fluhr *et al.* (2006; 2008) [62, 63] durchgeführt. Hierbei wurden ESC hormonell stimuliert woraufhin sie unter anderem die Proteine IGFBP-1 und Prolaktin produzieren und in ihr Medium abgeben sollten. Die Konzentrationen sollten mithilfe eines ELISAs (Enzyme-linked Immunsorbent Assay) gemessen und die Ergebnisse von MRKH- und Kontrollen verglichen werden. Um sicherzustellen, dass die gemessenen Effekte der hormonellen Stimulation zuzuordnen sind, gab es für jeden Ansatz eine nicht-stimulierte Kultur als interne Kontrolle die ebenfalls über ELISA ausgewertet wurde. Für die Dezidualisierung wurden ausschließlich Zellen aus P1 verwendet. Sobald die Zellen in der Petrischale konfluent waren, wurden sie an „Tag 0“ (d 0) abtrypsiniert und gezählt, um anschließend auf einer 24-Well Platte mit je 100 000 Zellen pro Well ausplattiert zu werden. Je nach Zellmenge wurden mindestens zwei („Duplikate“) bis maximal vier („Quaduplikate“) Wells pro unstimulierte und pro hormonbehandelter Zellprobe ausgesät. Parallel hierzu wurden die restlichen Zellen für eine immunhistochemische Färbung verwendet, um die Reinheit der Kultur zu bestimmen und das Vorhandensein von Hormonrezeptoren zu untersuchen.

An „Tag 1“ (d 1) hatten sich die inkubierten Zellen am Boden abgesetzt und die Überstände wurden in Eppendorf cups pipettiert und bis zur Auswertung bei -80 °C gelagert. Da es sich hier um die Überstände des Mediums handelte dem noch keine Hormone zugegeben wurden, wurden sie als Überstand des Vortags sog. „d 0“ weggefroren. Als Referenz erhielten die nicht-hormonell behandelten Zellen pro Well 0,4 ml normales Medium. Für die zu behandelnden Zellen wurde eine Hormonlösung angesetzt, die 1 µmol/l Progesteron und 30 nmol/l beta-Estradiol enthielt. Um 1 ml der Hormonlösung zu erhalten wurde folgender Ansatz pipettiert:

996 μ l Medium

3 μ l E₂ 10 mM Hormonlösung (zuvor 1:1000 verdünnt)

1 μ l Prog 1 mM Hormonlösung (bzw. 10 mM Hormonlösung, 1:10 verdünnt)

Die Stammlösungen der Hormone wurden bei -20 °C aufbewahrt und ihre Verdünnung stets frisch mit Medium angesetzt. Das verwendete Medium wurde in diesen Versuchen mit charcoal stripped FCS angesetzt, damit es zu keinen Verfälschungen der Ergebnisse durch das Einbringen zusätzlicher, undefinierter Mengen an Hormonen über FCS kam (s. 2.2.3.4). Diese Hormonlösung wurde an Tag 3 (d 3), Tag 6 (d 6) und Tag 9 (d 9) erneuert, die jeweiligen Überstände vorher abgenommen und eingefroren. Die Stimulation war an d 9 abgeschlossen und die Zellen konnten abtrysiniert und für andere Versuche neu ausplattiert, oder eingefroren werden.

2.2.9.2 ELISA: Ansetzen von Reagenzien

Reagenz Diluent (RD): das RD wurde für verschiedene Verdünnungen und das „Blocken“ (unspezifischer Bindungen auf) der Platte benötigt. Für die Versuche mit IGFBP-1 und Prolaktin wurde jeweils das hierfür angesetzte RD verwendet. Für IGFBP-1 wurde einer bestimmten Menge PBS, 5 % Tween 20 hinzugegeben. Das RD für Prolaktin bestand aus PBS mit 1 % Bovine serum albumin (BSA).

Waschpuffer: Dieser war für die Reinigungsschritte der Platte notwendig. Um ihn herzustellen wurde einer bestimmten Menge PBS (z.B. 1 l) 0,05 % Tween 20 hinzugegeben (hier: 0,5 ml).

Standard Lösung: Sie stellte den Standard mit einer bestimmten Konzentration von humanen IGFBP-1 bzw. Prolaktin dar. Hiermit ließ sich eine standardisierte Verdünnungsreihe herstellen. Löste man die gelieferte Lyophilisatmenge des IGFBP-1-Standards in 0,5 ml RD, erhielt man den Standard mit einer Konzentration von 85 ng/ml. Diese Lösung wurde in 6 x 80 μ l aliquotiert und bei -70 °C aufbewahrt. Für die Verdünnungsreihe pipettierte man 50 μ l der Standardlösung zu 2075 μ l RD und erhielt so die höchste Konzentration der Verdünnungsreihe mit 2000 pg/ml. Verdünnte man dies erneut 1:1, erhielt man die nächste Verdünnung mit 1000 pg/ml. Nach 5-maligem Wiederholen ergab sich die Verdünnungsreihe die, wie in Tab. 4 beschrieben, in aufsteigender Konzentration in die

ersten 2 Spalten die 96-Well-Platte des ELISAs pipettiert wurde. Selbiger Ablauf erfolgte für die Verdünnungsreihe von Prolaktin (s. Tab. 4). Hierbei wurde die Standardlösung (150 ng/ml) durch die Zugabe von RD auf eine Konzentration von 1000 pg/ml gebracht und diese Lösung anschließend unter sechs maliger Wiederholung 1:1 mit RD verdünnt.

Tabelle 4: Pipettierschema der Verdünnungsreihe für ELISA-Messungen.

Pipettierschema der Verdünnungsreihe	Konzentration (pg/ml)	
	IGFBP-1	Prolaktin
1. Well	31,25	15,5
2. Well	62,5	31
3. Well	125	62
4. Well	250	125
5. Well	500	250
6. Well	1000	500
7. Well	2000	1000

2.2.9.3 Durchführung: ELISA

Mithilfe des ELISAs konnten die Konzentrationen von IGFBP-1 und Prolaktin der Zellüberstände, gemessen werden. Dazu wurde die Platte am Vortag mit je 100 µl von zuvor verdünnten „Capture Antibody“ pro Well beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Mit je 400 µl Waschpuffer pro Well wurde die Platte am darauffolgenden Tag drei Mal gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken der Platte indem jedem Well 300 µl RD zugefügt wurde, was anschließend für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das ganze erneut gewaschen wurde (s.o.) konnten die zu messenden Proben auf die Platte pipettiert werden:

In die ersten zwei Reihen wurde die Standardlösung in einer Verdünnungsreihe mit aufsteigender Konzentration pipettiert (s. Tab. 4).

Die Zellüberstände mussten für die IGFBP-1-Messung nach dem Auftauen zunächst 1:10 und 1:100 mit RD verdünnt werden. Die Proben der jeweils stimulierten Tage d 6 und d 9 wurden zusätzlich 1:1000 verdünnt, um ihre Konzentration in den Messbereich des ELISAs zu bringen. Für die Messungen von Prolaktin konnten die Überstände unverdünnt verwendet werden. Anschlie-

ßend wurden je 100 µl einer Probe in ein Well pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während allen Inkubationsschritten, war die Platte zum Schutz mit Parafilm bedeckt. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde jedem Well 100 µl „Working Dilution“ (Streptavidin-HRP) zugegeben und die abgedeckte Platte für 20 min, bei Raumtemperatur, ohne direktes Licht inkubiert. Darauf folgend wurde die Platte ein weiteres Mal gewaschen (s.o.) und mit je 100 µl „Substrat Solution“ versehen, welche ebenfalls 20 min, bei Raumtemperatur, ohne direktes Licht inkubierte. Anschließend wurde in jedes Well zusätzlich 50 µl „Stop Solution“ pipettiert. Die Platte wurde nun von einem Plattenreader, bei einer Wellenlänge von 450 nm gelesen. Durch die Verdünnungsreihen des Standards erstellte der Plattenreader eine Standardkurve und rechnete die gemessenen Extinktionen der Überstände in Konzentrationswerte (pg/ml) um.

2.2.9.4 Dezidualisierungseffekt

Der von den Duplikaten der Überstände unstimulierter Zellen von d 0, 3, 6 und 9 berechnete Mittelwert wurde von den Mittelwerten der stimulierten Zellen subtrahiert. Die so ermittelte Kurve einer Zellkultur zeigte den Dezidualisierungseffekt und konnte mit anderen verglichen und mit den Werten der anderen Proben aus Kontroll- bzw. MRKH- Gewebe zusammengefasst werden.

2.2.10 Hormonelle Stimulation myometrialer Zellen

2.2.10.1 Allgemein

Auch Myometrium ist durch Hormone stimulierbar, wie man es beispielsweise an der Zellhypertrophie (Größenzunahme der einzelnen Zellen) und -Hyperplasie bzw. -Proliferation (Zellvermehrung), während des Gebärmutterwachstums in der Schwangerschaft beobachten kann (s. 1.3.2). Beide Aspekte der Myometriumzellen wurden in Form von *in vitro* Stimulationsversuchen an Kontroll- und MRKH-Gewebe untersucht.

2.2.10.2 Giant cells

Wurden Myometriumzellen mit hohen Konzentrationen von Estrogen (220 nM) und Progesteron (800 nM) stimuliert, war laut dem Protokoll von Kornyei *et al.*

(1999) [72] vor allem eine Zellhypertrophie, also eine starke Größenzunahme der Zellen zu erwarten, sog. „Giant cells“. Für diesen Versuch wurden Zellen von Myometrium-Reinkulturen verwendet, von welchen je 5 000 Zellen in 400 μ l Medium pro Well, auf acht Wells einer 24-Well-Platte ausplattiert wurden, vier Wells für unbehandelte und vier Wells für stimulierte Zellen. Die Inkubation fand über 12 Tage unter dreitägigen Wechsel von Medium bzw. Hormonlösung statt. Das verwendete Medium wurde mit charcoal stripped FCS angesetzt. Die Hormonlösung wurde stets frisch angesetzt und enthielt Medium mit 220 nM Estrogen und 800 nM Progesteron. An d 9 und d 12 wurden je zwei Wells der behandelten und zwei der unbehandelten Zellen abtrypsinisiert, mit Trypan Blau angefärbt und in der Neubauer Kammer unter einem Mikroskop fotografiert. Anhand der Bilder konnten die Zellgrößen von stimulierten und nichtstimulierten Zellen, sowie Kontroll- und MRKH-Gewebe verglichen werden.

2.2.10.3 Proliferation Rein- und Mischkultur

Die Zellproliferation sollte anhand von Zellzählung bei hormonell stimulierten und nicht stimulierten Zellen ermittelt werden, mit dem Ziel die Ergebnisse von Kontroll- und MRKH-Gewebe zu vergleichen. Der Versuch wurde wie in dem Protokoll von Kornyei *et al.* (1999) beschrieben, mit Zellen aus Myometrium-Mischkulturen [72] und zusätzlich mit Zellen aus Reinkulturen durchgeführt. Pro Proliferationsversuch wurde auf 16 Wells eine bestimmte Zellzahl pro Fläche ausplattiert. Davon waren je acht Wells zu stimulieren und acht blieben unbehandelt (s. Abb. 5). Der Versuch wurde mit mehreren Zellzahlen pro Well (Zellen/cm²) durchgeführt, um die Zelldichte mit möglichst idealen Wachstumsbedingungen zu ermitteln. Für die Reinkultur wurden Zellzahlen von 3 500, 20 000 und 40 000 pro Well einer 24-Well Platte (2 cm²) getestet. Entsprechend der Dezidualisierung wurden die Zellen an d 0 ausplattiert und am darauffolgenden Tag das Medium bei unbehandelten Zellen durch frisches Medium und bei behandelten Zellen durch eine Hormonlösung ersetzt. Das verwendete Medium wurde mit charcoal stripped FCS angesetzt. Die Hormonlösung wurde stets frisch angesetzt und enthielt Medium mit 2,2 nM Estrogen. An d 3 wurden je zwei der behandelten und zwei der unbehandelten Wells abtrypsinisiert und ausgezählt. An den übrigen Wells erfolgte erneuter Me-

dium- bzw. Hormonlösungswechsel. Dieser Schritt wiederholte sich an d 6, d 9 und d 12. Aufgrund der Wachstumsinhibition durch Zellkontakt erfolgte der Versuch nur über 12 Tage. Die Proliferationsversuche mit Mischkultur-Zellen wurden im Rahmen dieser Dissertation ebenfalls mit 20 000 Zellen pro Well (entspricht 10 000 Zellen/cm²), nach demselben Stimulationsschema etabliert.

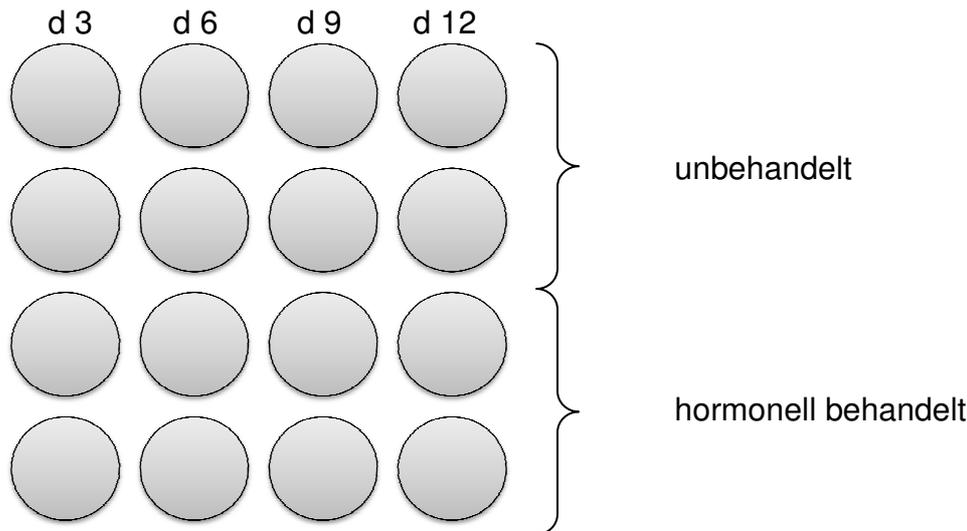


Abbildung 5: Beispielschema einer Zellproliferation: von den an d 0 ausplattierten Zellen werden an d 3, d 6, d 9 und d 12 je zwei Wells mit unbehandelten und zwei Wells mit hormonell behandelten Zellen abtrypsiniert und ausgezählt.

2.3 Gewebeschnitte: HOXA10, Pax8, CD31

2.3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bildeten 20 MRKH-Patientinnen im Alter zwischen 16 und 49 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 21 Jahren und 10 prämenopausalen Kontrollpatientinnen im Alter zwischen 37 und 51 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 40 Jahren. Von einer der MRKH-Patientinnen konnten zwei Uterusrudimente als Gewebeprobe verwendet werden, daher enthält das Studienset 21 MRKH-Fälle.

Mithilfe des Pathologieberichtes wurden ausschließlich MRKH-Proben in die Studie aufgenommen, in deren Gewebeschnitten neben Myometrium auch Endometrium eindeutig identifiziert wurde. Von den Proben der Kontrollpatientinnen enthielten gezielt fünf Proben proliferierendes und fünf sekretorisches

Endometrium. Die Zyklusphase des Endometriums wurde über Hormonprofile im Serum und durch einen gynäkologisch spezialisierten Pathologen histologisch anhand der Gewebeschnitte bestimmt. Die Gewebeschnitte des MRKH-Kollektivs enthielten von einer einzelnen Basalisschicht, bis zu sekretorischem Endometrium, jede Ausprägung von Endometrium, da es aufgrund seiner unterschiedlichen Ausprägung und oft mangelhaften Ausbildung nicht möglich war auch hier ein Studienset zu erstellen, das 50 % proliferierendes und 50 % sekretorisches Endometrium enthält.

2.3.2 Anfertigung und Färbung der Gewebeschnitte

Die Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte gefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, um Präparate mit durch Endometrium ausgekleideten Gangstrukturen besser zu identifizieren. Für die immunhistochemische Färbung wurden 2,5 µm dicke Gewebeschnitte auf Superfrost Glasobjektträger aufgezogen und mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Sie benötigten abhängig vom zu untersuchenden Antigen verschiedene Vorbehandlungen.

Für CD31 und Pax8 wurde die immunhistochemische Färbung mit dem automatisierten Färbesystem Ventana BenchMark XT durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit der trisbasierten Cell Condition Solution 1 (CC1) (Ventana Medical Systems) zur Demaskierung von Antigenen für eine Stunde Hitze vorbehandelt. Der polyklonale rabbit-AK Pax8 und der monoklonale mouse-AK CD31 wurden in einer mit Antibody-Diluent hergestellten 1:100 Verdünnung eingesetzt. Die Färbung erfolgte mithilfe des iView-DAB Detection-Kit in der Ventana BenchMarkXT.

Für die Färbung mit dem polyklonalen goat-AK HOXA10 erfolgte nach der Entparaffinierung, die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit Wasserstoffperoxid (30 %ig), um unerwünschte Hintergrundfärbungen zu reduzieren. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 min bei 120 °C im Dampfdrucktopf, in TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)/EDTA/Citrat (TEC)-Puffer zur Antigen-demaskierung Hitze vorbehandelt. Für die Ansetzung von 1 l TEC-Puffer Stammlösung wurden 2,5 g Tris-base, 5 g EDTA, 3,2 g tri-Na-Citrat Dihydrat zu

1000 ml destillierten Wasser gegeben und mit 10 M NaOH (Natronlauge, erstellt aus NaOH-Plätzchen) auf pH 9 eingestellt. Für die Gebrauchslösung erfolgte eine 1:10 Verdünnung. Nach 5 min Spülung mit Waschpuffer wurde der HOXA10-Primärantikörper in einer 1:200 Verdünnung mit Antibody-Diluent eingesetzt und für 30 min inkubiert. Es folgte eine Spülung mit Waschpuffer für 5 min. Anschließend wurde unter Verwendung des Goat HRP Polymer Kit (Zytomed Systems) der Brücken-AK für 30 min inkubiert, danach für 5 min mit Waschpuffer gespült, anschließend erfolgte die Konjugation mit Goat-on Rodent Horseradish Peroxidase (HRP) für 30 min. Danach folgten Spülen mit Waschpuffer für 5 min und Auftragen der 3,3'-Diaminobenzidin(DAB)-Substrat-Arbeitslösung (DAB Substrate Kit) und Inkubation für 2x5 min, anschließend erneutes Spülen mit Waschpuffer für 5 min. Die Gegenfärbung erfolgte mit Papanicolaou Lösung nach Harries. Nach Dehydrierung der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Eindeckung mit dem Eindeckmedium Cytoseal XYL.

2.3.3 Antikörper und ihre Zielstrukturen: HOXA10, Pax8, CD31

HOXA10 wird sowohl in endometrialen Stroma- und Drüsenzellen (letztere mit einem spezifischen Anstieg, während der mittleren Sekretionsphase) exprimiert und war daher im Endometrium auszuwerten. Desweiteren wurden auch Werte anhand des Myometriums ausgewertet.

Pax8 gehört zu den PAX-Transkriptionsfaktoren. Neben seinem üblichen Gebrauch in der Diagnostik von Ovarial- und Schilddrüsenkarzinomen, färbt es das endometriale Drüsenepithel an und wurde im Endometrium ausgewertet.

CD31 färbt Endothelzellen und ist daher für die Identifikation von Gefäßen und die Ausprägung der Angiogenese verwendbar. Die damit ermittelte Dichte von Gefäßanschnitten wurde in Endometrium und Myometrium ausgewertet.

2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der auf HOXA10 und Pax8 gefärbten Gewebeschnitte erfolgte mithilfe eines Durchlichtmikroskopes anhand der Klassifizierung des immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner (1987) [74]. Der IRS lässt

sich mit einem Punktevergabesystem, aus der Anzahl positiv gefärbter Zellen multipliziert mit der Intensität ihrer Färbung (s. Tab. 5 a-d) berechnen.

Tabelle 5 a-d: Bewertung und Berechnung der Einteilung Antikörper-gefärbter Gewebeschnitte nach dem immunreaktiven Score (IRS).

Farbintensität	
0	keine Reaktion
1	schwache Reaktion
2	mäßige Reaktion
3	starke Reaktion

Positive Zellen	
0	Keine
1	weniger als 10 %
2	zwischen 10 und 50 %
3	zwischen 51 und 80 %
4	Über 80 %

Immunreaktiver Score (IRS): Farbintensität x Positiv gefärbte Zellen				
Farbreaktion \ Pos. Zellen	keine (0)	schwach (1)	mäßig (2)	stark (3)
keine (0)	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
< 10 % (1)	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10-50 % (2)	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-80 % (3)	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> 80 % (4)	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Interpretation: Immunreaktiver Score (IRS)	
0 - 2	negativ
3 - 4	schwach positiv
6 - 8	mäßig positiv
9 - 12	stark positiv

Bei der Auswertung der CD31-Gewebeschnitte wurde das Präparat unter einem 40er Objektiv ausgewertet. Hierbei wurden alle Gefäßanschnitte gezählt, die in einem Gesichtsfeld sichtbar waren. Dieser Vorgang wurde jeweils für Endometrium und Myometrium, insgesamt viermal an verschiedenen Stellen des Präparats durchgeführt.

Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte von zwei unabhängigen Personen die den passenden Score bzw. die Anzahl der Gefäßanschnitte zuteilten.

2.4 Statistische Auswertung

2.4.1 Statistische Auswertung der Dezydualisierung

Um die Verteilung stetiger Merkmale zu charakterisieren, wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler für Prolaktin- und IGFBP-1-Konzentrationen der ESC-Überstände von MRKH- und hysterektomierten Kontrollpatientinnen berechnet und in Tabellenform angegeben. Berechnete Mittelwerte wurden grafisch in einem Liniendiagramm dargestellt. In der Darstellung der Mittelwerte der Gruppen „MRKH-“ und „Kontrollgewebe“ wurde zusätzlich der Standardfehler grafisch aufgezeigt. Unterschiede der Konzentrationswerte zwischen MRKH- und hysterektomierten Kontrollpatientinnen wurden mittels Wilcoxon-Rangsummentest geprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % gewählt.

2.4.2 Statistische Auswertung der HOXA10-, Pax8-, CD31-Studie

Für HOXA10 und Pax8 wurden Einzelwerte, arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der IR-Scores, für CD31 die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gefäßanschnitte von MRKH- und hysterektomierten Kontrollpatientinnen dargestellt bzw. berechnet und in Tabellenform angegeben. Unterschiede der Scores bzw. Mittelwerte der Gefäßanschnitte zwischen MRKH- und hysterektomierten Kontrollpatientinnen wurden mittels Wilcoxon-Rangsummentest geprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkultivierung und –verarbeitung

3.1.1 Anzahl der Zellkulturen

Im Rahmen der praktischen Arbeit dieser Dissertation sind folgende Primärkulturen erstellt und zu den oben beschriebenen Versuchen verwendet worden (s. Tab. 6):

Tabelle 6: Übersicht über kultiviertes Gewebe.

Kulturen aus gesundem Kontrollgewebe	50 Stück
- Endometriumkulturen:	34 (K 23 - 50, 55 - 57, 61, 63, 65)
• Dezidualisiert	13
• Zellen eingefroren	20
- Myometrium-Reinkulturen:	9 (K 52 - 54, 58 - 60, 62, 64, 66)
• Proliferation	8
• Giant cells	6
- Myometrium Mischkulturen:	7 (K 67 - 69, 72 - 75)
• Proliferation	3

Kulturen aus MRKH-Gewebe	34 Stück
- Endometriumkulturen „vor Optimierung“:	10 (M 6 - 15)
• Dezidualisiert	0
• Zellen eingefroren	8
- Endometriumkulturen:	14 (M 16, 24 - 26, 28, 30, 43-46, 50, 52, 56, 58)
• Dezidualisiert	11
- Myometrium-Reinkulturen:	7 (M 17 - 23)
• Proliferation	6
• Giant cells	5
- Myometrium Mischkulturen:	3 (M 27, 29, 30)
• Proliferation	2
• Zellen eingefroren	1

Für Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbung wurden zusätzlich MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen aus Zelllinien verwendet (humane Brustkrebszelllinien).

3.1.2 Erfolgreiche Kultivierung gesunden Kontrollgewebes

3.1.2.1 Endometriale Stromazellen

Die Kultivierung von endometrialen Stromazellen wurde erfolgreich etabliert, sodass nach Entwicklung eines standardisierten Vorgehens ab K 42 in allen Kulturen ein ESC-Anteil von im Schnitt $\geq 90\%$, sowie positive Hormonrezeptoren und nur ein geringer Anteil von Myometriumzellen erreicht werden konnte. Als Nachweis dienten hierzu die immunhistochemischen Färbungen und die erfolgreiche Stimulation der Zellen in der Dezidualisierung.

3.1.3.2 Myometrium-Rein- und Mischkulturen

Zu Beginn wurde die Herstellung einer Reinkultur aus Myometrium, parallel mit einem 2-stündigen Kollagenaseverdau und mit einem längeren Verdau über Nacht durchgeführt. Das Verfahren über Nacht erbrachte einen besseren Gewebsverdau und wie mit immunhistochemischen Färbungen festgestellt, einen höheren Myometriumgehalt. Es wurde daher als Standardmethode festgelegt.

Auch die Herstellung von Mischkulturen aus Myometrium wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die immunhistochemische Färbung erbrachte positive Ergebnisse für Myometrium, Fibroblasten und den Hormonrezeptor Progesteron (s. Abb. 6 a-c).

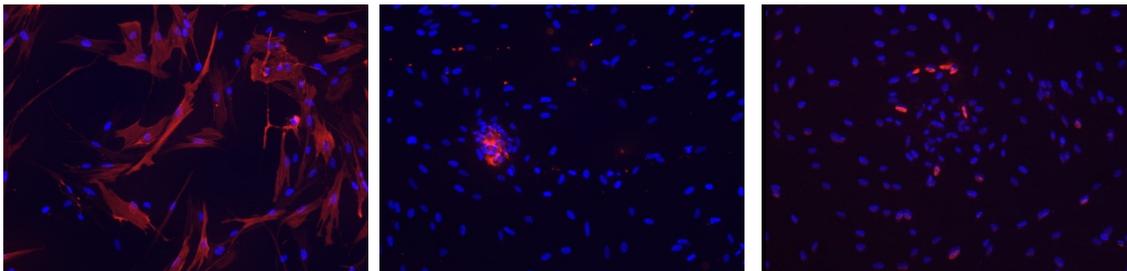


Abbildung 6 a-c: Immunhistochemische Färbungen der Mischkultur aus Myometrium: K69 P1. 6 a: Aktin, 6 b: CT1 und 6 c: Prog; jeweils mit DAPI-Färbung; in 100facher Vergrößerung aufgenommen.

3.1.3 Erfolgreiche Kultivierung von MRKH-Gewebe

Rudimentäres Uterusgewebe war in geringerer Menge verfügbar, als gesundes Kontrollgewebe. In der Regel war in einem Rudiment ausreichend Myometrium vorhanden, um eine Kultur herzustellen. Dagegen enthielt nur ein Teil der Rudimente Endometrium, das makroskopisch sichtbar und für die Herstellung ei-

ner Kultur ausreichend war. Zusätzlich war in Kulturen aus MRKH-Endometrium die Kontaminationsanfälligkeit, aufgrund ihres längeren Wachstumszeitraums bis zur erreichten Konfluenz höher. Die Anzahl endometrialer MRKH-Kulturen und -Dezidualisierungen ist in seiner Repräsentativität daher eingeschränkt.

3.1.3.1 Kultivierung endometrialer Stromazellen aus MRKH-Rudimenten

Zu Beginn war die Gewinnung von ESC aus MRKH-Rudimenten in Form eines geringen Anteils von ECS in Endometriumkulturen erschwert. Die Optimierung der Herstellung von Endometriumkulturen in Form folgender Faktoren, war daher ein entscheidender Teil dieser Arbeit: Präoperativ konnte der Befund der Magnetresonanztomographie, in dem die Dicke der zum Teil vorhandenen Endometriumschicht in Millimeter angegeben war, als prädiktive Information genutzt werden. Ein wichtiger Punkt war die Präparationstechnik der MRKH-Rudimente, welche quer zu ihrer Längsrichtung in ca. 4 mm dicke Schichten lamelliert wurden, da davon ausgegangen werden musste, dass ein mögliches Cavum mit Endometrium in seiner Orientierung zum Raum keinem erkennbaren Muster folgte (s. Abb. 7 a, b). Konnte makroskopisch Endometrium identifiziert werden wurde dieses nicht ausgeschnitten, sondern mit einem neuen (scharfen) Skalpell oberflächlich abgeschabt, um das Mitabtragen und Kultivieren von Myometriumzellen aus der darunterliegenden Muskelschicht zu vermeiden.

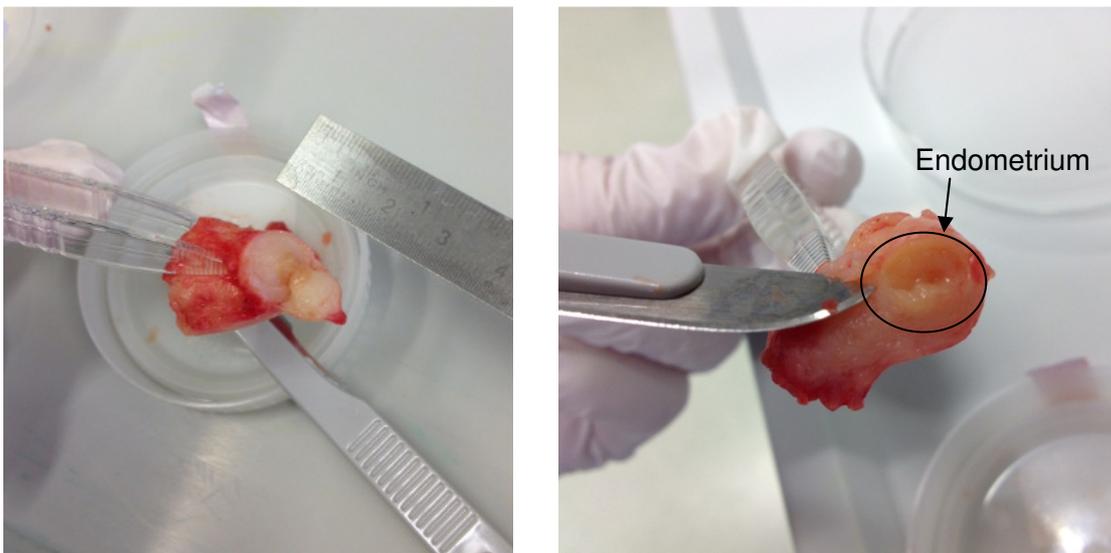


Abbildung 7 a, b: Beim Lamellieren eines Uterusrudiments stellt sich eine Gangstruktur mit deutlicher Endometriumschicht dar (s. Beschriftung) (Quelle: Laboraufnahme)

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten einen mit Kontroll-Zellkulturen vergleichbaren ESC-Gehalt und erstmals positive Hormonrezeptoren (PGR und ESR1) in den Endometriumkulturen aus MRKH-Rudimenten (s. Abb. 8 a, b):

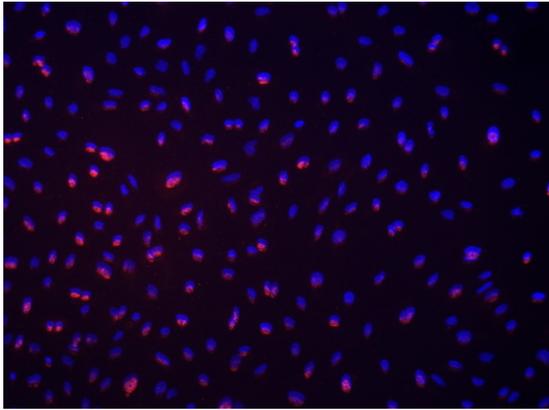


Abb. 8 a

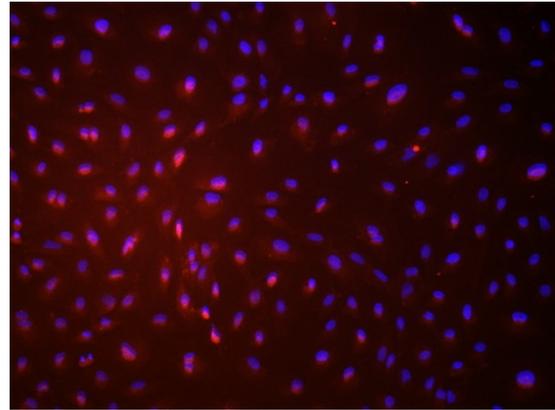


Abb. 8 b

Abbildung 8 a, b: 8 a: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (M 26) (aus MRKH-Gewebe) mit Prog (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; 8 b: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (M 26) (aus MRKH-Gewebe) mit E₂ (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; jeweils mit DAPI-Färbung; in 100facher Vergrößerung aufgenommen.

3.2 Immunhistochemische Färbungen

3.2.1 Erstantikörper und ihre Zielantigene

Die immunhistochemische Färbung stellte in der Identifikation des Gewebes ein wichtiges Verfahren dar. Mithilfe der Fotodokumentation wurde festgehalten, welche Zelltypen in einer Kultur enthalten waren. Alle Färbungen lieferten jeweils eindeutige Ergebnisse, ob und in welcher Quantität eine Kultur den zu bestimmenden Zelltyp bzw. im Fall von CT1 das von Fibroblasten produzierte Kollagen Typ 1 enthielt (s. Abb. 10-15). Sie zeigte Zellkerne in einer blau-, mit pCK gefärbte Epithelzellen in einer grün- und die restlichen Zellkomponenten (CD10, Aktin, CT1, E₂, Prog) in einer rot-fluoreszierenden Farbe (s.u.). Bei einer fluoreszierenden Färbung der Zellen, wurde die Färbung als positiv gewertet. Dennoch zeigten sich deutliche Schwankungen in der Expression der verschiedenen Antigene zwischen den Zellkulturen. Daher wurde die Quantität der jeweils gefärbten Zellbestandteile subjektiv mit 1-fach positiv für wenige, 2-fach

positiv für mehrere und 3-fach positiv für viele Zellen des gesuchten Typs bewertet. Dies wird am Beispiel von Aktinfärbungen in den Abbildungen Abb. 9 a-c verdeutlicht.

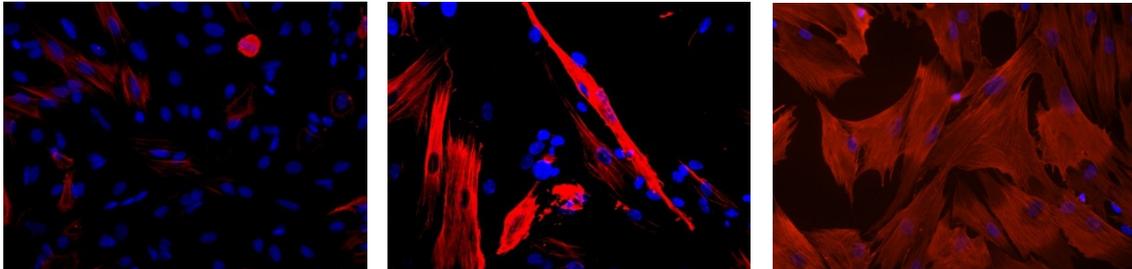


Abbildung 9 a-c: Immunhistochemische Färbungen glatter Muskelzellen mit Aktin (1. AK), zeigt 1-fach, 2-fach und 3-fach positiv, rot fluoreszierende Ergebnisse (von links nach rechts); in 200facher Vergrößerung aufgenommen; jeweils mit DAPI-Färbung.

Die CD10-Färbung (s. Abb. 10) zeigte, ob die Isolation von ESC erfolgreich war, was besonders bei MRKH-Kulturen von Bedeutung war.

Die pCK-Färbung (s. Abb. 11) diente der Abklärung, ob und welche Endometriumzellen in einer Kultur vorhanden waren.

Die Aktin-Färbung (s. Abb. 12) diente indirekt der Bestimmung des Reinheitsgrades einer Endometriumkultur, welcher im Schnitt bei $\geq 90\%$ lag, indem er in nur sehr geringem Ausmaß nachweisbar war. Desweiteren wurde Aktin zur Färbung von Myometrium-Rein- und Mischkulturen verwendet.

Die CT1-Färbung (s. Abb. 13) war für die Beurteilung, ob die Protokolle zur Herstellung der Myometrium-Rein- und Mischkulturen erfolgreich umgesetzt wurden notwendig. Reinkulturen enthielten fast ausschließlich Myometriumzellen (Aktin positiv, CT1 negativ), während Mischkulturen zusätzliche Zellen, darunter vor allem Fibroblasten (CT1 positiv) enthielten.

Die Färbungen mit E₂ markierten Estrogenrezeptor- α -positive Zellen (s. Abb. 14) und mit Prog markierten Progesteronrezeptoren (s. Abb. 15), in einem nukleären Färbemuster.

Ergebnisse

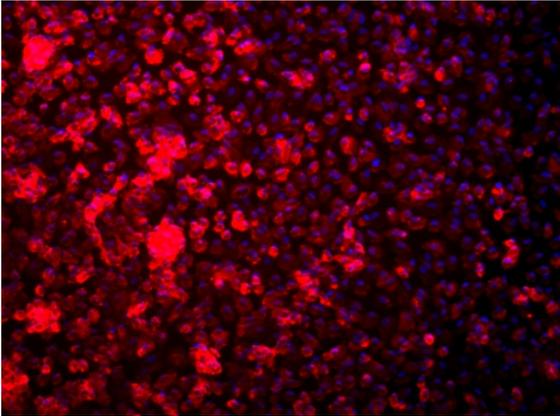


Abb. 10

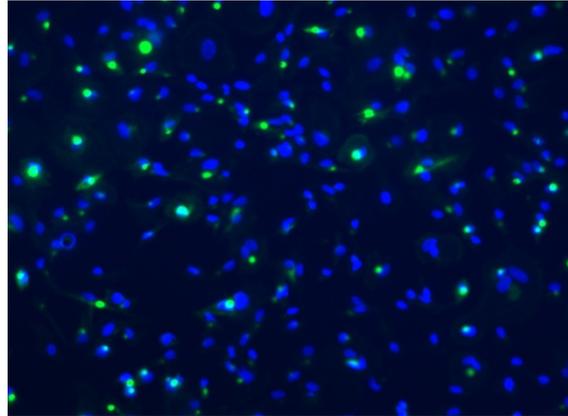


Abb.11

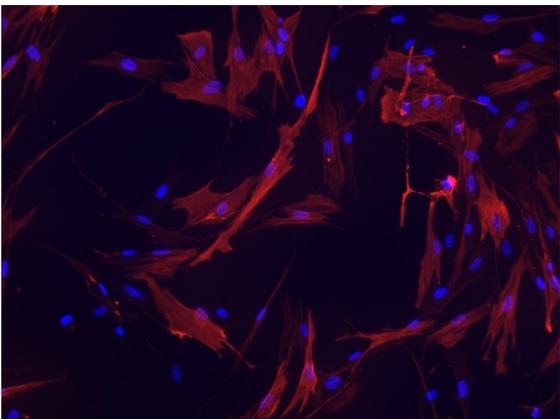


Abb. 12

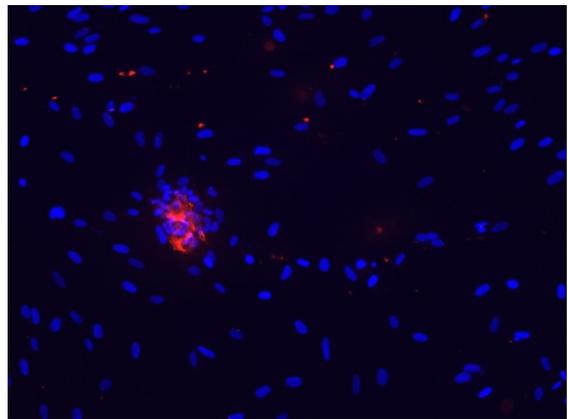


Abb. 13

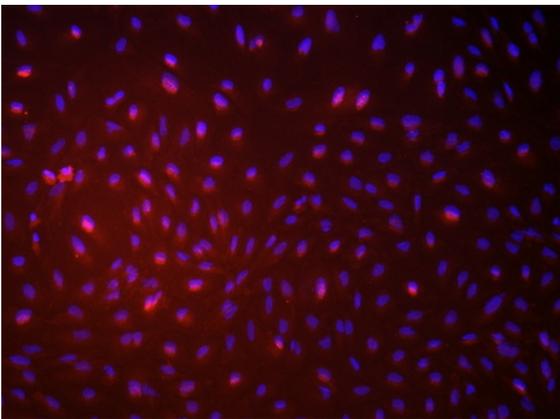


Abb. 14

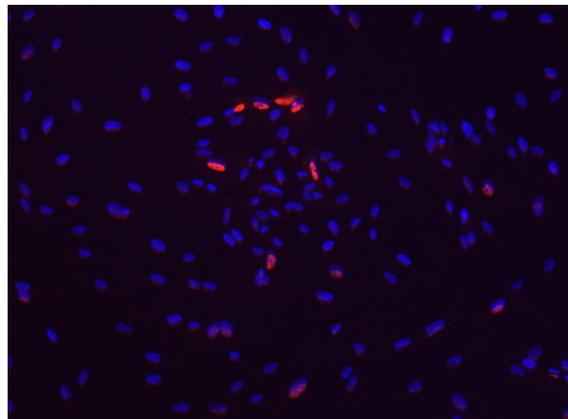


Abb. 15

Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (K 44) (aus gesundem Kontrollgewebe) mit CD10 (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;

Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (K 35) (gesundem Kontrollgewebe) mit pCK (1. AK): 2-fach positives, grün fluoreszierendes Ergebnis;

Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 69) (gesundem Kontrollgewebe) mit Aktin (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;

Ergebnisse

Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 69) (gesundes Kontrollgewebe) mit CT1 (1. AK): 1-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;

Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (M 25) (MRKH-Gewebe) mit E₂ (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;

Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (K 69) (gesundes Kontrollgewebe) mit Prog (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; jeweils mit DAPI-Färbung; in 100facher Vergrößerung aufgenommen.

3.2.2 Etablierung der CT1-Verdünnung

Die CT1-AK-Färbung wurde im Arbeitskreis dieser Dissertation erstmals durchgeführt. Daher wurden Probefärbungen mit Myometrium-Mischkultur-Zellen durchgeführt, um die minimale AK-Konzentration mit gut zu beurteilender Signalstärke zu erhalten. Die Probefärbungen wurde mit den Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000 durchgeführt. Die Verdünnung des CT1-AK lieferte bis 1:1000 ein gut zu beurteilendes Signal (s. Abb. 16 a, b).

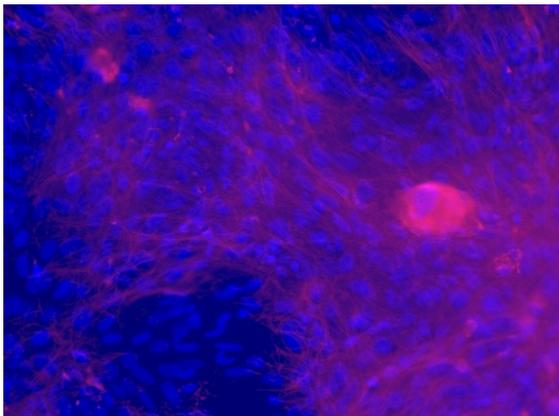


Abb. 16 a

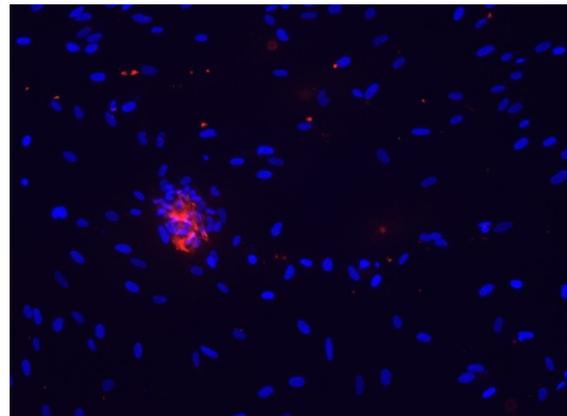


Abb. 16 b

Abbildung 16 a, b: 16 a: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 67) (gesundes Kontrollgewebe) mit CT1 (1. AK) 1:500 verdünnt: 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; 16 b: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 69) (gesundes Kontrollgewebe) mit CT1 (1. AK) 1:1000 verdünnt: 1-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; jeweils mit DAPI-Färbung; in 100facher Vergrößerung aufgenommen.

3.2.3 Positiv- und Negativkontrolle für Hormonrezeptorfärbungen

In der mit MDA-MB-231-Zellen durchgeführten Negativkontrolle konnten keine Hormonrezeptoren angefärbt werden. Bei den für die Positivkontrolle gefärbten MCF-7 Zellen waren sowohl ESR1 als auch PGR positiv (s. Abb. 17 a, b).

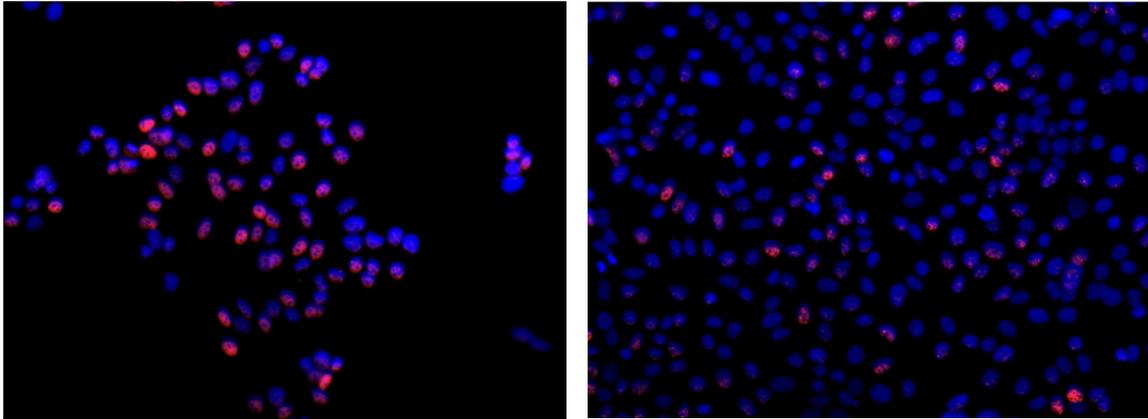


Abb. 17 a

Abb. 17 b

Abbildung 17 a, b: 17 a: Immunhistochemische Färbung einer Kultur von MCF-7-Zellen mit E_2 (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; Abb. 17 b: Immunhistochemische Färbung einer Kultur von MCF-7-Zellen mit Prog (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; jeweils mit DAPI-Färbung; in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

3.3 Ergebnisse Dezidualisierung

3.3.1 Allgemein

Mit Hilfe der Dezidualisierung *in vitro* sollten Hinweise auf funktionelle Defekte von Hormonrezeptoren abgeklärt werden.

Für die Auswertung der Dezidualisierungen wurden die Gewebeproben der normal ausgebildeten Uteri von 10 Kontrollpatientinnen mit einem Durchschnittsalter von 43 Jahren (s. Tab. 7) und von 11 Rudimenten (M 16, M 25, M 26, M 43 - M 46, M 50, M 52, M 56, M 58) von 8 MRKH-Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 24,5 Jahren verwendet (s. Tab. 8). Bei 9 der 10 Kontrollpatientinnen bestand eine durch mindestens eine Schwangerschaft und Geburt bewiesene Fertilität. Vom jeweils rechten (re.) und linken (li.) Uterusrudiment einer MRKH-Patientin, stammten die Kulturen M 25 (re.) und 26 (li.), M 43 (li.) und M 44 (re.) sowie M45 (re.) und 46 (li.).

Ergebnisse

Tabelle 7: Alter und Nebendiagnosen der Kontrollpatientinnen.

ID	Leiomyom	Adenomyose	Endometriose	Alter bei OP	Geburten
K 42	Ja	Nein	Nein	38	2
K 44	Nein	Nein	Nein	37	2
K 45	Nein	Nein	Nein	42	2
K 46	Ja	Nein	Nein	51	2
K 47	Nein	Nein	Nein	46	2
K 48	Nein	Nein	Nein	42	7
K 49	Ja	Nein	Nein	44	-
K 50	Ja	Nein	Nein	42	2
K 63	Ja	Nein	Nein	40	2
K 65	Ja	Nein	Nein	46	2

Tabelle 8: Alter, Nebendiagnosen und Hormonwerte der MRKH-Patientinnen.

MRKH	Leio- myom	Adeno- myose	Endomet- riose	Alter bei OP	MRKH Typ	Blut E ₂ (pmol/l)	Blut Prog (nmol/l)
M 16	Ja	Nein	Nein	39	Typ 2	157	2
M 25/ M 26	Nein	Ja (M 26)	Nein	15	Typ 1	1875	22
M 43/ M 44	Nein	ähnliche Läsion in M 43	Nein	19	Typ 1	750	5,1
M 45/ M 46	Nein	Ja	Ja	25	Typ 1	299	1,6
M 50	Nein	Nein	Nein	15	Typ 2	159	3,7
M 52	Nein	Nein	Nein	29	Typ 1	193	3,2
M 56	Nein	Nein	Nein	17	Typ 1	113	2,2
M 58	Nein	Nein	Nein	37	Typ 1	212	7,7

Bei der Patientin der Proben M 25 und M 26, wurde nebenbefundlich zusätzlich zur Adenomyose eine benigne Ovarialzyste festgestellt und erhöhte E₂- und Androgenwerte gemessen.

3.3.2 Die Prolaktinwerte als Hinweis für eine Dezidualisierung sind bei MRKH-Patientinnen signifikant niedriger als bei Kontrollgeweben

Die Einzelwerte der Duplikate der Zellkulturen aus MRKH-Gewebe sind in Tab. 9 aufgeführt. Die Bezeichnungen U und B stehen für hormonell „un- bzw. behandelt“. Die untere Nachweisgrenze für Prolaktin lag bei 15,6 pg/ml.

Ergebnisse

Tabelle 9: Prolaktinkonzentrationen der un- und stimulierten MRKH-Proben an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml.

Tage	0	3	6	9
M 16 U	0,00	0,00	0,00	0,00
M 16 U	0,00	0,00	0,00	19,89
M 16 U Mittelwert	0,00	0,00	0,00	9,95
M 16 B	0,00	0,00	0,00	19,89
M 16 B	0,00	0,00	0,00	44,62
M 16 B Mittelwert	0,00	0,00	0,00	32,26
M 16_diff_MW(B-U)	0,00	0,00	0,00	22,31
M 25 U	0,00	91,60	43,20	59,80
M 25 U	0,00	95,30	53,50	72,20
M 25 U Mittelwert	0,00	93,45	48,35	66,00
M 25 B	0,00	262,70	3008,60	14959,00
M 25 B	0,00	284,30	2630,00	14235,00
M 25 B Mittelwert	0,00	273,50	2819,30	14597,00
M 25_diff_MW(B-U)	0,00	180,05	2770,95	14531,00
M 26 U	0,00	68,60	86,50	106,00
M 26 U	0,00	55,40	72,20	95,30
M 26 U Mittelwert	0,00	62,00	79,35	100,65
M 26 B	0,00	187,00	2296,80	15226,00
M 26 B	0,00	186,20	3069,80	13428,00
M 26 B Mittelwert	0,00	186,60	2683,30	14327,00
M 26_diff_MW(B-U)	0,00	124,60	2603,95	14226,35
M 25/M 26_diff_MW(B-U)	0,00	152,33	2687,45	14378,68
M43 U	0,00	79,19	234,81	113,50
M 43 U	0,00	0,00	247,00	111,65
M 43 U Mittelwert	0,00	39,60	240,91	112,575
M 43 B	0,00	0,00	207,17	292,29
M 43 B	0,00	0,00	226,61	279,05
M 43 Mittelwert	0,00	0,00	216,89	285,67
M 43_diff_MW(B-U)	0,00	-39,60	-24,02	173,10
M 44 U	0,00	47,84	0,00	0,00
M 44 U	0,00	0,00	0,00	0,00
M 44 U Mittelwert	0,00	23,92	0,00	0,00
M 44 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 44 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 44 Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00
M 44_diff_MW(B-U)	0,00	-23,92	0,00	0,00
M 43/M 44_diff_MW(B-U)	0,00	-31,76	-12,01	86,55

Ergebnisse

M 45 U	21,70	52,60	71,80	87,30
M 45 U	29,00	56,50	79,20	86,00
M 45 U Mittelwert	25,35	54,55	75,50	86,65
M 45 B	0,00	48,60	340,00	9893,20
M 45 B	0,00	52,60	468,60	9263,20
M 45 B Mittelwert	0,00	50,60	404,30	9578,20
M 45_diff_MW(B-U)	-25,35	-3,95	328,80	9491,55
M 46 U	23,82	52,10	64,51	75,72
M 46 U	22,44	49,59	78,33	29,00
M 46 U Mittelwert	23,13	50,84	71,42	52,37
M 46 B	0	46,51	361,49	7956,30
M 46 B	0	47,03	401,08	12637,00
M 46 B Mittelwert	0	46,77	381,29	10296,65
M 46_diff_MW(B-U)	-23,13	-4,07	309,86	10244,28
M 45/M 46_diff_MW(B-U)	-24,24	-4,01	319,33	9867,91
M 50 U	0,00	0,00	0,00	0,00
M 50 U	0,00	0,00	0,00	0,00
M 50 U Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00
M 50 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 50 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 50 B Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00
M 50_diff_MW(B-K)	0,00	0,00	0,00	0,00
M 52 K	0,00	46,93	0,00	30,03
M 52 K	0,00	20,58	0,00	0,00
M 52 K Mittelwert	0,00	33,76	0,00	15,02
M 52 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 52 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 52 B Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00
M 52_diff_MW(B-U)	0,00	-33,76	0,00	-15,02
M 56 U	0,00	0,00	0,00	0,00
M 56 U	0,00	0,00	0,00	0,00
M 56 U Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00
M 56 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 56 B	0,00	0,00	0,00	0,00
M 56 B Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00
M 56_diff_MW(B-U)	0,00	0,00	0,00	0,00
M 58 U	0,00	19,89	64,76	0,00
M 58 U	0,00	0,00	0,00	0,00

Ergebnisse

M 58 U Mittelwert	0,00	9,95	32,38	0,00
M 58 B	0,00	0,00	41,26	113,50
M 58 B	0,00	0,00	96,23	132,82
M 58 B Mittelwert	0,00	0,00	68,75	123,16
M 58_diff_MW(B-U)	0,00	-9,95	36,37	88,84

In den folgenden Tabellen sind die berechneten Differenzen zwischen un- behandelten und behandelten MRKH-Patientinnen (s. Tab. 10), sowie die Mittelwerte der paarigen Rudimente welche von derselben MRKH-Patientin stammten und Kontrollproben (s. Tab. 11), dargestellt. Sie wurden in der graphischen Darstellung (s. Abb. 18) vergleichend aufgetragen.

Tabelle 10: Differenz der gemittelten Prolaktinkonzentrationen zwischen un- und stimulierten MRKH-Proben, bzw. gemittelte Konzentrationen bei rechten und linken Rudiment einer Patientin an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml.

Tage	0	3	6	9
M 16_diff_MW(B-U)	0,00	0,00	0,00	22,31
M 25/M 26_diff_MW(B-U)	0,00	152,33	2687,45	14378,68
M 43/M 44_diff_MW(B-U)	0,00	-31,76	-12,01	86,55
M 45/M 46_diff_MW(B-U)	-24,24	-4,01	319,33	9867,91
M 50_diff_MW(B-U)	0,00	0,00	0,00	0,00
M 52_diff_MW(B-U)	0,00	-33,76	0,00	-15,02
M 56_diff_MW(B-U)	0,00	0,00	0,00	0,00
M 58_diff_MW(B-U)	0,00	-9,95	36,37	88,84
MRKH Mittelwert	-3,03	9,11	378,89	3053,66
Standardabweichung	8,57	59,52	939,40	5726,37
Standardfehler	3,03	21,05	332,13	2024,58

Tabelle 11: Differenz der gemittelten Prolaktinkonzentrationen zwischen un- und stimulierten Kontrollgewebe, an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml.

Tage	0	3	6	9
K 42_diff_MW(B-U)	-36,84	155,01	1651,85	15324,67
K 44_diff_MW(B-U)	19,89	2170,92	22197,60	58884,73
K 45_diff_MW(B-U)	12,53	128,78	15097,37	50026,99
K 46_diff_MW(B-U)	-6,59	25,99	1244,83	6457,94
K 47_diff_MW(B-U)	-30,97	149,88	3445,10	22266,73
K 48_diff_MW(B-U)	-8,06	658,67	9621,18	35940,45
K 49_diff_MW(B-U)	0,00	215,39	8223,72	54697,46
K 50_diff_MW(B-U)	-7,40	679,10	8454,35	31520,10
K 63_diff_MW(B-U)	0,00	-26,81	207,41	907,49
K 65_diff_MW(B-U)	0,00	0,00	106,62	600,42

Ergebnisse

Kontrollen Mittelwert	-5,74	415,69	7025,00	27662,70
Standardabweichung	17,33	665,9	7265,07	22031,41
Standardfehler	5,48	210,58	2297,42	6966,95

Die ermittelten Mittelwerte der Prolaktin-Konzentrationen (pg/ml) der MRKH- und Kontrollgewebeprouben zeigten im Verlauf der Tage 0-9 einen Anstieg, ab d 3 und somit einen Dezidualisierungseffekt bei beiden Gewebegruppen. Die Endkonzentration der MRKH-Gewebe erreicht bei einem Mittelwert von 3054 pg/ml an d 9, aber nur 11 % des Mittelwerts von Kontroll-Gewebe mit 27663 pg/ml (Abb. 18). Damit zeigte sich anhand der Prolaktin-Sekretion ein deutlich geringerer Dezidualisierungseffekt bei MRKH-, als bei Kontrollgewebe. Der Wilcoxon-Test ergab hierfür eine Signifikanz von $p = 0,003$.

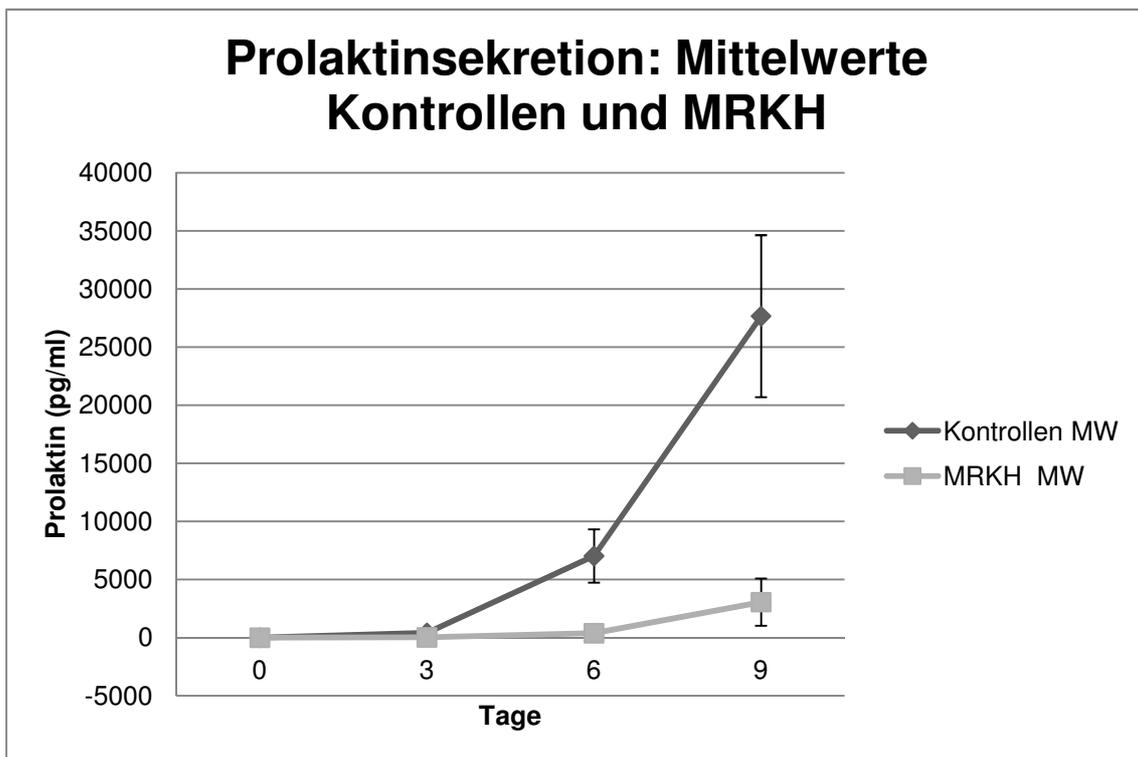


Abbildung 18: Vergleich der Mittelwerte (MW) der Prolaktinsekretion (pg/ml) zwischen MRKH- und Kontroll-Endometrium von Tag 0 bis 9 mit Angabe des Standardfehlers.

Ergebnisse

3.3.3 IGFBP-1-Werte als Hinweis für eine Dezydualisierung sind bei MRKH-Patientinnen signifikant niedriger als bei Kontrollgeweben

In den folgenden Tabellen sind die berechneten Differenzen zwischen un-behandelten und behandelten MRKH- (s. Tab. 12) und Kontrollzellkulturen (s. Tab. 13) dargestellt. Die untere Nachweisgrenze für IGFBP-1 lag bei 31,3 pg/ml. Der IGFBP-1-Gehalt in normalen Kulturmedium und Medium mit charcoal-stripped FCS, lag unterhalb der untere Nachweisgrenze.

Tabelle 12: Differenz der gemittelten IGFBP-1-Konzentrationen zwischen un- und stimulierten MRKH-Proben, bzw. gemittelte Konzentrationen bei rechten und linken Rudiment einer Patientin an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml.

Tage	0	3	6	9
M 16_diff_MW(B-K)	-57,96	20,68	-400,25	849,50
M 25/M 26_diff_MW(B-K)	-6571,75	257,60	1295,95	6799,73
M 43/M 44_diff_MW(B-K)	-325,75	0,00	0,00	0,00
M 45/M 46_diff_MW(B-K)	581,90	-358,80	-765,18	3793,18
M 50_diff_MW(B-K)	66,80	-419,80	-904,50	-168,25
M 52_diff_MW(B-K)	73,53	0,00	0,00	0,00
M 56_diff_MW(B-K)	35,30	449,15	0,00	0,00
M 58_diff_MW(B-K)	-256,70	-730,32	5695,45	-241,75
MRKH MW	-806,83	-97,69	615,18	1379,05
Standardabweichung	2345,37	383,69	2159,82	2569,56
Standardfehler	829,21	135,65	763,61	908,48

Tabelle 13: Differenz der gemittelten IGFBP-1-Konzentrationen zwischen un- und stimulierten Kontrollgewebe, an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml.

Tage	0	3	6	9
K 42_diff_MW(B-U)	1369,80	4260,85	6029,50	53277,60
K 44_diff_MW(B-U)	-2915,50	4053,10	3218,75	136359,25
K 45_diff_MW(B-U)	-468615,00	-1882,95	7716,50	12517,99
K 46_diff_MW(B-U)	-11954,50	24389,40	217951,80	1851299,85
K 47_diff_MW(B-U)	-3714,00	9595,25	18956,60	22559,60
K 48_diff_MW(B-U)	-41,65	11221,95	32430,35	8519,05
K 49_diff_MW(B-U)	861,00	1290,00	420408,40	327786,70
K 50_diff_MW(B-U)	-2996,00	-55,60	171278,10	308635,60
K 63_diff_MW(B-U)	-551,20	-18,70	4613,00	15750,70
K 65_diff_MW(B-U)	-460,00	-70,00	13860,00	17740,00
Kontrollen Mittelwert	-48901,71	5278,33	89646,30	275444,63
Standardabweichung	147521,59	7986,35	139422,83	567063,30
Standardfehler	46650,42	2525,51	44089,37	179321,16

Die ermittelten Mittelwerte der IGFBP-1-Konzentrationen (pg/ml) der MRKH-Zellkulturen zeigte im Verlauf der Tage 0-9 einen Konzentrationsanstieg (s. Abb. 19) und somit einen Dezidualisierungseffekt. Auch hier war der Konzentrationsanstieg bei den Rudimenten M 25/26 und M 45/46 am deutlichsten (s. Tab. 12).

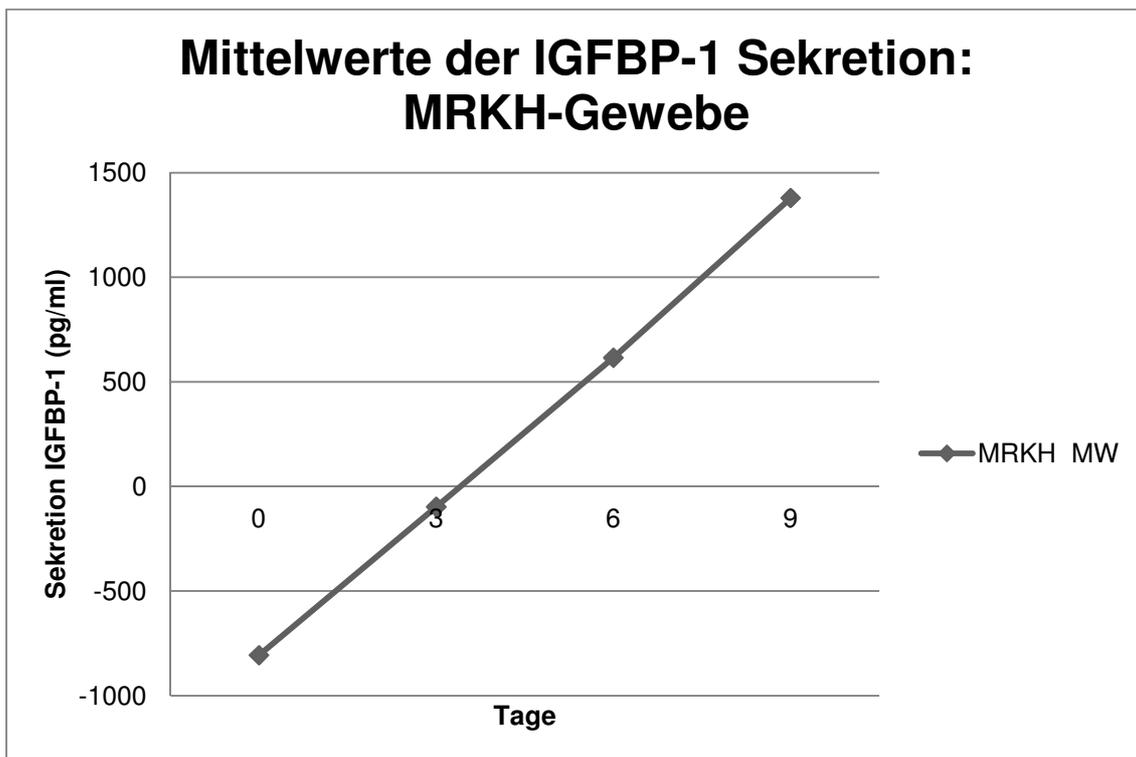


Abbildung 19: Mittelwerte der IGFBP-1-Konzentrationen der MRKH-Dezidualisierungen, in pg/ml von Tag 0 bis 9.

Im Vergleichsdiagramm der Mittelwerte der IGFBP-1-Konzentrationen von MRKH- und Kontrollzellkulturen zeigt sich bei Kontrollen ein deutlicher Anstieg ab Tag 3 und somit eine erfolgreiche Dezidualisierung. Die Endkonzentration der MRKH-Zellkulturen erreicht bei einem Mittelwert von 1379 pg/ml an d 9, nur 0,5 % des Mittelwerts von Kontrollen mit 275445 pg/ml (Abb. 20). Damit zeigte sich anhand der IGFBP-1-Sekretion ein deutlich geringerer Dezidualisierungseffekt bei MRKH-, als bei Kontrollgewebe.

Der Wilcoxon-Test ergab hierfür eine Signifikanz von $p < 0,001$. Die Messungen ergaben an d 0 unerwartet hohe IGFBP-1-Werte die sich an d 3 wieder im erwarteten Bereich befanden. Da die Werte der unstimulierten Zellen

dabei oft noch höher, als die der jeweils stimulierten Zellen waren, resultierten bei der Differenzberechnung negative Anfangswerte bei MRKH- und Kontrollgewebe.

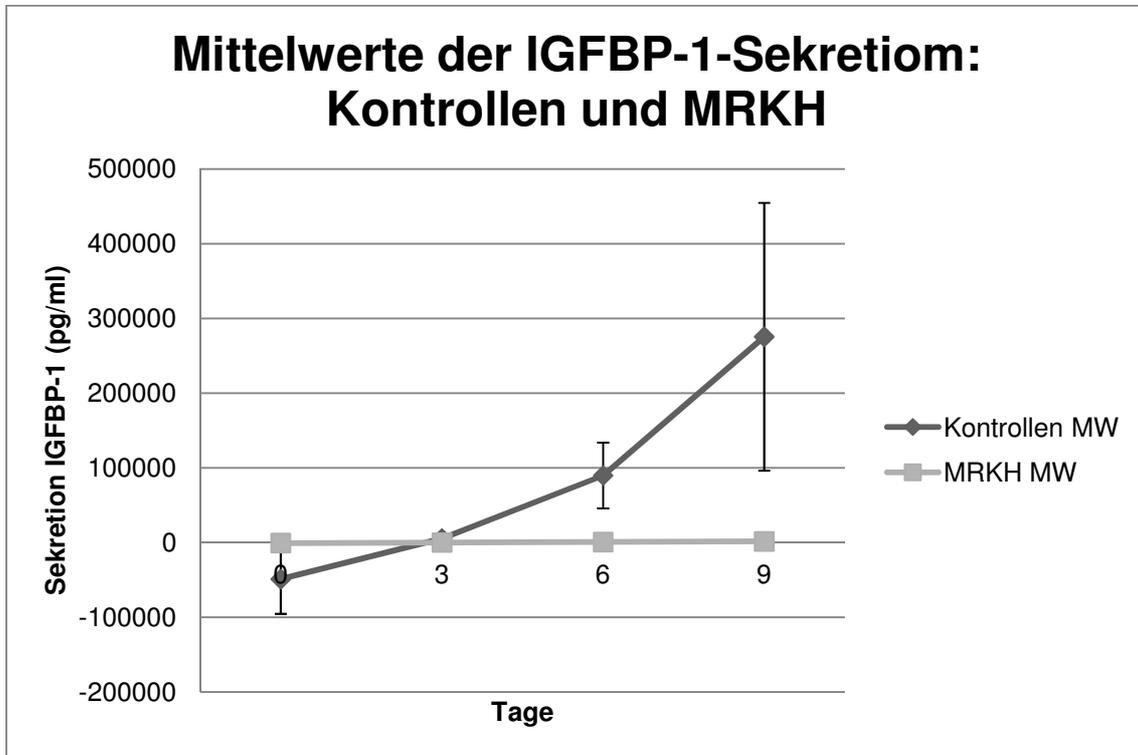


Abbildung 20: Vergleich der IGFBP-1-Sekretion (pg/ml) zwischen MRKH- und Kontroll-Endometrium von Tag 0 bis 9 mit Angabe des Standardfehlers.

Die Konzentrationen von IGFBP-1 und Prolaktin zeigten trotz variierender Werte die gleichen Anstiegstendenzen, MRKH-Höchstwerte bei M 25/26 und M 45/46 und deutlich höhere Endkonzentrationen bei Kontroll-, als bei MRKH-Zellkulturen und damit einen deutlich geringeren durchschnittlichen Dezidualisierungseffekt bei den MRKH-Kulturen. Da die ELISA-Messungen von Prolaktin mit unverdünnten Zellüberständen möglich waren und hier im Vergleich zu IGFBP-1 keine negativen Werte aufwiesen, werden die folgenden Untersuchungen hauptsächlich anhand der Prolaktin-Werte ausgewertet.

3.3.4 Differierende Prolaktinwerte der MRKH-Rudimente

Die Prolaktin-Konzentrationen der Proben M 16, M 43, M 44, M 50, M 52, M 56, M 58 zeigten nur geringen bzw. keinen Anstieg, ihre Ergebnisse lagen zum Teil

Ergebnisse

unterhalb des ELISA-Detektionslimits (15,6 pg/ml bei Prolaktin). Die Werte der Rudimente M 25 und M 26 und in geringerem Maß auch M 45 und M 46 zeigten vor allem ab d 6 einen deutlichen Konzentrationsanstieg. Somit konnte nur bei 4 der 11 Rudimente ein deutlicher Anstieg der Prolaktinkonzentration festgestellt werden. Im Vergleich der MRKH-Rudimente untereinander (s. Abb. 21) zeigten die Proben des rechten und linken Rudiments jeweils einer Patientin sehr ähnliche Verläufe der Prolaktinsekretion (pg/ml).

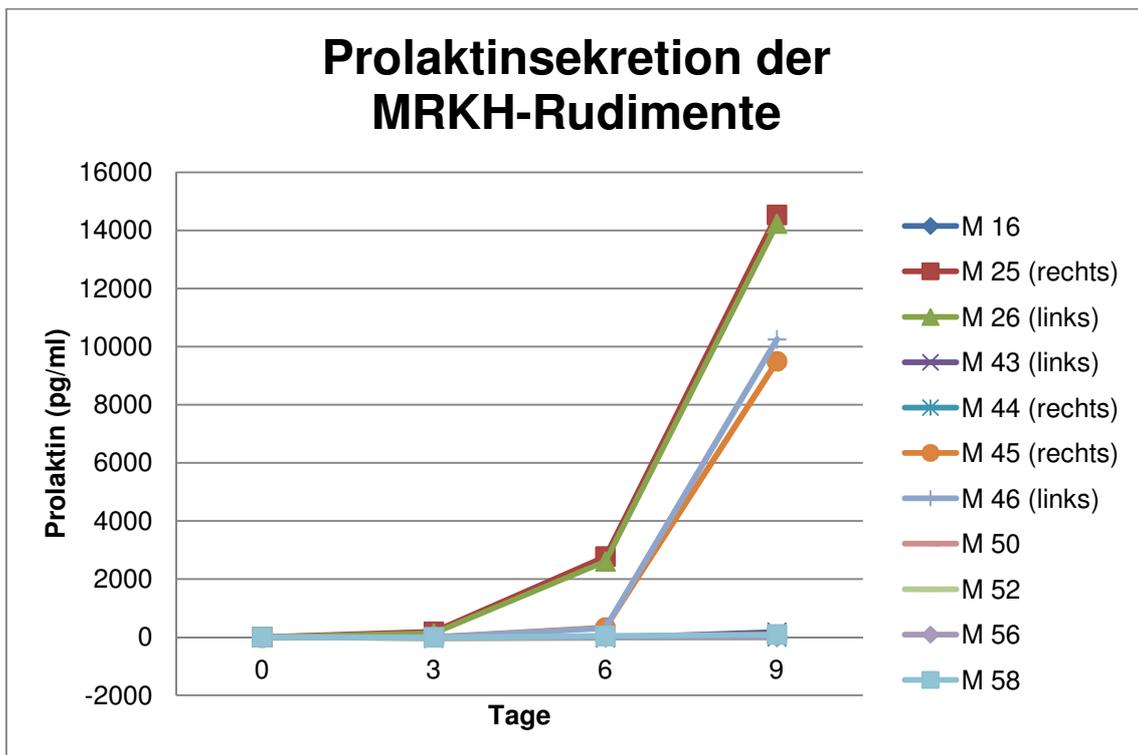


Abbildung 21: Vergleich der MRKH-Rudimente untereinander, ausgewertet nach dem Verlauf der Prolaktin-Konzentration (pg/ml) von Tag 0 bis 9.

In der folgenden Abbildung (s. Abb. 22) sind die MRKH-Rudimente mit niedrigen Werten (M 16, M 43/M 44, M 50, M 52, M 56, M58) zusammengefasst und mit den Werten der 4 Rudimente mit deutlicher Prolaktinsekretion (M 25/M 26, M 45/M 46) und einer repräsentativen Kontrolle (K 50) dargestellt. Die Kontroll-Zellkultur zeigte im Verlauf einen stärkeren Konzentrationsanstieg, als das MRKH-Gewebe und eine Prolaktinendkonzentration welche auch die Rudimen-

te mit den höchsten Prolaktinwerten (M 25 und M 26) deutlich überschritt (s. Abb. 22).

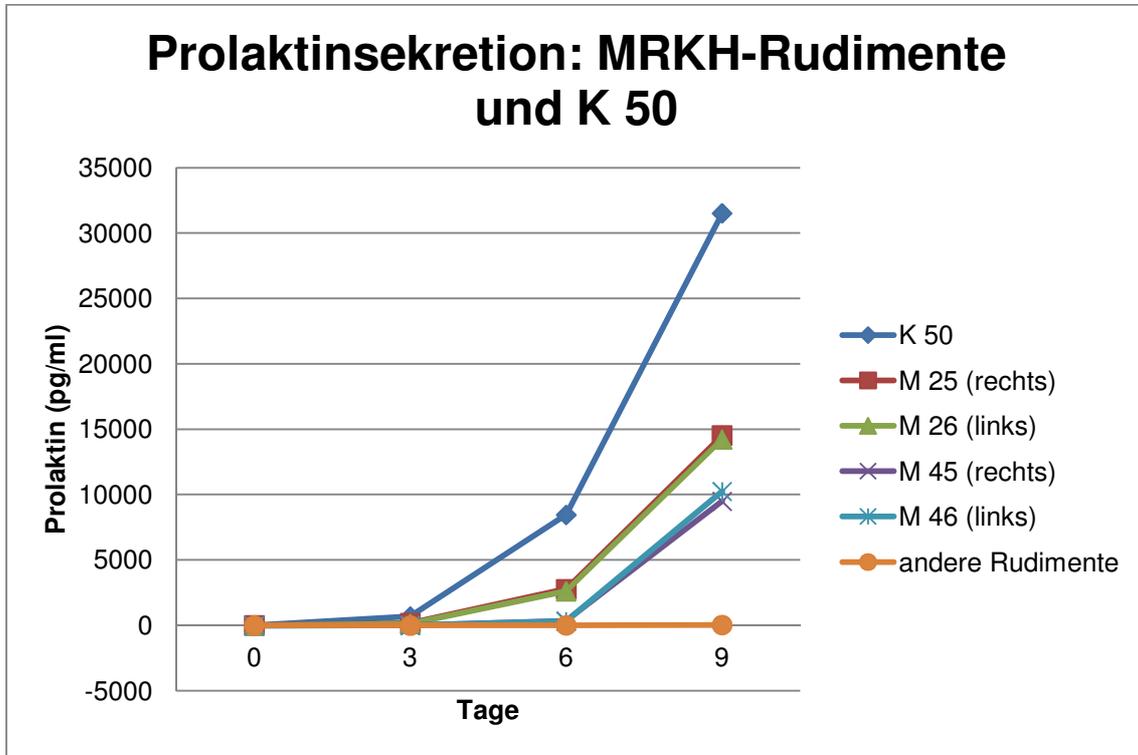


Abbildung 22: Vergleich einzelner MRKH-Rudimente mit einer repräsentativen Kontrolle (K 50), ausgewertet nach dem Verlauf der Prolaktin-Konzentration (pg/ml) von Tag 0 bis 9.

Betrachtet man die maximalen Prolaktinkonzentrationen an d 9 der MRKH-Proben in Relation mit den Nebendiagnosen der Patientinnen (s. Tab. 14 a), zeigt sich keine Relation mit MRKH Typ 1 oder Typ 2. Bei 2 der 8 MRKH-Patientinnen lag ein MRKH-Syndrom Typ 2 vor. Sie gehörten zu der Gruppe mit niedriger Prolaktinsekretion. Bei den übrigen 6 MRKH-Patientinnen lag ein MRKH-Syndrom Typ 1 vor. Davon gehörten 4 zu der Gruppe mit niedriger Prolaktinsekretion und 2 zu den einzigen mit hoher Sekretion, diese 2 hatten zusätzliche Nebendiagnosen welche die anderen nicht zeigten. Die Proben mit den höchsten Prolaktinwerten (M 25/M 26) stammten von einer MRKH-Patientin mit nebenbefundlicher Adenomyose und einer benignen Ovarialzyste, welche zu deutlich erhöhten Hormonwerten führte. Die Rudimente der MRKH-Patientin

Ergebnisse

der Proben M 45/M 46 mit ebenfalls deutlicher Prolaktinsekretion hatten als Nebenbefunde Adenomyose und Endometriose.

Vor der hormonellen Behandlung wurden die Hormonrezeptoren für Estrogen (ESR1) und Progesteron (PGR) immunhistochemisch angefärbt (s. Tab. 14 a). Die Endometriumkulturen M 25, M 26, M 46, M 50, M 56, M 58 zeigten sowohl positive Estrogen- und Progesteronrezeptoren. Bei M 16 und M 43 konnte nur Estrogen oder Progesteron und bei M 45 und M 52 keine Rezeptoren nachgewiesen werden.

Die Betrachtung von Prolaktinkonzentrationen an d 9 (pg/ml) im Verhältnis zur histologischen Aktivität und Zyklusphase des Endometriums in den HE-Gewebeschnitten der Uterus-Rudimente (s. Tab. 14 b) zeigt zum einen bei 4 der 7 Rudimente mit niedriger Prolaktinsekretion ein ruhendes bis atrophes Endometrium. Bei 2 Rudimenten konnte histologisch kein eindeutiges endometriales Stroma festgestellt werden, wobei zu beachten ist, dass durch die vorhergehende Gewinnung der ESC für Zellkulturen Gewebe im danach gefärbten HE-Schnitt möglicherweise nicht mehr ausreichend vorhanden war. Eins der Rudimente ohne Sekretion enthielt proliferierendes Endometrium. Von den 4 Rudimenten mit deutlichem Prolaktinanstieg hatten 3 Endometrium in der Proliferations- und eines in der Sekretionsphase.

Tabelle 14 a, b: 14 a: Prolaktinwerte an d 9 (pg/ml), MRKH-Typ, Nebendiagnosen, Hormonwerte der MRKH-Patientinnen und Ergebnisse der immunhistochemischen Hormonrezeptorfärbungen der Rudimente (positiv (pos.)/negativ (neg.)). 14 b: Korrelation von Prolaktinwerten an d 9 (pg/ml) und Endometrium-Histologie anhand von HE-Schnitten der Uterusrudimente.

MRKH	d9-Wert (Prolaktin pg/ml)	MRKH Typ	Besonderheit/ Nebendiagnose	Blut E₂ (pmol/l)	Blut Prog (nmol/l)	ESR1	PGR
M 16	22	Typ 2	Leiomyom	157	2,0	neg.	pos.
M 25 rechts	14531	Typ 1	Ovarialzyste, erhöhte Hormon- werte	1875	22,0	pos.	pos.
M 26 links	14226	Typ 1	Ovarialzyste, erhöhte Hormon- werte, Adenomyose	1875	22,0	pos.	pos.
M 43 links	173	Typ 1	Adenomyose- ähnliche Läsion	750	5,1	pos.	neg.

Ergebnisse

M 44 rechts	0	Typ 1		750	5,1	neg.	pos.
M 45 rechts	9492	Typ 1	Adenomyose Endometriose	299	1,6	neg.	neg.
M 46 links	10244	Typ 1	Adenomyose Endometriose	299	1,6	pos.	pos.
M 50	0	Typ 2		159	3,7	pos.	pos.
M 52	-15	Typ 1		193	3,2	neg.	neg.
M 56	0	Typ 1		113	2,2	pos.	pos.
M 58	89	Typ 1		212	7,7	pos.	pos.

MRKH	d9-Wert (Prolaktin pg/ml)	Histologie Endometrium (anhand von HE-Gewebeschnitten)
M 16	22	ruhendes bis atrophes Endometrium
M 25 rechts	14531	inaktives bis schwach proliferierendes Endometrium
M 26 links	14226	Endometrium in der mittleren Sekretionsphase
M 43 links	173	endometriales Epithel
M 44 rechts	0	Gangstruktur mit Auskleidung durch tubare Schleimhaut
M 45 rechts	9492	schwach proliferierendes Endometrium
M 46 links	10244	proliferierendes Endometrium, teilweise einfache Hyperplasie
M 50	0	ruhendes Endometrium
M 52	-15	ruhendes Endometrium
M 56	0	endometrialen Gewebe in der Proliferationsphase
M 58	89	ruhendes Endometrium

3.3.5 Hormonrezeptoren und Dezidualisierung in aufsteigenden Passagen

Um die Quantität der Hormonrezeptoren im Verlauf der Passagierung zu beobachten, wurde eine Versuchsreihe mit 3 Zellkulturen aus Kontrollgewebe durchgeführt. Diese Kulturen wurden von P1 bis P5 aufsteigend passagiert. In jeder Passage wurde ein Teil der Zellen hormonell behandelt bzw. dezidualisiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Hormonrezeptoren für E₂ (ESR1) und Prog (PGR) in einer frühen und 2 späteren Passagen sind in Tab. 15 aufgelistet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Menge an Hormonrezeptoren über die Passagierung teilweise abnahm. Vor allem die Progesteronrezeptoren waren aber bis in P5 anfärbbar.

Tabelle 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Hormonrezeptorfärbungen für E₂ (ESR1) und Prog (PGR) an den Kontrollgeweben K 61, 63 und 65 in verschiedenen Passagen.

Zellkultur	ESR1	PGR
K 61 P0	+++	+++
K 61 P4	neg.	+
K 61 P5	(nicht mehr ausreichend Zellen vorhanden)	
K 63 P0	+	+++
K 63 P4	++	+
K 63 P5	++	+++
K 65 P1	neg.	neg.
K 65 P4	neg.	+
K 65 P5	+	+++

Färbungen von Zellkulturen die in jeder aufsteigenden Passage einmal dezidualisiert wurden (stimulierte und unstimulierte Zellen wurden getrennt voneinander über die aufsteigenden Passagen mit Hormonen behandelt bzw. ohne Hormone kultiviert), wiesen Unterschiede in den Hormonrezeptoren auf (s. Tab. 16). Die hormonell behandelten Zellen zeigten dabei stets mehr positive Hormonrezeptoren, v.a. für Progesteron, als die unbehandelten.

Tabelle 16: Ergebnisse der immunhistochemischen Hormonrezeptorfärbungen für E₂ (ESR1) und Prog (PGR) an den Kontrollgeweben K 63 und K 65 in Passage 5, nach 4. Dezidualisierung bzw. unbehandelt.

Zellkultur	ESR1	PGR
K 63 P5 unbehandelt	neg.	neg.
K 63 P5 (4. Dezidualisierung), behandelt	neg.	+++
K 65 P5 unbehandelt	neg.	+
K 65 P5 (4. Dezidualisierung), behandelt	neg.	+++

3.4 Myometriumkultur

Da die Herstellung von, und die Versuchsdurchführungen mit Myometriumkulturen im Rahmen dieser Dissertation nur etabliert wurde, wird im Ergebnis- und Diskussionsteil nur kurz darauf eingegangen.

3.4.1 Erfolgreiche Kultivierung von Myometrium

Das Protokoll zur Herstellung von Primärkulturen aus Myometrium konnte erfolgreich etabliert werden. In den Reinkulturen konnte immunhistochemisch ein Myometriumanteil von > 90 % (Aktin) nachgewiesen werden. Die Mischkulturen enthielten neben Myometrium, auch einen großen Anteil von Fibroblasten (CT1-positiv). Bei Kontrollgewebe zeigten 2 der 7 Mischkulturen eindeutige positive Hormonrezeptoren, weshalb nur hier die Proliferation vollständig durchgeführt wurde.

3.4.2 Geringe Proliferationsunterschiede der Myometriumzellen

Proliferationsversuche wurden insgesamt mit 6 Reinkulturen aus MRKH- und 8 Reinkulturen aus Kontroll-Myometrium, sowie mit 2 Mischkulturen aus MRKH- und 3 Mischkulturen aus Kontroll-Myometrium durchgeführt.

Die Versuchsansätze mit verschiedenen Zelldichten (ausgesäte Zellen pro Fläche) zeigten die stärksten Wachstumstendenzen bei 3 500 und bei 20 000 Zellen pro Well. Da 3500 Zellen pro Well allerdings eine geringe Zelldichte ist und somit fehleranfälliger und weniger repräsentativ, wurden die darauf folgende Versuche mit einer Zelldichte von 20 000 Zellen pro Well durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Zellzählungen von MRKH- und Kontrollgewebe über den Verlauf von je 9 Tagen ist in den folgenden Tabellen als Zellzahl pro Well (2 cm²) für Reinkulturen (s. Tab. 17) und Mischkulturen (s. Tab. 18) aufgelistet.

Wie den Tabellen zu entnehmen ist, zeigten sich bei den Stimulationsversuchen der Myometrium-Reinkulturen sowohl bei Kontroll-, als auch bei MRKH-Gewebe kaum bzw. keine Unterschiede zwischen un- und stimulierten Zellwachstum. Teilweise erreichten die unstimulierten Zellen sogar höhere Proliferationszahlen, als die stimulierten. Im Vergleich proliferierten die Zellen des MRKH-Gewebes etwas schwächer, als die des Kontrollgewebes.

Ergebnisse

Tabelle 17: Proliferationsversuche durch hormonelle Stimulation an Myometrium-Reinkulturen aus MRKH- und Kontrollgewebe; Zellen pro Well (2 cm²) an d 0, d 3, d 6 und d 9.

Myometrium-Reinkultur: Kontrollgewebe				
Tage	d 0	d 3	d 6	d 9
K 58 unbehandelt MW	20000	38250	189000	282000
K 59 unbehandelt MW	20000	18000	39750	26250
K 60 unbehandelt MW	20000	7500	21000	33750
K 62 unbehandelt MW	20000	20250	24750	33750
K 66 unbehandelt MW	20000	15000	22500	33000
MW Kontrolle Reinkultur U	20000	19800	59400	81750
K 58 behandelt MW	20000	63000	189000	266250
K 59 behandelt MW	20000	20250	29250	20250
K 60 behandelt MW	20000	16500	25500	32250
K 62 behandelt MW	20000	17250	22500	45750
K 66 behandelt MW	20000	14250	15750	43500
MW Kontrolle Reinkultur B	20000	26250	56400	81600
Myometrium-Reinkultur: MRKH-Gewebe				
Tage	d 0	d 3	d 6	d 9
M 18 unbehandelt MW	20000	35250	56250	102000
M 19 unbehandelt MW	20000	42750	62250	80250
M 21 unbehandelt MW	20000	30000	93750	74250
M 22 unbehandelt MW	20000	27750	33750	33750
M 23 unbehandelt MW	20000	45000	67500	60000
MW MRKH Reinkultur U	20000	36150	62700	70050
M 18 behandelt MW	20000	47250	75000	126000
M 19 behandelt MW	20000	65000	53250	69000
M 21 behandelt MW	20000	39000	90750	75000
M 22 behandelt MW	20000	30750	31500	36750
M 23 behandelt MW	20000	46500	46500	40500
MW MRKH Reinkultur B	20000	45700	59400	69450

Auch bei den Mischkulturen wurden nur geringe Unterschiede zwischen un- und stimulierten Zellwachstum festgestellt, die unstimulierten Kontrollgewebsproben erreichten sogar eine höhere Proliferationszahl, als die stimulierten. Im Vergleich proliferierten die Zellen des MRKH-Gewebes stärker, als die des Kontrollgewebes.

Ergebnisse

Tabelle 18: Proliferationsversuche durch hormonelle Stimulation an Myometrium-Mischkulturen aus MRKH- und Kontrollgewebe; Zellen pro Well (2 cm²) an d 0, d 3, d 6 und d 9.

Myometrium-Mischkultur: Kontrollgewebe				
Tage	d 0	d 3	d 6	d 9
K 67 unbehandelt MW	20000	27750	33750	50250
K 75 unbehandelt MW	20000	68400	89675	131450
MW Kontrolle Mischkultur U	20000	48075	61712,5	90850
K 67 behandelt MW	20000	47250	35250	20250
K 75 behandelt MW	20000	80250	101150	122925
MW Kontrolle Mischkultur B	20000	63750	68200	71588
Myometrium-Mischkultur: MRKH-Gewebe				
Tage	d 0	d 3	d 6	d 9
M 29 unbehandelt MW	20000	60750	42875	67875
M 30 unbehandelt MW	20000	70750	229950	359150
MW MRKH Mischkultur U	20000	65750	136412,5	213512,5
M 29 behandelt MW	20000	34302	42375	103500
M 30 behandelt MW	20000	45875	201150	474485
MW MRKH Mischkultur B	20000	40088,5	121762,5	288992,5

3.4.3 Giant cells: ausbleibende Größenzunahme

Dieser Versuch wurde insgesamt an 6 verschiedenen Kontrollgeweben und an 5 MRKH-Geweben durchgeführt. Die erwartete Größenzunahme der behandelten, im Vergleich zu den nicht behandelten Myometriumzellen, konnte lichtmikroskopisch nicht eindeutig festgestellt werden (s. Beispiel in Abb.: 23 a, b und 24 a, b).

Ergebnisse

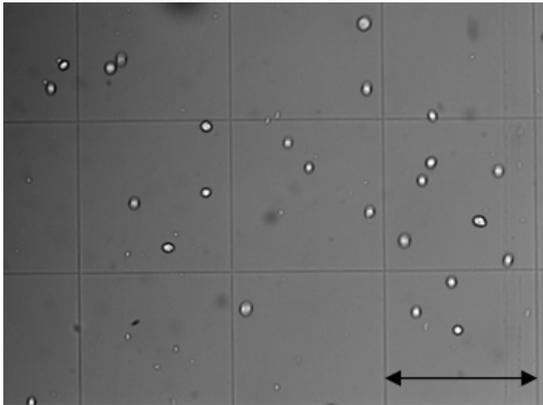


Abb. 23 a

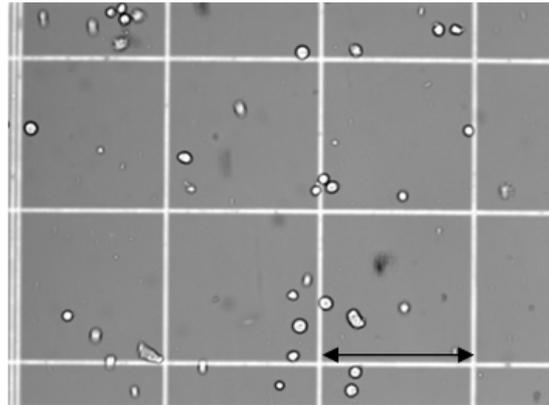


Abb. 23 b

Abbildung 23 a,b: Myometriumkultur K 58 P1, links (Abb. 24 a) unbehandelt, rechts (Abb. 24 b) hormonell stimuliert. Die Pfeile markieren jeweils eine Länge von 0,25 mm in der Neubauer-Zählkammer.

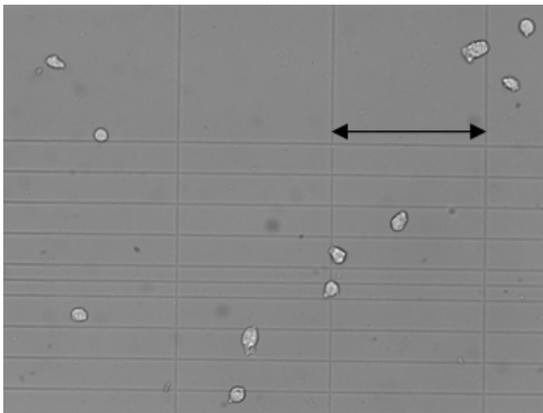


Abb. 24 a

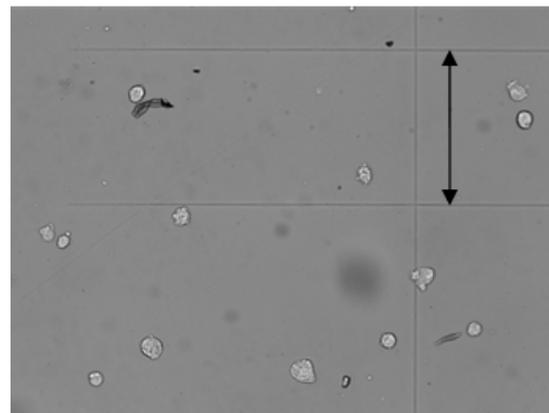


Abb. 24 b

Abbildung 24 a,b: Myometriumkultur M 19 P1, links (Abb. 24 a) unbehandelt, rechts (Abb. 24 b) hormonell stimuliert. Die Pfeile markieren jeweils eine Länge von 0,25 mm in der Neubauer-Zählkammer.

3.5 Gewebeschnitte: HOXA10, Pax8, CD31

3.5.1 HOXA10-Expressionsunterschiede zwischen MRKH- und Kontroll-Basalis
Die mit dem HOXA10-Marker gefärbten Gewebeschnitte wurden anhand ihrer lichtmikroskopischen Bilder nach dem IR-Score der ESC ausgewertet. Da sich auch eine Expression im Myometrium zeigte, wurde dieses in die Auswertung mit eingeschlossen. In der folgenden Abbildung (s. Abb. 25 a-f) sind die Endometriumschichten Basalis und Functional und das Myometrium einer Kontroll- und einer MRKH-Probe im Vergleich dargestellt. Bei beiden zeigt sich

Ergebnisse

eine Zunahme des IRS-Scores der ESC von Basalis zu Funktionalis, jedoch deutlicher bei Kontroll- als bei MRKH-Gewebe. Im Vergleich des Myometriums lassen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Kontroll- und MRKH-Gewebe feststellen.

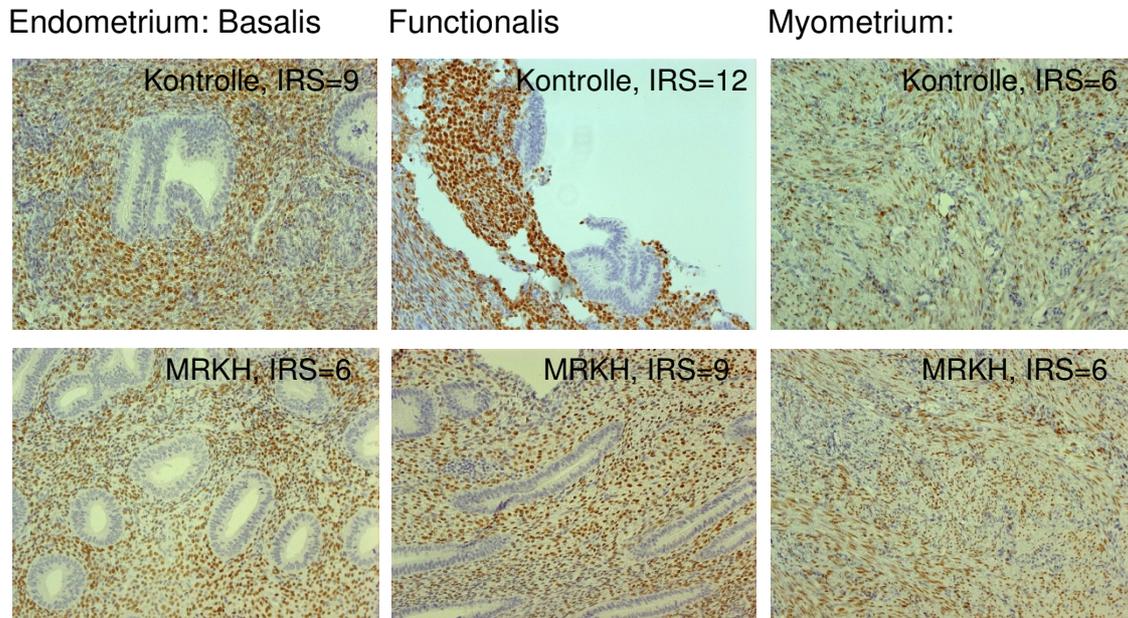


Abbildung 25 a-f: Beispiele von Photographien der HOXA10-Gewebeschnitte, einer Kontroll- (K/13/6976) und MRKH-Probe (K/10/23100) aufgenommen mit einem Durchlichtmikroskop mit 200facher Vergrößerung.

Die HOXA10-Färbung wurden anhand des IRS eingeteilt und tabellarisch aufgetragen (s. Tab. 19):

Tabelle 19: Nach dem IR-Score ermittelte Werte der immunhistochemisch auf HOXA10 gefärbten Gewebeschnitte von MRKH- und Kontrollpatientinnen.

K-Nummer	MRKH	Pathologie	HOXA10 -	HOXA10 -	HOXA10 -
			Endometrium- basalis	Endometrium- functionalis	Myometrium
			IR-Score	IR-Score	IR-Score
K/2009/16564	ja	na (Adeno- myose)	4	na	3
K/2009/18783	ja	prolif.	4	na	6
K/2009/19806	ja	prolif.	6	na	6
K/2009/22649	ja	prolif.	4	12	6
K/2010/03679	ja	prolif.	4	6	6
K/2010/10385	ja	prolif.	2	9	9
K/2010/12072	ja	sekretor.	2	6	6
K/2010/14507	ja	bas	2	na	9

Ergebnisse

K/2010/14889	ja	prolif.	4	6	6
K/2010/15284	ja	bas	4	6	6
K/2010/15497	ja	bas	na	na	6
K/2010/21835	ja	funct	4	9	6
K/2010/23100	ja	prolif.	6	9	6
K/2010/23795	ja	prolif.	6	na	6
K/2011/12718	ja	sekretor.	4	12	6
K/2012/9536 -1	ja	sekretor.	2	6	6
K/2012/9536 -2	ja	sekretor.	4	9	6
K/2012/24908	ja	prolif.	na	na	6
K/2012/26738	ja	prolif.	4	9	6
K/2013/19521	ja	prolif.	9	na	6
K/2013/25136	ja	prolif.	6	9	6
MW MRKH-Gewebe			4,3	8,3	6,1
Standard-abweichung			1,8	2,2	1,2
n =			19	13	21
K/2009/19809	nein	sekretor.	1	6	2
K/2010/01829	nein	prolif.	6	12	6
K/2010/09292	nein	prolif.	6	12	6
K/2010/11238	nein	prolif.-sekretor.	6	12	6
K/2010/13091	nein	sekretor.	6	9	6
K/2012/24226	nein	sekretor.	6	12	6
K/2013/6976	nein	prolif.	9	12	6
K/2013/8685	nein	sekretor.	6	9	6
K/2013/16487	nein	sekretor.	6	9	6
K/2013/17217	nein	prolif.	6	6	6
MW Kontroll-gewebe			5,8	9,9	5,6
Standard-abweichung			1,9	2,5	1,3
n =			10	10	10
Signifikanz (Wilcoxon)			p = 0,012	p = 0,114	p = 0,227

Von den 21 MRKH-Proben wurde in 19 Stück basales und in 13 Stück funktionelles Endometrium gefunden und ausgewertet. Konnte in einem Gewebepreparat kein Endometrium ausgewertet werden, wurde es aus der jeweiligen

Ergebnisse

Wertung genommen und mit na (not available, deutsch: nicht verfügbar) bezeichnet. Die statistische Auswertung der IRS-Einzelwerte der zwei Gruppen Kontroll- und MRKH-Gewebe fand mithilfe des Wilcoxon-Tests statt.

Demzufolge zeigt die HOXA10-Expression der basalen Endometriumschicht von Kontrollgewebe signifikant höhere Werte, als bei MRKH-Patientinnen ($p = 0,012$). Die funktionelle Endometriumschicht zeigte ebenfalls eine leicht erhöhte HOXA10-Expression in Kontrollgewebe, eine statistische Signifikanz war hier allerdings nicht nachweisbar ($p = 0,114$). Wobei hier die niedrigere Fallzahl an MRKH-Geweben mit Funktionalis (nur in 13 der 21 Fälle vorhanden), woraus eine geringere Repräsentativität resultiert, zu berücksichtigen ist. Im Myometrium zeigten die Gewebe von MRKH- und Kontroll-Patientinnen ähnliche Expressionsmuster, ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,227$).

Ein Peak der HOXA10-Expression in der mittleren Sekretionsphase konnte weder bei den Drüsen von Kontroll- noch von MRKH-Endometrium eindeutig festgestellt werden. In Tab. 20 sind die anhand der pathologischen Untersuchung des Uteruspräparats der hysterektomierten Kontrollpatientinnen diagnostizierten Nebendiagnosen wie Myome oder Adenomyose aufgelistet. Es wurden bei 2 der 10 Patientinnen eine Adenomyose (mit vergleichsweise niedrigeren IRS-Score) und bei 6 Patientinnen ein oder mehrere Myome festgestellt.

Tabelle 20: Hysterektomierte Kontrollpatientinnen mit am Uteruspräparat diagnostizierten Nebendiagnosen.

K-Nummer	Pathologie	Myome/ Adenomyose	HOXA10 - Endometrium- Basalis: IR-Score	HOXA10 – Functionalis: IR-Score
K/2009/19809	sekretor.	Adenomyose	1	6
K/2010/01829	prolif.	Myome intramural, submukös	6	12
K/2010/09292	prolif.	Myome intramural	6	12
K/2010/11238	prolif.-sekretor.	Myome an Vorder-, Hinter-, und Seiten- wänden	6	12
K/2010/13091	sekretor.	keine	6	9
K/2012/24226	sekretor.	Myome submukös	6	12
K/2013/6976	prolif.	Myome intramural, subserös	9	12

Ergebnisse

K/2013/8685	sekretor.	Adenomyose nicht definitiv zu sichern	6	9
K/2013/16487	sekretor.	Myom submukös	6	9
K/2013/17217	prolif.	Adenomyose	6	6

3.5.2 Keine signifikanten Unterschiede der Pax8-Expression

Die mit der Pax8-Marker gefärbten Gewebeschnitte wurden anhand ihrer lichtmikroskopischen Bilder nach dem IR-Score ausgewertet. Die Auswertung erfolgte an den Drüsenepithelzellen des Endometriums, getrennt nach dem Stratum basale und functionale. In der folgenden Abbildung (s. Abb. 26 a-e) sind die Endometriumschichten Basalis und Functionalis einer Kontroll- und einer MRKH-Probe, sowie eine weitere MRKH-Probe auf deren Bild sowohl Basalis und Functionalis zu sehen ist, im Vergleich dargestellt. Wie in den Abbildungen und der Ergebnistabelle (s. Tab. 21) sichtbar, ließen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen Kontroll- und MRKH-Gewebe feststellen. Der Wilcoxon-Test ergab hierfür keine Signifikanz (Endometrium Basalis $p = 0,179$, Functionalis $p = 0,529$).

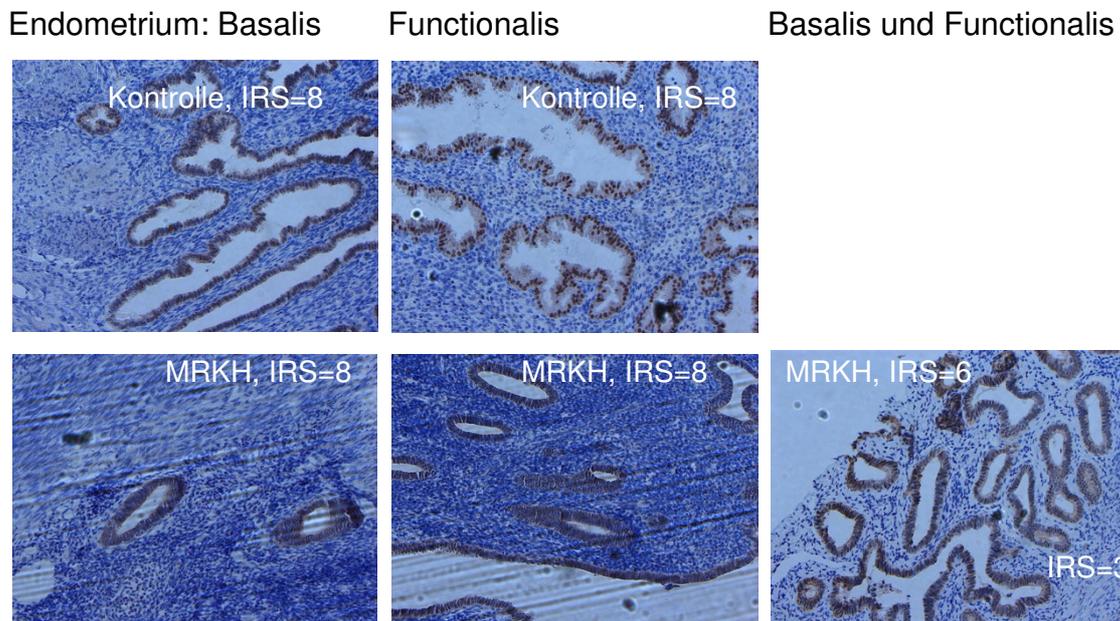


Abbildung 26 a-e: Beispiele von Photographien der Pax8-Gewebeschnitte, einer Kontroll- (K/10/13091), einer MRKH- (K/10/23795) und einer 2. MRKH-Probe (K/09/19806) aufgenommen mit einem Durchlichtmikroskop mit 200facher Vergrößerung.

Ergebnisse

Tabelle 21: Nach dem IR-Score ermittelte Werte der immunhistochemisch auf Pax8 gefärbten Gewebeschnitte von MRKH- und Kontrollpatientinnen.

K-Nummer	MRKH	Pathologie	Pax8 – Endometrium Basalis	Pax8 – Endometrium Functionalis
			IR-Score	IR-Score
K/2009/16564	ja	na	3	na
K/2009/18783	ja	prolif.	3	na
K/2009/19806	ja	prolif.	3	6
K/2009/22649	ja	prolif.	0	0
K/2010/03679	ja	prolif.	0	6
K/2010/10385	ja	sekretor.	3	8
K/2010/12072	ja	sekretor.	3	9
K/2010/14507	ja	bas	4	na
K/2010/14889	ja	prolif.	8	8
K/2010/15284	ja	bas	na	8
K/2010/15497	ja	bas	na	na
K/2010/21835	ja	funct	4	4
K/2010/23100	ja	prolif.	4	4
K/2010/23795	ja	prolif.	8	8
K/2011/12718	ja	sekretor.	12	8
K/2012/9536 -1	ja	sekretor.	4	4
K/2012/9536 -2	ja	sekretor.	12	8
K/2012/24908	ja	prolif.	4	4
K/2012/26738	ja	prolif.	4	4
K/2013/19521	ja	prolif.	12	na
K/2013/25136	ja	prolif.	0	0
MW MRKH-Gewebe			4,79	5,56
Standardabweichung			3,84	2,85
n =			19	16
K/2009/19809	nein	sekretor.	0	1
K/2010/01829	nein	prolif.	8	8
K/2010/09292	nein	prolif.	4	4
K/2010/11238	nein	prolif.-sekretor.	6	6
K/2010/13091	nein	sekretor.	8	8
K/2012/24226	nein	sekretor.	8	8
K/2013/6976	nein	prolif.	4	4
K/2013/8685	nein	sekretor.	8	12
K/2013/16487	nein	sekretor.	8	12
K/2013/17217	nein	prolif.	4	4

Ergebnisse

MW Kontrollgewebe			5,8	6,7
Standardabweichung			2,74	3,59
n =			10	10
Signifikanz (Wilcoxon)			p = 0,179	p = 0,529

3.5.3 Keine signifikanten Unterschiede der CD31-markierten Gefäßanschnitte

Die mit dem CD31-Marker gefärbten Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch anhand ihrer Anzahl von Gefäßanschnitten pro Gesichtsfeld in einer 400fachen Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung wurde sowohl für Endometrium, als auch für Myometrium durchgeführt. In den folgenden Abbildung (s. Abb. 27 a-d) sind Endometrium und Myometrium einer Kontroll- und einer MRKH-Probe im Vergleich dargestellt. Die pro Gewebe an jeweils vier verschiedenen Stellen pro Gesichtsfeld ausgezählten Gefäßanschnitte wurden tabellarisch aufgetragen (s. Tab. 22) und anhand ihrer Mittelwerte verglichen. Es ließ sich dabei kein deutlicher Unterschied zwischen Kontroll- und MRKH-Gewebe feststellen. Die Mittelwerte lagen bei Kontrollgewebe bei 57,9 Gefäßanschnitten/Gesichtsfeld (GA/GF) für Endometrium und bei 59,2 GA/GF für Myometrium. Für MRKH-Gewebe ergab sich 59,5 GA/GF für Endometrium und bei 54,9 GA/GF für Myometrium. Der Wilcoxon-Test ergab hierfür keine Signifikanz (Endometrium $p = 1,0$, Myometrium $p = 0,322$).

Ergebnisse

Endometrium

Myometrium:

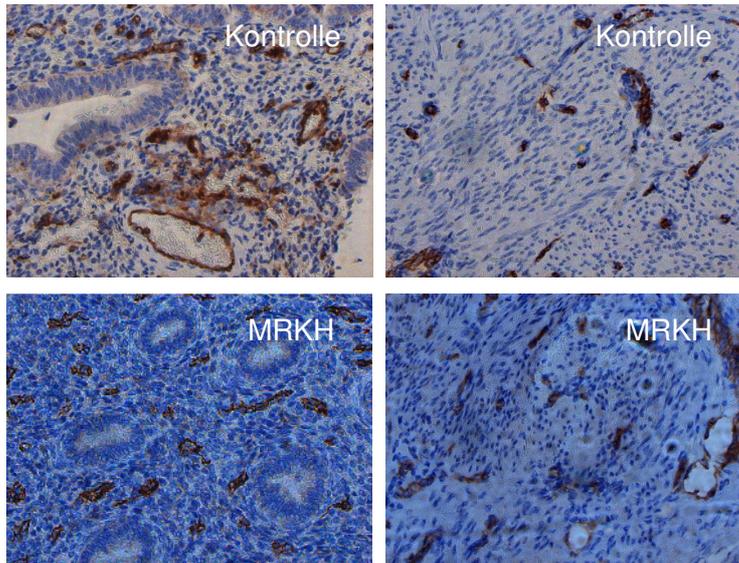


Abbildung 27 a-d: Beispiele von Photographien der CD31-Gewebeschnitte, einer Kontroll- (K/10/11238) und MRKH-Probe (K/10/15284) aufgenommen mit einem Durchlichtmikroskop mit 400facher Vergrößerung.

Tabelle 22: Mikroskopisch pro Gesichtsfeld in 400facher Vergrößerung ausgezählte Gefäßanschnitte der immunhistochemisch auf CD31 gefärbten Gewebeschnitte von MRKH- und Kontrollpatientinnen.

K-Nummer	CD 31 - Endometrium: Gefäßanschnitte pro Gesichtsfeld				MW-Endometrium	CD 31 - Myometrium: Gefäßanschnitte pro Gesichtsfeld				MW-Myometrium
	1. GF	2. GF	3. GF	4. GF		1. GF	2. GF	3. GF	4. GF	
MRKH										
K/2009/16564	92	100	72	75	84,75	61	53	95	73	70,5
K/2009/18783	71	80	45	44	60,00	28	36	31	36	32,75
K/2009/19806	47	51	59	55	53,00	57	48	72	66	60,75
K/2009/22649	78	72	88	82	80,00	65	45	59	65	58,5
K/2010/03679	55	69	45	51	55,00	42	44	48	52	46,5
K/2010/10385	40	39	56	48	45,75	51	42	52	50	48,75
K/2010/12072	61	58	46	54	54,75	51	60	47	48	51,5
K/2010/14507	na	na	na	na		50	24	60	29	40,75
K/2010/14889	108	103	104	110	106,25	87	85	98	80	87,5
K/2010/15284	68	56	32	68	56,00	51	31	33	29	36
K/2010/15497	na	na	na	na		33	51	36	54	43,5
K/2010/21835	45	28	31	31	33,75	45	54	43	43	46,25
K/2010/23100	70	68	61	53	63,00	72	81	89	89	82,75
K/2010/23795	49	41	32	42	41,00	76	84	96	60	79
K/2011/12718	42	42	50	43	44,25	57	56	60	39	53
K/2012/9536-1	50	50	57	52	52,25	38	38	37	27	35
K/2012/9536-2	na	na	na	na		na	na	na	na	

Ergebnisse

K/2012/24908	na	na	na	na		33	50	56	42	45,25
K/2012/26738	78	86	85	82	82,75	44	54	44	43	46,25
K/2013/19521	61	29	50	71	52,75	53	67	59	54	58,25
K/2013/25136	36	47	48	50	45,25	68	74	63	96	75,25
Mittelwert MRKH					59,4					54,9
Standardabweichung					18,7					16,3
n =					17					20
Kontrollen	1. GF	2. GF	3. GF	4. GF		1. GF	2. GF	3. GF	4. GF	
K/2009/19809	47	40	49	54	47,50	34	35	49	46	41,00
K/2010/01829	46	62	46	58	53,00	15	36	54	72	44,25
K/2010/09292	41	65	48	54	52,00	55	57	47	75	58,50
K/2010/11238	74	49	62	72	64,25	50	28	55	76	52,25
K/2010/13091	120	65	51	68	76,00	120	54	71	43	72,00
K/2012/24226	58	44	51	54	51,75	77	64	63	45	62,25
K/2013/6976	90	69	77	56	73,00	53	66	56	56	57,75
K/2013/8685	58	45	56	61	55,00	62	75	56	58	62,75
K/2013/16487	44	48	34	34	40,00	60	57	85	87	72,25
K/2013/17217	84	79	48	55	66,50	58	63	90	64	68,75
Mittelwert Kontrollen					57,9					59,2
Standardabweichung					11,56					10,8
n =					10					10
Signifikanz (Wilcoxon)						p = 1,0	p = 0,322			

4. Diskussion

4.1 Herstellung von Primärkulturen endometrialer Stromazellen aus MRKH-Rudimenten

Mit Hilfe der präoperativen, bildgebenden Diagnostik und erprobter Präparations- und an Endometrium angewandter Kultivierungstechniken war es in der vorliegenden Arbeit erstmals möglich Primärkulturen endometrialer Stromazellen aus MRKH-Rudimenten zu etablieren. Der immunhistochemische Nachweis von ≥ 90 % CD10 positiven Zellen und positiven Estrogen- und Progesteronrezeptoren zeigte die Reinheit der Zellkulturen und fundierten das Kultivierungsprotokoll.

In einer Kohortenstudie von Oppelt *et al.* (2012) werden Uterusrudimente bei MRKH-Patientinnen mit einer Häufigkeit von 84,2 % beschrieben [8]. Die Studie von Rall *et al.* (2013) zeigte anhand von immunhistochemischen Färbungen in 19 von 42 Fällen sogar endometriales Gewebe in MRKH-Rudimenten, wovon der Großteil vom Basalis-Typ war [28]. Trotz der geringeren Verfügbarkeit von makroskopisch sichtbarem und für die Zellkultur ausreichendem MRKH-Endometrium, konnte die Dezidualisierung mithilfe des etablierten Protokolls, insgesamt an 11 Proben von 8 Patientinnen vollständig durchgeführt werden.

4.2 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen waren für die Identifizierung der isolierten Zelltypen einer Kultur notwendig, um die makroskopische Gewebepräparation vor allem bei MRKH-Gewebe zu kontrollieren und die Mitkultivierung unerwünschter Zelltypen auszuschließen. Der Nachweis von Hormonrezeptoren fundierte den hohen Anteil von ESC in Endometriumkulturen.

4.2.1 Funktionalität der Hormonrezeptorfärbungen

Aufgrund des positiven Ergebnisses der MCF-7-Zellfärbung können die immunhistochemischen Färbungen für Estrogen- und Progesteronrezeptoren als aussagekräftig angesehen werden. Das negative Ergebnis der MDA-MB-231-Zellen lässt die Markierung unspezifischer Bindungsstellen der 1. AK ausschließen.

4.3 Beeinträchtigte Dezidualisierung in endometrialen Stromazellen von MRKH-Patientinnen

4.3.1 Vergleich der Messergebnisse beider Dezidualisierungsmarker

Die Sekretion von Prolaktin und IGFBP-1 wurde als Indikator der Hormonrezeptorfunktionalität verwendet, da die Dezidualisierung nach Hormonstimulation *in vitro* durch einen Konzentrationsanstieg beider Proteine charakterisiert ist [57, 60] [75, 76].

Die Anfangskonzentrationen von IGFBP-1 an d 0 und d 3 waren sowohl bei MRKH- als auch bei Kontrollgewebe unerwartet hoch, was bei den Prolaktin-Messungen nicht der Fall war. Die Ursache der hohen IGFBP-1 Anfangskonzentrationen lässt sich womöglich auf das vor der Stimulation verwendete FCS-haltige Medium zurückführen. Dieses enthält eine unklar definierte Menge an Wachstumsfaktoren und Hormonen [77], welche die IGFBP-1 Produktion beeinflusst haben könnten. Dies erklärt allerdings nicht die adäquat niedrigen Prolaktinwerte zu Beginn, welche aus denselben Überständen gemessen wurden. Die IGFBP-1-Messung im FCS selbst, lag unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs und scheint für die hohen Anfangsmessungen daher nicht ursächlich zu sein.

Obwohl beide Proteinmessungen dieselbe Aussage (signifikant geringere Sekretionen, bei MRKH- als bei gesundem Kontrollgewebe) ergaben, werden aus oben genannten Gründen für die Diskussion der Ergebnisse hauptsächlich die Prolaktin-Werte herangezogen.

4.3.2 Beeinträchtigte Dezidualisierung von MRKH-Gewebe

Ein funktioneller Defekt der Hormonrezeptoren wurde bereits in vorausgehenden Studien als mögliche Ursache des MRKH-Syndroms vermutet. Hierbei wurde eine Überexpression von Hormonrezeptoren an Uterusrudimentgesamtgewebe in einer Mikro-Array Analyse als Kompensation eines Funktionsdefekts gedeutet [39]. In einer aufbauenden Studie an Gewebeschnitten zeigte sich im Endometrium kein mengenmäßiger Unterschied an Hormonrezeptoren, aber anhand des Ki67 Markers eine herabgesetzte Proliferationsaktivität, was wieder-

rum als direktes Resultat einer eingeschränkten Hormonrezeptorfunktionalität betrachtet werden könnte [28].

Darauf aufbauend sollte in dieser Studie die Funktionalität von Hormonrezeptoren von ESC anhand der estrogen- und progesteroninduzierten Konversion zu Dezidualzellen in der 2. Zyklushälfte (sog. Dezidualisierung) [78] [79], *-in vitro* getestet und mit Kontrollgewebe anhand des Konzentrationsanstiegs der Proteine Prolaktin und IGFBP-1 verglichen werden. Für optimale Bedingungen wurden bei der *in vitro* Dezidualisierung nur einmalig passagierte Primärkulturen (P 1) verwendet, um eine Reduktion des Potenzials zur Dezidualisierung zu vermeiden [80].

Bei allen ESC-Primärkulturen hysterektomierter Kontrollpatientinnen und bei 4 der 11 MRKH-Kulturen fand, gemessen an einem deutlichen Prolaktinanstieg, eine Dezidualisierung statt. MRKH-Kulturen erreichten gemessen an den Mittelwerten von d 9 nur 11 % der Prolaktinkonzentration von Kontrollkulturen. Bei 4 der 11 MRKH-Kulturen zeigte die Prolaktinkonzentration im Verlauf keinen Anstieg und lag an d 9 unterhalb des ELISA-Detektionslimits (15,6 pg/ml). Die beeinträchtigte Dezidualisierung bestärkt den Verdacht eines funktionellen Defekts der Hormonrezeptoren (ESR1 und PGR). Die wichtige Rolle des Estrogenrezeptors für die Entwicklung des weiblichen Genitals zeigt sich anhand der Ausbildung eines hypoplastischen Uterus bei knock-out Mäusen [81]. Außerdem wird eine Rolle des ESR1 bei der Initiierung der Dezidualisierung durch Induktion eines Anstiegs von Progesteronrezeptoren im endometrialen Stroma vermutet [82, 83]. Die Dezidualisierung verläuft vor allem progesteronabhängig, weshalb sie bei Mäusen mit ausgeschaltetem Progesteronrezeptor nicht stattfindet [82, 84].

Ebenfalls für Fehlbildungen des oberen Genitaltraktes bekannt, ist die Wirkung des synthetischen Estrogens Diethylstilbestrol (DES) [85]. Dieses kann bei pränataler Exposition zu einer abnormalen Entwicklung der Vagina, Cervix und des Uterus führen [86, 87] [88]. Desweiteren leiden die Betroffenen unter anderem häufiger an Sterilität, Spontanaborten, Frühgeburten und ektopen Schwangerschaften [89].

Da auch Hox- und Wnt-Gene an der Entwicklung der Müller Gänge beteiligt sind [50, 54] [52, 53], wäre ihre Beteiligung bei der Entstehung hormonrezeptorbedingter, genitaler Fehlbildungen, plausibel. Wie Hormonrezeptoren spielen Hoxa10, Hoxa11 und Wnt4 neben der embryologischen Entwicklung des Genitaltraktes (s.o.) auch in der Regulation der Dezidualisierung des erwachsenen Uterus (gezeigt an Mäusen) eine entscheidende Rolle [90-93]. In jedem menstruellen Zyklus lassen sich zudem aus der Embryologie bekannte Mechanismen wie Proliferation und Differenzierung von Gewebe wiederfinden [13] [55], was die Beteiligung gleichartiger Signalwege wahrscheinlich macht. Die für die eingeschränkte Proliferationskapazität [28] und Fähigkeit zur Dezidualisierung von MRKH-Endometrium als ursächlich vermuteten, defekten Hormonrezeptoren, lassen sich dementsprechend auch als Mitverursacher der embryologischen Fehlbildung des MRKH-Syndroms vermuten. Auch das morphologische Bild der Uterus-Fehlbildungen von Hormonrezeptor knock-out Mäusen (s.o.) würde dem entsprechen.

Da andere hormonabhängige Organe wie beispielsweise Ovarien und auch sekundäre Geschlechtsmerkmale bei MRKH-Patientinnen normal ausgebildet sind [2], scheint ein systemischer Verlust der Funktion von Hormonrezeptoren unwahrscheinlich. Eher anzunehmen ist ein lokaler Defekt welcher, wenn beidseits Rudimente vorhanden sind, anhand der sehr ähnlichen Prolaktinsekretionen beide gleichermaßen zu betreffen scheint.

4.3.3 Variierende Prolaktinsekretion der Uterusrudimente

Im Vergleich der einzelnen MRKH-Rudimente zeigten sich teilweise Schwankungen in der Prolaktinsekretion. Die 3 Rudimentenpaare, die je von einer Patientin stammten, korrelierten untereinander stark in ihren Prolaktinsekretionen. Ein deutlicher Anstieg der Prolaktinkonzentration als Reaktion auf die hormonelle Stimulation, konnte nur bei 4 der 11 Rudimente festgestellt werden, wobei es sich um das rechte und linke Rudiment von jeweils 2 MRKH-Patientinnen handelte. Diese unterschieden sich durch ihre Nebendiagnosen von den anderen Patientinnen (s. Tab. 14 a). Bei der Patientin der Rudimente M 25/26, welche die höchste Prolaktinsekretion der Rudimente erreichten, wurden nebenbefundlich eine Ovarialzyste und konsekutiv erhöhte Estrogen- und

Progesteronwerte im Blutserum, sowie Adenomyose im linken Rudiment (M 26) festgestellt. Bei der Patientin der Rudimente M 45/46 konnte ebenfalls Adenomyose in beiden Rudimenten, sowie Endometriose festgestellt werden, wobei es sich um hormonabhängige Erkrankungen handelt [94].

Wie bedeutend die Funktionalität von Hormonen und ihren Rezeptoren für die Funktion und Gesundheit des erwachsenen Uterus ist, sieht man an Erkrankungen des weiblichen Genitaltraktes die laut Studien durch veränderte Expression von Hormonrezeptoren charakterisiert sind, wie Endometriose [95-97] und uterine Leiomyome [98-100]. Endometriose ist eine estrogeninduzierte Erkrankung, in deren Gewebe eine erhöhte Aromataseaktivität mit konsekutiv erhöhter Estrogenkonzentrationen vorliegt [101]. Auch die HOX-Expression zeigt sich in Endometrium von an Endometriose erkrankten Patientinnen verändert [67, 102]. Die HOX-Expression wird durch Estrogen und Progesteron reguliert [65] und ist wiederum auch für die durch Progesteron induzierte Dezidualisierung ein unverzichtbarer Faktor, wie sich bei der Infertilität durch fehlerhafte Implantation von knock-out Mäusen zeigt [92, 103].

Bei der MRKH-Patientin mit zusätzlicher Ovarialzyste hatten die erhöhten Hormonwerte im Serum eventuell eine Proliferation von ursprünglich rudimentären Endometrium induziert und damit auf die Dezidualisierung einen unterstützenden Effekt gehabt. Auch bei Frauen mit normal ausgebildeten Uteri können erhöhte Estrogenwerte zu einer Endometriumhyperplasie führen [104, 105].

Die genannten Nebendiagnosen der Patientinnen der Rudimente M 25/26 und M 45/46 scheinen hier hinsichtlich der Dezidualisierung einen partiell kompensatorischen Effekt gehabt zu haben, eine Ähnlichkeit ihrer Signalwege und Entstehungsmechanismen mit denen des MRKH-Syndroms wäre somit denkbar.

Eine weitere mögliche Ursache für die variierenden Prolaktinsekretionen bei MRKH-Rudimenten, ist die unterschiedliche endometriale Differenzierung der Rudimente in den Patientinnen selbst. Wie in der Studie von Rall *et al.* (2013) beschrieben, enthalten die meisten MRKH-Rudimente nur Endometrium vom Basalis Typ. Seltener konnte sowohl ein Basalis- als auch ein Functionalis-Typ nachgewiesen werden [28]. Eine unterschiedlich ausgeprägte Differenzierung von Endometrium in den Rudimenten konnte auch histologisch in dieser Studie

anhand der HE-Gewebeschnitte der Rudimente gezeigt werden (s. Tab. 14 b). Dabei korrelierte in den meisten Fällen die Aktivität und Ausdifferenzierung des Endometriums mit der Höhe der Prolaktinkonzentrationen an d 9 (pg/ml), in Form sehr niedriger Konzentrationen bei ruhendem- und hohen Konzentrationen bei Endometrium in der Proliferations- oder Sekretionsphase. Dies lässt vermuten, dass Endometrium bereits im Körper der Patientinnen reagiert oder kaum bzw. keine Reaktion auf Hormone und somit keine Differenzierung von Endometrium zeigt. Daher fand womöglich bei manchen der MRKH-Zellkulturen eine Dezidualisierung statt und bei anderen nicht. Darauf aufbauend, wurde in einer Fortsetzung dieser Studie die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 von Brucker *et al.* (2016, Publikation eingereicht) an immunhistochemisch gefärbten Schnitten der Rudimente von welchen die Gewebe der dezidualisierten Zellkulturen stammten, gemessen. Die Ki67 Expressionen korrelierten dabei positiv mit der Höhe der jeweiligen Prolaktinsekretionen der MRKH-Zellkulturen, was die Hypothese bestärkte (Frau Professor Dr. S. Brucker, persönliche Mitteilung).

Natürlich kann mit Hilfe des Ansatzes der Dezidualisierung nicht völlig ausgeschlossen werden, dass auch andere daran beteiligte Signalwege oder Gene involviert sind. Auch kann der ursächliche Defekt der Dezidualisierung bei anderen zwischengeschalteten Faktoren liegen. Dennoch erhärten die Ergebnisse einer signifikant niedrigeren Dezidualisierung bei ESC-Kulturen von MRKH-Gewebe die Hinweise, auf einen lokalen Funktionsdefekt dieser Hormonrezeptoren an Geweben aus denen die Zellkulturen entnommen wurden, deutlich.

4.4 Hormonrezeptoren bei aufsteigend passagierten und stimulierten endometrialen Stromazellen

Nach dem Protokoll von Fluhr *et al.* (2006) [62] sollte die Dezidualisierung nur an Endometriumkulturen niedriger Passagen durchgeführt werden. Wolff *et al.* (2002) [80] beschreibt in seiner Arbeit einen Rückgang der IGFBP-1- und Prolaktin-Sekretion in höheren Passagen. Um möglichst die besten Bedingungen für die Dezidualisierung von MRKH- und Kontrollgewebe zu schaffen und diese miteinander vergleichen zu können, wurde die Dezidualisierung stets mit Zellen der Passage 1 durchgeführt. Dies geschah auch in der Absicht, dass

Reaktionen und Mechanismen der noch vorzugsweise wenig manipulierten Zellen der Situation *in vivo* möglichst ähnlich sein sollten.

Dennoch wäre die Möglichkeit die Versuche mit höheren Passagen mit derselben Aussagekraft durchführen zu können in Anbetracht des geringen MRKH-Endometriums von Vorteil gewesen. Da die Dezidualisierung vor allem durch Progesteron induziert wird [78, 79] stellte sich die Frage, ob ESC durch die Passagierung ihre zellspezifische Ausdifferenzierung, beispielsweise in Form eines Verlustes der Expression von Hormonrezeptoren verlieren, und die Sekretion von IGFBP-1 und Prolaktin daher in höheren Passagen schwächer ist. Diese Hypothese konnte durch die immunhistochemische Färbung der Hormonrezeptoren von Endometriumkulturen in verschiedenen Passagen allerdings nicht bestätigt werden, da vor allem Progesteronrezeptoren bis Passage 5 nachweisbar waren.

Bei den über mehrere Passagen hormonell stimulierten Zellen fällt in Passage 5 ein höherer Anteil an Progesteronrezeptoren auf, als bei den unstimulierten. Auch in anderen Studien konnte bei endometrialen Stromazellen *in vitro* die Induktion von Estrogen- und Progesteronrezeptoren durch hormonelle Stimulation beobachtet werden [106-108]. Ein interessanter Ansatz für die zukünftige Forschung am MRKH-Syndrom wäre, ob und in welchen Maßen diese Rezeptorinduktion bei MRKH-Endometrium stattfindet.

4.5 Stimulationsversuche mit Myometrium aus MRKH-Rudimenten

Wie man an der Zellhyperplasie und -Proliferation der glatten Muskulatur während der Schwangerschaft beobachten kann, ist auch Myometrium durch Hormone stimulierbar [56]. Diese Mechanismen sollten durch hormonelle Stimulation von Myometrium *in vitro* nach dem Protokoll von Kornyei *et al.* (1999) [72] zwischen MRKH- und Kontrollmyometrium verglichen werden. Die Herstellung der Rein- und Mischkulturen aus den Uteri von Kontrollpatientinnen und den MRKH-Rudimenten konnte, wie durch immunhistochemischen Färbungen gezeigt, erfolgreich etabliert werden.

4.5.1 Proliferation von Myometrium

Laut dem Protokoll von Kornyei *et al.* (1999) [72] sollte die Zahl der Myometrium-Mischkulturen während der Tage mit hormoneller Stimulation, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, um 40 % ansteigen.

Allerdings zeigten sich anhand der Mittelwerte der Proliferationsversuche mit Myometrium-Mischkulturen kaum bzw. keine Unterschiede zwischen un- und stimulierter Zellproliferation, sowohl bei MRKH- als auch bei Kontrollgewebe. Das MRKH-Gewebe zeigte bei Mischkulturen insgesamt eine etwas stärkere Proliferation, als Kontrollgewebe.

Auch die Mittelwerte der Proliferationsversuche an Myometrium-Reinkulturen sowohl bei Kontroll-, als auch bei MRKH-Gewebe entsprachen nicht den Erwartungen des Versuchsprotokolls. Es zeigten sich kaum bzw. keine Unterschiede zwischen un- und stimulierten Zellproliferation. MRKH-Gewebe zeigte bei Reinkulturen sowohl stimuliert als auch unstimuliert etwas geringere Proliferationszahlen, als Kontrollgewebe. Wobei Kornyei *et al.* darauf hinweist, dass Estrogen in der verwendeten Dosis bei Reinkulturen keinen stimulativen Effekt auf die Proliferation hat. Vielmehr sollte hier das Verhalten von MRKH- und Kontrollgewebe verglichen werden.

Demnach zeigten sich an d 9 kleine Unterschiede der Zellzahlen, da aber der Grundversuch (nach Kornyei *et al.*) der verstärkten Proliferation bei hormoneller Stimulation an Kontrollgewebe nicht reproduziert werden konnte kann für die Frage der Funktionalität von Hormonrezeptoren bei MRKH-Myometrium, verglichen an der von Myometrium normal entwickelter Uteri, keine Aussage getroffen werden. Eine zu dichte Aussaat der Zellen wäre eine mögliche Fehlerquelle, da Zellkontakte bei Konfluenz wachstumshemmend wirken können, weshalb Kornyei *et al.* den Proliferationsversuch vor erreichter Konfluenz beendet. Desweiteren handelte es sich nur um eine kleine Probenanzahl, weshalb sich Proliferationsunterschiede und hormonelle Effekte womöglich nicht verdeutlichen konnten. Auch variierten die Einzelwerte einer Gewebegruppe teilweise stark untereinander, sodass ein Vergleich der Mittelwerte weniger repräsentativ ist.

4.5.2 Giant cells

Nach dem Protokoll von Kornyei *et al.* (1999) sollte die Größe bei einem Teil der Myometriummzellen durch hormonelle Stimulation die den Estrogen- und Progesteronwerten einer Schwangerschaft entspricht, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ansteigen. Sie besaßen nach dem Versuch im Durchschnitt $22,04 (\pm 0,41) \mu\text{m}$ wenn sie nicht behandelt wurden, und $25,79 (\pm 0,7) \mu\text{m}$ wenn sie hormonell stimuliert wurden.

In den Versuchen zeigten sich mikroskopisch eine uneinheitliche Größenverteilung und kein eindeutiger Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen, sowohl bei MRKH- und Kontrollgewebe. Da das Protokollergebnis bereits an Kontrollgewebe nicht erfolgreich reproduziert wurde, konnte kein Vergleich mit MRKH-Gewebe gezogen werden. Da laut Protokoll nur ein Teil der Zellen diese enorme Größenzunahme zeigt, könnte die mikroskopische Beurteilung mit einer zu geringen Zelldichte in der Zählkammer, eine mögliche Fehlerquelle sein.

4.6 HOXA10, Pax8 und CD31 Expression in MRKH- und Kontrollgewebe

4.6.1 Geringere HOXA10-Expression in MRKH-Endometrium vom Basalis Typ
HOX-Gene spielen in der embryonalen Gliederung und Organogenese, insbesondere zur Entwicklung des Genitaltraktes und der Differenzierung von Nieren und Skelett eine entscheidende Rolle [39]. Entlang der Achse des sich entwickelnden Müller-Gangs, aus welchem sich Eileiter, Uterus, Cervix und der obere Teil der Vagina entwickeln, wird vier exprimierten HOXA-Genen eine wichtige Bedeutung zugesprochen. Dabei wird HOXA9 in hohen Maßen in Arealen exprimiert, aus welchen sich die Eileiter entwickeln, HOXA10 in Arealen des sich entwickelnden Uterus, HOXA11 im unteren Uterusbereich und der Cervix und HOXA13 im oberen Bereich der Vagina [53].

Die Hormone Estrogen und Progesteron gehören zu den Regulatoren der HOX-Gen-Expression [65]. Mäuse welche dem synthetischen Estrogen DES ausgesetzt waren, zeigten veränderte HOX-Expressionen im weiblichen Genitaltrakt [109]. Auch nach der embryologischen Entwicklung ist HOXA10 wichtig für die Rezeptivität des Uterus, dies zeigt sich an Knockout-Mäusen, welche zwar eine

normale Ovulation besitzen, aufgrund einer fehlerhaften Implantation und Tod des Embryos in den ersten Tagen (Präimplantationszeit) jedoch häufig steril sind [110]. Denn HOXA10 wird auch in den endometrialen Drüsen- und Stromazellen des adulten Uterus estrogen- und progesteronabhängig exprimiert. Dabei zeigt es immunhistochemisch einen Anstieg in den endometrialen Drüsen im Implantationsfenster der mittleren sekretorischen Phase und scheint demnach ein relevanter Faktor für die Implantation des Embryos zu sein [64, 65]. Eine aberrante HOXA10-Expression ist mit mehreren Pathologien des weiblichen Reproduktionstraktes assoziiert. Bei Patientinnen mit Endometriose und folgender Infertilität beispielsweise, zeigt sich kein HOXA10- und HOXA11-Expressionsanstieg in der mittleren Sekretionsphase des Endometriums [67]. Auch Patientinnen mit submukösen Myomen besitzen immunhistochemisch eine niedrigere HOXA10-Expression im endometrialem Stroma [111], ebenso Patientinnen mit Adenomyose [112].

In der Forschung des MRKH-Syndroms konnten HOX-Gene bisher zwar nicht als ursächlich identifiziert werden [43], aufgrund der Rolle von HOXA10, sowohl im sich embryologisch entwickelnden als auch im adulten Uterus (s.o.) und aufgrund des nicht ausgebildeten Uterus bei MRKH-Patientinnen, war die Untersuchung der HOXA10-Expression im Vergleich zu Kontrollgewebe dennoch von Interesse. Desweiteren wurde in der Expression- und Methylierungsstudie von Rall *et al.* (2011) eine Hypomethylierung und korrespondierende Überexpression von HOXA9 in MRKH-Gewebeschnitten entdeckt, was unter anderem ein fehlerhaftes HOXA10 zur Ursache haben könnte [39].

In den Ergebnissen zeigte sich eine signifikant niedrigere HOXA10-Expression in MRKH-Endometrium vom Basalis-Typ. In Endometrium vom Funktionalis-Typ und Myometrium konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Allerdings handelte es sich beim Endometrium vom Funktionalis-Typ um eine kleinere Probengröße, da diese in MRKH-Rudimenten seltener zu finden war, wie es bereits in der Studie von Rall *et al.* (2013) gezeigt wurde [28].

In Studien wird HOXA10 eine Bedeutung für die Differenzierung von Endometrium zugeschrieben [113]. Endometrium ist eines der dynamischsten Gewebe des menschlichen Körpers, welches regelmäßige Veränderungen

durchläuft [65]. HOX-Gene sind als Regulatoren der Körperachsen verantwortlich für Plastizität und Richtungsweisung während der embryonalen Entwicklung [53, 114]. Die auch nach der embryologischen Entwicklung persistierende und hormonabhängige HOXA10 Expression ist womöglich für bleibende Plastizität der fortlaufende zyklische Prozesse wie Proliferation und Differenzierung von Bedeutung, denn im weiblichen Reproduktionssystem finden u.a. während des Zyklus oder einer Schwangerschaft extreme strukturelle und funktionelle Veränderungen statt, welche einen hohen Grad an Regulation zur Entwicklung und Plastizität benötigen [53]. Die fehlende bzw. nur rudimentäre Ausbildung des Uterus und schwächere Ausbildung und Proliferationskapazität von Endometrium bei MRKH-Patientinnen [28] ließe sich demnach durch verminderte oder fehlerhafte Regulationseigenschaften des HOXA10 in Verbindung bringen. Auch die Rolle von HOX-Genen in der Entwicklung von Nieren und Knochen und den mit dem MRKH-Syndrom assoziierten Fehlbildungen von Nieren und Skelettsystem [29, 40] lässt einen Zusammenhang vermuten.

Die in dieser Arbeit dargestellte signifikant niedrigere Expression in MRKH-Endometrium vom Basalis-Typ unterstützt diese These. Womöglich war die niedrigere Expression hier für eine vollständige plastische Ausbildung und Differenzierung eines funktionsfähigen Endometriums nicht ausreichend, weshalb sich auch in vielen Rudimenten nur Endometrium vom Basalis-Typ findet.

In der Studie von Ekici *et al.* (2013) [115] wurde im Hinblick auf DNA-Variationen eine Sequenzierung der Gene HOXA10 und HOXA13 bei einer Kohorte von 20 MRKH-Patientinnen, 9 Patientinnen mit anderen genitalen Malformationen („non-MRKH“) und 53 Kontrollpatientinnen durchgeführt. Hierbei konnten unter anderem drei DNA-Variationen bei MRKH-Patientinnen (eine davon bei HOXA10) und sechs HOXA10-Variationen bei den „non-MRKH“ Patientinnen (unter anderem resultierend in einer „missense“-Mutation und einem Stopp-Codon) festgestellt werden. Diese „non-MRKH“ Patientinnen wiesen Malformationen wie Uterus bicornis und septus, 3 Ureter und 2 linke Nieren auf. Die Mutationen könnten zu einer veränderten HOXA10-Funktion oder -Expression geführt haben. Teilweise sind diese Malformationen entwicklungsgeschichtlich mit denen des MRKH-Syndroms verwandt. Variationen der HOXA10-Gene die

über die Entwicklung der Müller-Gänge zu einer Fehlentwicklung des inneren weiblichen Genitals in Form von „non-“ oder auch MRKH-Syndromen führen könnten zu identifizieren, gilt daher weiterhin ein Bestandteil der Ursachenforschung am MRKH-Syndrom.

In der kritischen Betrachtung dieser Studie muss darauf hingewiesen werden, dass der in anderen Studien immunhistochemisch festgestellte mittlere sekretorische Anstieg der HOXA10-Expression in endometrialen Drüsen [64, 65] bei Kontrollgewebe innerhalb dieser Studie nicht bestätigt werden konnte. Allerdings wurde die Zyklusphase des Endometriums hier über Hormonprofile im Serum (einen Tag vor oder nach der Operation) und durch einen gynäkologisch spezialisierten Pathologen histologisch anhand der Gewebeschnitte in proliferativ oder sekretorisch eingeteilt. In der zugrundeliegenden Publikation dagegen, wurde sie anhand der morphologischen Beurteilung nach Noyes *et al.* (1950) [116] ermittelt.

Unter den Kontrollpatientinnen wurde unter anderem bei 2 eine Adenomyose und bei 6 ein oder mehrere Myome festgestellt (3 davon submukös), was bekanntlich zu einer verringerten HOXA10-Expression im endometrialen Stroma führt (s.o.). Bei den Patientinnen mit Adenomyose zeigte sich dies direkt im Vergleich zu den anderen Kontrollpatientinnen mit niedrigeren IR-Scores des Endometriums. Auch die HOXA10-Expression des Endometriums der Kontrollpatientinnen wäre teilweise ohne Nebendiagnosen womöglich höher gewesen. Demnach müsste die Signifikanz der HOXA10-Expressionsunterscheide von Kontrollpatientinnen ohne diese Nebendiagnosen zu MRKH-Patientinnen noch höher sein.

4.6.2 Keine signifikanten Unterschiede in der Pax8-Expression zwischen Kontroll- und MRKH-Gewebe

In einer Studie von Yemelyanova *et al.* (2014) wurde Pax8 als Marker für verschiedene Adenokarzinome des Uterus beurteilt, in welchen eine höhere Expression vorlag, als in gutartigem Gewebe [117]. Doch Pax8 spielt nicht nur in malignen Pathologien, sondern auch in der Entwicklung des Uterus eine Rolle. Es wird in der embryologischen Entwicklung zusammen mit Pax2 in den Wolff-, Müller-Gängen und Nieren coexprimiert [69, 70].

Mäuse mit ausgeschaltetem Pax8 leiden neben einer angeborenen Schilddrüsenunterfunktion auch an einer Infertilität. Anstatt eines Uterus entwickeln die T₄-substituierten Pax8 (-/-) Mäuse nur kleine Rudimente aus Myometrium. Die Ausbildung eines Lumens oder von Endometrium dagegen bleibt aus. Außerdem besitzen die Mäuse keine vaginale Öffnung, dagegen aber normal entwickelte Tuben, Cervix und oberen Vaginalabschnitt. Demnach scheint Pax8 eine direkte morphologische Rolle in der Entwicklung des Uterus zu spielen. Da Pax8 auch in humanem Endometrium exprimiert wird, scheint es für eine adäquate Entwicklung von Uterus und Endometrium mitverantwortlich zu sein [118]. Das morphologische Bild des weiblichen Reproduktionstraktes in Pax8 (-/-) Mäusen erinnert an jenes von MRKH-Patientinnen. In unseren Versuchen wurden daher die Pax8-Expression in auf Pax8-gefärbten Schnitten des endometrialen Drüsenepithels von MRKH- und Kontrollgewebe anhand des IR-Scores ausgewertet. Hierbei zeigten sich zwar sowohl in Basalis, als auch in Functionalिस höhere Werte bei Kontroll- als bei MRKH-Gewebe, allerdings ergab sich für diese Unterschiede keine Signifikanz. Die Annahme, dass Pax8 in der Ätiopathologie des MRKH-Syndroms beteiligt ist, konnte über diesen methodischen Ansatz der Expressionsunterschiede weder signifikant bewiesen, noch ausgeschlossen werden.

4.6.3 Keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Gefäßanschnitten zwischen MRKH- und Kontrollgewebe

In einer Studie von Rall *et al.* (2015) wurden Blut, Speichel und rudimentäres Uterusgewebe von 5 diskordanten MRKH-Zwillingen analysiert und über copy number variations mit ihren monozygoten Zwillingspartnerinnen verglichen. Hierbei wurden unter anderem Gene der Neoangiogenese als Kandidatengene des MRKH-Syndroms identifiziert [71]. Der VEGF C ist ein regulatorisches Protein der Angiogenese, wobei er mit den endothelialen Tyrosinkinaserzeptoren FLT1 und KDR interagiert [71, 119]. Bei Anomalien der Müllergänge welche zu einem septierten Uterus führten konnte in einer Studie eine geringere mRNA -Expression von FLT1 und KDR im Endometrium des Septumbereiches gezeigt werden [120]. Auch führt die Behandlung von Mäusen

mit DES zu einer geringeren Konzentration an Angiogenesefaktoren, welche wahrscheinlich für eine geringere Gefäßdichte und daraus resultierenden uterine Malformationen verantwortlich ist [121].

Aufgrund dieser Aspekte wurde in unseren Versuchen die Anzahl von Gefäßanschnitten entsprechend der Angiogenese von MRKH- und Kontrollgewebe anhand auf CD31 gefärbter Schnitte verglichen. Hierbei zeigte sich eine etwas erhöhte Gefäßdichte in MRKH-, als in Kontrollendometrium und eine erhöhte Gefäßdichte in Kontroll-, als in MRKH-Myometrium, allerdings ergaben sich für diese Unterschiede keine Signifikanzen. Daher konnte die Annahme, dass die Angiogenese in der Ätiopathologie des MRKH-Syndroms beteiligt ist, im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte bei MRKH-Patientinnen eine deutlich beeinträchtigte Dezidualisierung endometrialer Stromazellen, sowie eine signifikant geringere HOXA10-Expression der endometrialen Stromazellen im basalen Endometrium, im Vergleich zu den Ergebnissen hysterektomierter Kontrollpatientinnen gezeigt werden. Aufgrund der essentiellen Bedeutung von Estrogen- und Progesteronrezeptoren und HOXA-Genen in der Entwicklung des weiblichen Genitalsystems lässt dies einen Zusammenhang mit der Entwicklung des MRKH-Syndroms vermuten.

Aufgrund der Seltenheit des MRKH-Syndroms und der daraus resultierenden kleinen Fallzahl und somit geringen Repräsentativität dieser Studie, sollte vor allem die Untersuchung der Dezidualisierung an zukünftig gewonnenem MRKH-Gewebe fortgeführt werden. Die beeinträchtigte Dezidualisierung bei MRKH-Patientinnen lässt einen Defekt der Hormonrezeptoren vermuten. Allerdings kann bei ihrer Untersuchung durch den Versuch der Dezidualisierung *in vitro* ein anderer für die geringere Produktion der Proteine IGFBP-1 und Prolaktin ursächlicher Defekt von beispielsweise zwischengeschalteten Faktoren nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten zusätzliche Studien diesbezüglich erfolgen. Zwar sind die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse aktuell für MRKH-Patientinnen nur von geringer diagnostischen oder therapeutischen Relevanz, jedoch kann die Ursachenforschung des Syndroms eine wichtige Grundvoraus-

Diskussion

setzung für zukünftige diagnostische und therapeutische Aspekte sein. Außerdem stellt sie einen wesentlichen Bestandteil für das Verständnis dieser komplexen Fehlbildung dar, was wiederum für den Umgang der Patientinnen mit ihrer Erkrankung von Bedeutung sein kann.

5. Zusammenfassung

Das Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom (MRKH-Syndrom) ist durch eine kongenitale Aplasie von Uterus und oberer Vagina (2/3) gekennzeichnet. Mit einer Inzidenz von ca. 1:4500 der weiblichen Neugeborenen, ist es die zweithäufigste Ursache für eine primäre Amenorrhöe. Nach anfänglicher Annahme eines rein sporadischen Auftretens, belegten mehrere Untersuchungen eine familiäre Häufung der Erkrankung. Jedoch konnte trotz einiger Hinweise auf mögliche Kandidatengene noch keine genaue Ursache für das Auftreten des MRKH-Syndroms gefunden werden. Man geht nach derzeitigem Forschungsstand von einer multifaktoriellen oder epigenetischen Ursache aus. Eine zentrale Rolle in der Entwicklung des weiblichen Reproduktionstraktes, sowie dessen physiologischen und pathologischen Prozesse spielen die Sexualhormone Estrogen, Progesteron und deren Rezeptoren. In einer Publikation von Rall *et al.* (2011), in der differentiell methylierte und exprimierte Gene bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom beschrieben wurden, ließ eine Überexpression von Hormonrezeptoren eine Kompensation aufgrund von Dysfunktion vermuten.

Ziel dieser Arbeit war es, in erster Linie endometriale Stromazellen aus Uterusrudimenten von Patientinnen mit MRKH-Syndrom zu gewinnen und mittels Dezidualisierung auf ihre Funktionalität von Hormonrezeptoren zu untersuchen. Der Vergleich mit den Ergebnissen von Endometrium normal entwickelter Uteri ergab eine deutlich beeinträchtigte Dezidualisierung bei MRKH-Gewebe. Dies lässt einen möglichen Zusammenhang von funktionell eingeschränkten Hormonrezeptoren und der Entwicklung des MRKH-Syndroms vermuten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die Expressionen von HOXA10, Pax8 und CD31 (als Parameter der Angiogenese) anhand immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte zwischen MRKH- und Kontrollgewebe verglichen werden. Dabei stellte sich eine geringere HOXA10-Expression im basalen Endometrium von MRKH-Rudimenten heraus. Unterschiede in der PAX8-Expression und Angiogenese konnten innerhalb dieser Studie nicht ausreichend bestätigt werden.

Sowohl Estrogen- und Progesteronrezeptoren, als auch HOXA-Gene sind für die Entwicklung des weiblichen Genitalsystems essentiell. Mehrere Studien be-

legten dies anhand von Malformationen bei knock-out Mäusen und DES exponierten Patientinnen. Desweiteren ist HOXA10 notwendig für die durch Progesteron induzierte Dezidualisierung endometrialer Stromazellen. Beide Faktoren sowohl die HOXA10-Expression, als auch die Dezidualisierung weichen in dieser Studie bei MRKHs von der Norm ab. Die Malformationen bei beeinträchtigten HOXA-Genen und Hormonrezeptoren und die Fehlbildungen der MRKH-Patientinnen zeigen morphologische Ähnlichkeiten. Zusammen mit den vorgestellten Ergebnissen lässt dies Defekte der HOXA10-Expression und Hormonrezeptorfunktion, als ursächlich für die Malformationen bei MRKH-Patientinnen vermuten.

6. Literaturverzeichnis

1. Morcel, K., et al., [*The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: clinical description and genetics*]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2008. **37**(6): p. 539-46.
2. Oppelt, P., et al., *Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging*. Hum Reprod, 2006. **21**(3): p. 792-7.
3. Folch, M., I. Pigem, and J.C. Konje, *Mullerian agenesis: etiology, diagnosis, and management*. Obstet Gynecol Surv, 2000. **55**(10): p. 644-9.
4. Rall, K. and S. Brucker, *Die 3 A der Vaginalaplasie – kein differentialdiagnostisches Chamäleon*. FRAUENARZT, 2007: p. 48(10): 940-948.
5. Griffin, J.E., et al., *Congenital absence of the vagina. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Ann Intern Med, 1976. **85**(2): p. 224-36.
6. Mayer, C.A., *Über Verdoppelungen des Uterus und ihre Arten, nebst Bemerkungen über Hasenscharte und Wolfsrachen*. J Chir Augen, 1829: p. 13:525-564.
7. Rokitansky, C., *Über die sogenannten Verdoppelungen des Uterus*. Med Jahrb Öst Staat, 1838: p. 26:39-46.
8. Oppelt, P.G., et al., *Malformations in a cohort of 284 women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (MRKH)*. Reprod Biol Endocrinol, 2012. **10**: p. 57.
9. Küster, H., *Uterus bipartus solidus rudimetarius cum vagina solida*. Z Geburtshilfe Gynäkol, 1910: p. 67:692-718.
10. Hauser, G.S., WE, *Mayer-Rokitansky-Kuester syndrome. Rudimentary solid bipartite uterus with solid vagina*. Schweiz Med Wochenschr, 1961: p. 91:381-384.
11. Hohl, M.K., *Modernes Management der angeborenen (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom, MRKH) und erworbenen Vaginalaplasie*. Frauenheilkunde aktuell, 2007: p. 1:4-12.
12. Kirsch, J., *Duale Reihe Anatomie. Embryologie - Grundlagen*. Stuttgart. Thieme Verlag, 2007: p. 80.
13. Schulte, E., *Duale Reihe Anatomie. Entwicklung des Urogenitalsystems*. Stuttgart. Thieme Verlag, 2007: p. 845-856.
14. Torres, M., et al., *Pax-2 controls multiple steps of urogenital development*. Development, 1995. **121**(12): p. 4057-65.
15. Weyerstahl, T.S., M., *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. Auflage*. 2013: p. 43.
16. Pizzo, A., et al., *Mayer-rokitansky-kuster-hauser syndrome: embryology, genetics and clinical and surgical treatment*. ISRN Obstet Gynecol, 2013. **2013**: p. 628717.
17. Gell, J.S., *Mullerian anomalies*. Semin Reprod Med, 2003. **21**(4): p. 375-88.
18. Sajjad, Y., *Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo*. J Obstet Gynaecol Res, 2010. **36**(5): p. 929-37.
19. Rey, R. and J.Y. Picard, *Embryology and endocrinology of genital development*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1998. **12**(1): p. 17-33.
20. Ulfing, N., *Kurzlehrbuch Embryologie. 2. Auflage*. Georg Thieme Verlag, 2009: p. 127-128.
21. Hashimoto, R., *Development of the human Mullerian duct in the sexually undifferentiated stage*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2003. **272**(2): p. 514-9.

22. Fraser, I.S., et al., *Cyclical ovarian function in women with congenital absence of the uterus and vagina*. J Clin Endocrinol Metab, 1973. **36**(4): p. 634-7.
23. Brown, J.B., R. Kellar, and G.D. Matthew, *Preliminary observations on urinary oestrogen excretion in certain gynaecological disorders*. J Obstet Gynaecol Br Emp, 1959. **66**(2): p. 177-211.
24. Strissel, P.L., et al., *Assessment of pituitary and steroid hormones and members of the TGF-beta superfamily for ovarian function in patients with congenital uterus and vaginal aplasia (MRKH syndrome)*. Horm Metab Res, 2009. **41**(5): p. 408-13.
25. Brucker SY, O.P., Ludwig KS, Wallwiener D, Beckmann MW, *Vaginale und uterine Fehlbildungen – Teil 2* Geb Fra., 2005: p. 66(11):R221-R224.
26. Marsh, C.A., et al., *Uterine remnants and pelvic pain in females with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2013. **26**(3): p. 199-202.
27. Will, M.A., et al., *Surgical pearls: laparoscopic removal of uterine remnants in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2013. **26**(4): p. 224-7.
28. Rall, K., et al., *Uterine rudiments in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome consist of typical uterine tissue types with predominantly basalis-like endometrium*. Fertil Steril, 2013. **99**(5): p. 1392-9.
29. Morcel, K., et al., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 13.
30. Duncan, P.S., LR; Stangel, JJ; Klein, RM; Addonizio, JC;, *The MURCS association: Müllerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia*. J Pediatr, 1979: p. 95:399-402.
31. Rall, K., et al., *Typical and Atypical Associated Findings in a Group of 346 Patients with Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser Syndrome*. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2015. **28**(5): p. 362-8.
32. Oppelt, P., et al., *The VCUAM (Vagina Cervix Uterus Adnex-associated Malformation) classification: a new classification for genital malformations*. Fertil Steril, 2005. **84**(5): p. 1493-7.
33. Grimbizis, G.F., et al., *The ESHRE-ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies*. Gynecol Surg, 2013. **10**(3): p. 199-212.
34. Simpson, J.L., *Genetics of the female reproductive ducts*. Am J Med Genet, 1999. **89**(4): p. 224-39.
35. Martinez-Frias, M.L., et al., *Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers*. Am J Med Genet, 1998. **78**(2): p. 140-5.
36. Wottgen, M., et al., *Higher incidence of linked malformations in siblings of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser-syndrome patients*. Hum Reprod, 2008. **23**(5): p. 1226-31.
37. Hoffmann, W., G. Grospietsch, and W. Kuhn, *Thalidomide and female genital malformations*. Lancet, 1976. **2**(7989): p. 794.
38. Guerrier, D., et al., *The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina)--phenotypic manifestations and genetic approaches*. J Negat Results Biomed, 2006. **5**: p. 1.
39. Rall, K., et al., *A combination of transcriptome and methylation analyses reveals embryologically-relevant candidate genes in MRKH patients*. Orphanet J Rare Dis, 2011. **6**: p. 32.
40. Sultan, C., A. Biason-Lauber, and P. Philibert, *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: recent clinical and genetic findings*. Gynecol Endocrinol, 2009. **25**(1): p. 8-11.

41. Oppelt, P., et al., *DNA sequence variations of the entire anti-Mullerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitanski-Kuster-Hauser syndrome*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 149-57.
42. Oppelt, P.B., S; Ludwig, KS; Wallwiener, D; Beckmann, MW. , *Vaginale und uterine Fehlbildungen-Teil 1*. Geb Fra., 2005: p. 65(10):R201-R220.
43. Burel, A., et al., *Role of HOXA7 to HOXA13 and PBX1 genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina)*. J Negat Results Biomed, 2006. **5**: p. 4.
44. van Lingen, B.L., et al., *Molecular genetic analysis of the PAX2 gene in patients with congenital absence of uterus and vagina (abstract)*. Fertil Steril, 1998: p. 70:S402.
45. van Lingen, B.L., et al., *Further evidence that the WT1 gene does not have a role in the development of the derivatives of the mullerian duct*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **179**(3 Pt 1): p. 597-603.
46. Klipstein, S., et al., *The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(3): p. 171-4.
47. Timmreck, L.S., et al., *Analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina*. Am J Med Genet A, 2003. **120A**(1): p. 72-6.
48. Biason-Lauber, A.K., D; Navratil, F; Schoenle, E.J., *A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman*. N Engl J Med, 2004: p. 351:792-798.
49. BIASON-LAUBER, A.D.F., G; KONRAD, D; SCARANO, G; NAZZARO, A; SCHOENLE, E.J., *WNT4 deficiency - a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky- Kuster-Hauser syndrome: a case report*. Hum Reprod, 2007: p. 22:224-229.
50. Vainio, S., et al., *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 405-9.
51. Du, H. and H.S. Taylor, *Molecular regulation of mullerian development by Hox genes*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1034**: p. 152-65.
52. Taylor, H.S., *Endocrine disruptors affect developmental programming of HOX gene expression*. Fertil Steril, 2008. **89**(2 Suppl): p. e57-8.
53. Taylor, H.S., G.B. Vanden Heuvel, and P. Igarashi, *A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes*. Biol Reprod, 1997. **57**(6): p. 1338-45.
54. Masse, J., et al., *The developing female genital tract: from genetics to epigenetics*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(2-3): p. 411-24.
55. Schulte, E., *Duale Reihe Anatomie. Weibliches Genitale*. Stuttgart. Georg Thieme Verlag, 2007: p. 796-812.
56. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage*. Stuttgart. Thieme Verlag, 2012: p. 527.
57. Gellersen, B. and J. Brosens, *Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair*. J Endocrinol, 2003. **178**(3): p. 357-72.
58. Bell, S.C., *The insulin-like growth factor binding proteins--the endometrium and decidua*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **622**: p. 120-37.
59. Maslar, I.A. and D.H. Riddick, *Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle*. Am J Obstet Gynecol, 1979. **135**(6): p. 751-4.

60. Daly, D.C., I.A. Maslar, and D.H. Riddick, *Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium*. Am J Obstet Gynecol, 1983. **145**(6): p. 672-8.
61. Findlay, J.K., L.A. Salamonsen, and R.A. Cherny, *Endometrial function: studies using isolated cells in vitro*. Oxf Rev Reprod Biol, 1990. **12**: p. 181-223.
62. Fluhr, H., et al., *Human chorionic gonadotropin inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 and prolactin in decidualized human endometrial stromal cells*. Fertil Steril, 2006. **86**(1): p. 236-8.
63. Fluhr, H., et al., *Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells*. Fertil Steril, 2008. **90**(4 Suppl): p. 1384-9.
64. Sarno, J.L., H.J. Kliman, and H.S. Taylor, *HOXA10, Pbx2, and Meis1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(1): p. 522-8.
65. Taylor, H.S., et al., *HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1379-84.
66. Li, H., S. Chen, and F. Xing, *[Expression of HOXA10 gene in human endometrium and its relationship with unexplained infertility]*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2002. **37**(1): p. 30-2.
67. Taylor, H.S., et al., *HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis*. Hum Reprod, 1999. **14**(5): p. 1328-31.
68. Lane, D.B., T.J. Rutherford, and H.S. Taylor, *HOXA10 expression in endometrial adenocarcinoma*. Tumour Biol, 2004. **25**(5-6): p. 264-9.
69. Kobayashi, A. and R.R. Behringer, *Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(12): p. 969-80.
70. Mansouri, A., K. Chowdhury, and P. Gruss, *Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 87-90.
71. Rall, K., et al., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome discordance in monozygotic twins: matrix metalloproteinase 14, low-density lipoprotein receptor-related protein 10, extracellular matrix, and neoangiogenesis genes identified as candidate genes in a tissue-specific mosaicism*. Fertil Steril, 2015. **103**(2): p. 494-502 e3.
72. Kornyei, J.L., et al., *Opioid peptides inhibit the action of oestradiol on human myometrial cells in culture*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(6): p. 565-72.
73. McCluggage, W.G., V.P. Sumathi, and P. Maxwell, *CD10 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of normal endometrial stroma and of endometrial stromal neoplasms*. Histopathology, 2001. **39**(3): p. 273-8.
74. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
75. Giudice, L.C. and J.C. Irwin, *Roles of the insulinlike growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual: trophoblast interface*. Semin Reprod Endocrinol, 1999. **17**(1): p. 13-21.
76. Fluhr, H., et al., *Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells*. Fertil Steril, 2010. **93**(8): p. 2581-7.
77. Gstraunthaler, G., *Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture*. ALTEX, 2003. **20**(4): p. 275-81.
78. Dunn, C.L., R.W. Kelly, and H.O. Critchley, *Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation*. Reprod Biomed Online, 2003. **7**(2): p. 151-61.

79. Gellersen, B., I.A. Brosens, and J.J. Brosens, *Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives*. Semin Reprod Med, 2007. **25**(6): p. 445-53.
80. von Wolff M, S.S., Lumpf K, Bucking J, Strowitzki T, Thaler CJ., *Endometrial interleukin-6 in vitro is not regulated directly by female steroid hormones, but by proinflammatory cytokines and hypoxia*. Mol Hum Reprod, 2002. **8**: p. 1096-102.
81. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11162-6.
82. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 358-417.
83. Weitlauf, H.M., *Biology of implantation*. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CI, Pfaff DW (eds) *The Physiology of Reproduction*, in Raven Press, New York. 1988. p. 231-262.
84. Lydon, J.P., et al., *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev, 1995. **9**(18): p. 2266-78.
85. Kaufman, R.H., et al., *Upper genital tract changes and pregnancy outcome in offspring exposed in utero to diethylstilbestrol*. Am J Obstet Gynecol, 1980. **137**(3): p. 299-308.
86. Schragar, S. and B.E. Potter, *Diethylstilbestrol exposure*. Am Fam Physician, 2004. **69**(10): p. 2395-400.
87. Jefferies, J.A., et al., *Structural anomalies of the cervix and vagina in women enrolled in the Diethylstilbestrol Adenosis (DESAD) Project*. Am J Obstet Gynecol, 1984. **148**(1): p. 59-66.
88. Kaufman, R.H., et al., *Upper genital tract changes associated with exposure in utero to diethylstilbestrol*. Am J Obstet Gynecol, 1977. **128**(1): p. 51-9.
89. Hoover, R.N., et al., *Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol*. N Engl J Med, 2011. **365**(14): p. 1304-14.
90. Gellersen, B. and J.J. Brosens, *Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure*. Endocr Rev, 2014. **35**(6): p. 851-905.
91. Franco, H.L., et al., *WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse*. FASEB J, 2011. **25**(4): p. 1176-87.
92. Lim, H., et al., *Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(6): p. 1005-17.
93. Gendron, R.L., et al., *Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice*. Biol Reprod, 1997. **56**(5): p. 1097-105.
94. Kitawaki, J., *Adenomyosis: the pathophysiology of an oestrogen-dependent disease*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006. **20**(4): p. 493-502.
95. Tosti, C., et al., *Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis*. Reprod Sci, 2015. **22**(9): p. 1053-9.
96. Han, S.J. and B.W. O'Malley, *The dynamics of nuclear receptors and nuclear receptor coregulators in the pathogenesis of endometriosis*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(4): p. 467-84.
97. Fujimoto, J., et al., *Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(8): p. 742-7.
98. Tsigkou, A., et al., *Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms*. Fertil Steril, 2015. **104**(1): p. 170-5 e1.

99. Nisolle, M., et al., *Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy*. Hum Reprod, 1999. **14**(11): p. 2844-50.
100. Brandon, D.D., et al., *Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**(1): p. 78-85.
101. Bulun, S.E., et al., *Role of aromatase in endometrial disease*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **79**(1-5): p. 19-25.
102. Zanatta, A., et al., *The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review*. J Assist Reprod Genet, 2010. **27**(12): p. 701-10.
103. Das, S.K., *Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10*. Mol Reprod Dev, 2010. **77**(5): p. 387-96.
104. Hardiman, P., O.C. Pillay, and W. Atiomo, *Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma*. Lancet, 2003. **361**(9371): p. 1810-2.
105. Dockerty, M.B., S.B. Lovelady, and G.T. Foust, Jr., *Carcinoma of the corpus uteri in young women*. Am J Obstet Gynecol, 1951. **61**(5): p. 966-81.
106. Classen-Linke, I., et al., *Marker molecules of human endometrial differentiation can be hormonally regulated under in-vitro conditions as in-vivo*. Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 539-49.
107. Jensen, E.V. and E.R. DeSombre, *Mechanism of action of the female sex hormones*. Annu Rev Biochem, 1972. **41**: p. 203-30.
108. Milgrom, E. and E.E. Baulieu, *Progesterone in uterus and plasma. I. Binding in rat uterus 105,000 g supernatant*. Endocrinology, 1970. **87**(2): p. 276-86.
109. Block, K., et al., *In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing mullerian system*. FASEB J, 2000. **14**(9): p. 1101-8.
110. Satokata, I., G. Benson, and R. Maas, *Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice*. Nature, 1995. **374**(6521): p. 460-3.
111. Rackow, B.W. and H.S. Taylor, *Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity*. Fertil Steril, 2010. **93**(6): p. 2027-34.
112. Fischer, C.P., U. Kayisili, and H.S. Taylor, *HOXA10 expression is decreased in endometrium of women with adenomyosis*. Fertil Steril, 2011. **95**(3): p. 1133-6.
113. Daftary, G.S. and H.S. Taylor, *Pleiotropic effects of Hoxa10 on the functional development of peri-implantation endometrium*. Mol Reprod Dev, 2004. **67**(1): p. 8-14.
114. Krumlauf, R., *Hox genes in vertebrate development*. Cell, 1994. **78**(2): p. 191-201.
115. Ekici, A.B., et al., *HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina*. Gene, 2013. **518**(2): p. 267-72.
116. Noyes RW, H.A., Rock J *Dating of the endometrial biopsy*. Fertil Steril, 1950. **1**(1): p. 3-5.
117. Yemelyanova, A., et al., *PAX8 expression in uterine adenocarcinomas and mesonephric proliferations*. Int J Gynecol Pathol, 2014. **33**(5): p. 492-9.
118. Mittag, J., et al., *Congenital hypothyroid female pax8-deficient mice are infertile despite thyroid hormone replacement therapy*. Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 719-25.
119. Mattei, M.G., et al., *Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively*. Genomics, 1996. **32**(1): p. 168-9.

Literaturverzeichnis

120. Raga, F., E.M. Casan, and F. Bonilla-Musoles, *Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the endometrium of septate uterus*. *Fertil Steril*, 2009. **92**(3): p. 1085-90.
121. Yamashita, S., et al., *Mechanisms of angiogenic suppression in uteri exposed to diethylstilbestrol neonatally in the mouse*. *Biol Reprod*, 2013. **88**(5): p. 116.

Materialliste

Materialliste Zellkultur

6-, 24-, 96-Well-Platte Gewebekultur	Cellstar, greiner-bio-one, Frickenhausen, D
Alexa Fluor 594 Goat Anti-mouse IgG	Invitrogen, USA
Antibiotic-Antimycotic, 100 ml (10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B)	Gibco, life technologies Darmstadt, D
Antibody Diluent, 250 ml, S2022	DAKO, Glostrup, DK
Chamber Slides, Lab-tek II, 8 Kammern, Glas, steril	Fisher scientific, nunc, NY, USA
Clear Microplate (Platten für ELISA), DY990	R+D Systems, Wiesbaden, D
Collagenase Typ IV (CLS IV), C4-22	Biochrom, Berlin, D
Collagenase Typ XI, 100 mg, C7657	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Combitips Ritips unsteril, 5 ml, 12,5 ml (Kombipipettenspitze für ELISA)	Eppendorf, Hamburg, D
Deckgläser Orig. Menzel, 22 mm x 22 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Desi Descosept AF, 1000 ml	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen, D
Desoxyribonuclease 1 (DNase), D4263-5VL	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dulbeccos modified Eagle serum: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), 500 ml	Gibco, life technologies Darmstadt, D
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS) steril (ohne Calcium und Magnesium), 500 ml, D8537	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fetal Bovine serum (FCS) 500 ml	Gibco, life technologies Darmstadt, D
Fetal Bovine serum (FCS) charcoal stripped,	Gibco, life technologies

Materialliste

500 ml	Darmstadt, D
Gentamycin, 10 mg/ml, A2712	Biochrom, Berlin, D
Handschuhe Untersuchung unsteril S, Peha soft nitrile, white	Hartmann, Heidenheim, D
Hank's Balanced salt Solution (HBSS), 500 ml, H 8264	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hormonstammlösung Beta-Estradiol (17 β -E ₂), (E8875)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hormonstammlösung Progesteron, (P0130)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Human IGFBP-1 DuoSet (ELISA), DY871	R+D Systems, Wiesbaden, D
Human Prolactin DuoSet (ELISA), DY682	R+D Systems, Wiesbaden, D
Hyclone FBS Charocal / Dextran treated, SH30068.02	Thermo Scientific, Utah, USA
Kryoröhrchen, steril, 2 ml	greiner-bio-one, Frickenhausen, D
Monoclonal Anti-Collagen Type 1, 0,2 ml, C2456	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD10, Clone 56C6; 0,2 ml, M7308	DAKO, Glostrup, DK
Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor, Clone 1D5, 0,2 ml, M7047	DAKO, Glostrup, DK
Monoclonal Mouse Anti-Human Pancytokeratin Receptor (C-11) (FITC), 0,1 ml, GTX11212	GeneTex, CA, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636, 0,2 ml, M3569	DAKO, Glostrup, DK
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Receptor, Clone 1A4; 0,2 ml, M0851	DAKO, Glostrup, DK
Normal Goat serum (für ELISA), DY005	R+D Systems, Wiesbaden, D
Objektträger 76 mm x 26 mm x 1 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, D

Materialliste

Objektträgermappe, ohne Verschluss für 20 Objektträger	VWR International GmbH, Bruchsal, D
Parafilm „M“ Laboratory Film, 4IN. X 125 FT	Bemis, Meckenheim b. Bonn, D
Petrischale steril, 16 x 94 mm	greiner-bio-one, Frickenhausen ,D
Pipette graduiert mit Spitze steril, 5 ml, 10 ml, Costar	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Pipettenspitze „blau“, 101-1000 µl; „gelb“, 1-200 µl; „farblos“ 1-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reagenz Diluent, DY995 (für ELISA mit Prolaktin)	R+D Systems, Wiesbaden, D
Reaktionsgefäße safe-Lock, 1,5 ml	greiner-bio-one, Frickenhausen, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 2N, DY994, (Stop Solution für ELISA mit IGFBP-1 und Prolaktin)	R+D Systems, Wiesbaden, D
Skalpell Feather, Figur 21, 02.001.30.021	pfm medical, Osaca, J
Substrat Solution, DY999 (für ELISA mit IGFBP-1 und Prolaktin)	R+D Systems, Wiesbaden, D
Trypan Blau, 15250-061	Gibco, life technologies Darmstadt, D
Trypsin-EDTA, 0,05 %, 100 ml, 25300-054	Gibco, life technologies Darmstadt, D
Tween 20, 100 ml, 170-6531	Bio-Rad, CA, USA
Vectashield (Dapi-Färbung), 10 ml, 1,5 µg/ml, H-1200	Vector Laboratories, Burlingame, UK
Zählkammer Neubauer improved, Tiefe 0,1 mm, 441/72	Hecht Assistent, Sondheim/Rhön, D
Zellkulturflasche, rote Kappe mit Filter, steril, 75 cm ² , 250 ml; 25 cm ² , 50 ml;	Cellstar, greiner-bio-one, Frickenhausen, D
Zell-Sieb steril blau, 40 µm	Falcon, NY, USA

Materialliste

Zelllinien

MCF-7 Zellen	Brustkrebszelllinie human ER-, PGR-positiv,
MDA-MB-231 Zellen	Brustkrebszelllinie human ER-, PGR-negativ,

Materialliste Pathologie

Adhäsions-Glasobjektträger SuperFrost, 75 mm x 25 mm x 1 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
Antibodydiluent, ZUC 025-500	Zytomed Systems, Berlin, D
CD31, monoclonal mouse (clone JC70A), M0823	DAKO, Glostrup, DK
Cell Condition Solution 1 (CC1), 950-124	Ventana Medical Systems, Roche, D
Cytoseal XYL	Thermo Scientific, Utah, USA
DAB Substrate Kit, DAB 530	Zytomed Systems, Berlin, D
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), EDS-500g	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Eosin, 15935	Merck, Darmstadt, D
Goat HRP Polymer Kit, GHP516G	Zytomed Systems, Berlin, D
Hämatoxylin, 15938	Merck, Darmstadt, D
HOXA10 (A-20), 200µg, sc-17159	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
iView-DAB Detection-Kit, 760-091	Roche, D
Natriumhydroxid (NaOH), 1.06469.1000	Merck, Darmstadt, D
Objektträgermappe, ohne Verschluss für 20 Objektträger	VWR International GmbH, Bruchsal, D
Papanicolaou-Lösung, 1.09253.2500	Merck, Darmstadt, D
PAX8, polyclonal rabbit, 363A-15	Cell Marque, CA, USA
Tri-Na-Citrat Dihydrat, 1.06580.1000	Merck, Darmstadt, D

Materialliste

Tris-base, T1503-1kg	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Waschpuffer, ZUC 020500	Zytomed Systems, Berlin, D
Wasserstoffperoxid (30 %), 1.07210.1000	Merck, Darmstadt, D

Geräteliste

CO2-Inkubator	Binder, Tuttlingen, D
Durchlichtmikroskop Nikon Eclipse E200	Nikon, D
ELISA – microplate reader „Sunrise“	Tecan, AT
ELISA – plate washer „columbus plus“, F109204	Tecan, AT
Eppendorfszentrifuge 5415c	Eppendorf, Hamburg, D
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop Axioplan 2 imaging	Zeiss, Oberkochen, D
Gefrierschrank -80 °C, HFU 486 Basic	Kendro, Osterode, D
Inverses Lichtmikroskop Olympus CK30-F200, CK30-5200	Olympus, JP
Kühl- / Gefrierkombination 8 °C / -20 °C, KGE3417	Bosch, Stuttgart, D
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette „Pipetman“ P1000, 200-1000 µl P200, 50-200 µl P100, 20-100 µl P20, 2-20 µl P10, 1-10 µl P2, 0,2-2 µl	Gilson, WI, USA
Pipettierhilfe „pipetus“ mit Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Sicherheitswerkbank (Sterilbank) Typ HS12	Kendro, Osterode, D

Materialliste

Vortexmischer, MS 2 Minishacker	IKA, Staufen, D
Ventana BenchMark XT	Roche, D
Wasserbad, Typ 1013	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge, „Multifuge 3S-R“	Kendro, Osterode, D

Computerprogramme

AxioVision software release 4.8.2 (Carl Zeiss Mikroskopie, D)	Immunhistochemie und Digitale Photographie
Excel (2007)	Auswertung/ Diagramme
Plate Reader, Sunrise Tecan (2009)	Magellan 6
SPSS Statistics Version 21	Statistik
Windows (2007)	Betriebssystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Enzymlösungen 1 und 2 für die Ansetzung einer Mischkultur. 27

Tabelle 2: Verwendete Kulturgefäße mit Flächenangabe und der benötigten Volumenmenge zur vollständigen Bedeckung..... 28

Tabelle 3: 1. AK-Verdünnungen bei immunhistochemischer Färbung..... 35

Tabelle 4: Pipettierschema der Verdünnungsreihe für ELISA-Messungen..... 39

Tabelle 5 a-d: Bewertung und Berechnung der Einteilung Antikörper-gefärbter Gewebeschnitte nach dem immunreaktiven Score (IRS). 45

Tabelle 6: Übersicht über kultiviertes Gewebe. 47

Tabelle 7: Alter und Nebendiagnosen der Kontrollpatientinnen..... 55

Tabelle 8: Alter, Nebendiagnosen und Hormonwerte der MRKH-Patientinnen. 55

Tabelle 9: Prolaktinkonzentrationen der un- und stimulierten MRKH-Proben an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml. 56

Tabelle 10: Differenz der gemittelten Prolaktinkonzentrationen zwischen un- und stimulierten MRKH-Proben, bzw. gemittelte Konzentrationen bei rechten und linken Rudiment einer Patientin an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml..... 58

Tabelle 11: Differenz der gemittelten Prolaktinkonzentrationen zwischen un- und stimulierten Kontrollgewebe, an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml. 58

Tabelle 12: Differenz der gemittelten IGFBP-1-Konzentrationen zwischen un- und stimulierten MRKH-Proben, bzw. gemittelte Konzentrationen bei rechten und linken Rudiment einer Patientin an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml..... 60

Tabelle 13: Differenz der gemittelten IGFBP-1-Konzentrationen zwischen un- und stimulierten Kontrollgewebe, an den Tagen 0, 3, 6 und 9 in pg/ml. 60

Tabelle 14 a, b: 14 a: Prolaktinwerte an d 9 (pg/ml), MRKH-Typ, Nebendiagnosen , Hormonwerte der MRKH-Patientinnen und Ergebnisse der immunhistochemischen Hormonrezeptorfärbungen der Rudimente (positiv (pos.)/negativ (neg.)). 14 b: Korrelation von Prolaktinwerten an d 9 (pg/ml) und Endometrium-Histologie anhand von HE-Schnitten der Uterusrudimente. 65

Tabelle 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Hormonrezeptorfärbungen für E₂ (ESR1) und Prog (PGR) an den Kontrollgeweben K 61, 63 und 65 in verschiedenen Passagen. 67

Tabelle 16: Ergebnisse der immunhistochemischen Hormonrezeptorfärbungen für E₂ (ESR1) und Prog (PGR) an den Kontrollgeweben K 63 und K 65 in Passage 5, nach 4. Dezidualisierung bzw. unbehandelt. 67

Tabelle 17: Proliferationsversuche durch hormonelle Stimulation an Myometrium-Reinkulturen aus MRKH- und Kontrollgewebe; Zellen pro Well (2 cm²) an d 0, d 3, d 6 und d 9. 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 18: Proliferationsversuche durch hormonelle Stimulation an Myometrium-Mischkulturen aus MRKH- und Kontrollgewebe; Zellen pro Well (2 cm ²) an d 0, d 3, d 6 und d 9.	70
Tabelle 19: Nach dem IR-Score ermittelte Werte der immunhistochemisch auf HOXA10 gefärbten Gewebeschnitte von MRKH- und Kontrollpatientinnen.....	72
Tabelle 20: Hysterektomierte Kontrollpatientinnen mit am Uteruspräparat diagnostizierten Nebendiagnosen.	74
Tabelle 21: Nach dem IR-Score ermittelte Werte der immunhistochemisch auf Pax8 gefärbten Gewebeschnitte von MRKH- und Kontrollpatientinnen.....	76
Tabelle 22: Mikroskopisch pro Gesichtsfeld in 400facher Vergrößerung ausgezählte Gefäßanschnitte der immunhistochemisch auf CD31 gefärbten Gewebeschnitte von MRKH- und Kontrollpatientinnen.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Verhältnisse, beim MRKH-Syndrom; Die gepunktete Linie zeigt die normale Lage von Vagina und Uterus.	12
Abbildung 2 a - c (von links nach rechts): Abb. 2 a: keine Uterusleiste angelegt, keine Uterusrudimente; Abb. 2 b: angedeutete Uterusleiste, beidseits angelegte, kleine Uterusknospen (s. Pfeile); Abb. 2 c: zwei große Uterusknospen (s. Pfeile), mit deutlichem Größenunterschied.....	15
Abbildung 3: Makroskopie eines eröffneten Uterusrudimentes mit einer mit Endometrium ausgekleideten Gangstruktur (Quelle: Laboraufnahme).....	21
Abbildung 4: Uterusrudiment mit Myometrium, deutlicher Gangstruktur und Endometrium, HE-Färbung, in 50-facher Vergrößerung aufgenommen [28]. ...	21
Abbildung 5: Beispielschema einer Zellproliferation: von den an d 0 ausplattierten Zellen werden an d 3, d 6, d 9 und d 12 je zwei Wells mit unbehandelten und zwei Wells mit hormonell behandelten Zellen abtrypsiniert und ausgezählt.	42
Abbildung 6 a-c: Immunhistochemische Färbungen der Mischkultur aus Myometrium: K69 P1. 6 a: Aktin, 6 b: CT1 und 6 c: Prog; jeweils mit DAPI-Färbung; in 100facher Vergrößerung aufgenommen.....	48
Abbildung 7 a, b: Beim Lamellieren eines Uterusrudiments stellt sich eine Gangstruktur mit deutlicher Endometriumschicht dar (s. Beschriftung) (Quelle: Laboraufnahme)	49
Abbildung 8 a, b: 8 a: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (M 26) (aus MRKH-Gewebe) mit Prog (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; 8 b: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (M 26) (aus MRKH-Gewebe) mit E ₂ (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	50
Abbildung 9 a-c: Immunhistochemische Färbungen glatter Muskelzellen mit Aktin (1. AK), zeigt 1-fach, 2-fach und 3-fach positiv, rot fluoreszierende Ergebnisse (von links nach rechts); in 200facher Vergrößerung aufgenommen; jeweils mit DAPI-Färbung.	51
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (K 44) (aus gesundem Kontrollgewebe) mit CD10 (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	52
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (K 35) (gesundes Kontrollgewebe) mit pCK (1. AK): 2-fach positives, grün fluoreszierendes Ergebnis;	52
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 69) (gesundes Kontrollgewebe) mit Aktin (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	52
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 69) (gesundes Kontrollgewebe) mit CT1 (1. AK): 1-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (M 25) (MRKH-Gewebe) mit E ₂ (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	53
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung einer Endometriumkultur (K 69) (gesundes Kontrollgewebe) mit Prog (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	53
Abbildung 16 a, b: 16 a: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 67) (gesundes Kontrollgewebe) mit CT1 (1. AK) 1:500 verdünnt: 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; 16 b: Immunhistochemische Färbung einer Myometrium-Mischkultur (K 69) (gesundes Kontrollgewebe) mit CT1 (1. AK) 1:1000 verdünnt: 1-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	53
Abbildung 17 a, b: 17 a: Immunhistochemische Färbung einer Kultur von MCF-7-Zellen mit E ₂ (1. AK): 3-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis; Abb. 17 b: Immunhistochemische Färbung einer Kultur von MCF-7-Zellen mit Prog (1. AK): 2-fach positives, rot fluoreszierendes Ergebnis;	54
Abbildung 18: Vergleich der Mittelwerte (MW) der Prolaktinsekretion (pg/ml) zwischen MRKH- und Kontroll-Endometrium von Tag 0 bis 9 mit Angabe des Standardfehlers.	59
Abbildung 19: Mittelwerte der IGFBP-1-Konzentrationen der MRKH-Dezidualisierungen, in pg/ml von Tag 0 bis 9.	61
Abbildung 20: Vergleich der IGFBP-1-Sekretion (pg/ml) zwischen MRKH- und Kontroll-Endometrium von Tag 0 bis 9 mit Angabe des Standardfehlers.	62
Abbildung 21: Vergleich der MRKH-Rudimente untereinander, ausgewertet nach dem Verlauf der Prolaktin-Konzentration (pg/ml) von Tag 0 bis 9.....	63
Abbildung 22: Vergleich einzelner MRKH-Rudimente mit einer repräsentativen Kontrolle (K 50), ausgewertet nach dem Verlauf der Prolaktin-Konzentration (pg/ml) von Tag 0 bis 9.....	64
Abbildung 23 a,b: Myometriumkultur K 58 P1, links (Abb. 24 a) unbehandelt, rechts (Abb. 24 b) hormonell stimuliert. Die Pfeile markieren jeweils eine Länge von 0,25 mm in der Neubauer-Zählkammer.	71
Abbildung 24 a,b: Myometriumkultur M 19 P1, links (Abb. 24 a) unbehandelt, rechts (Abb. 24 b) hormonell stimuliert. Die Pfeile markieren jeweils eine Länge von 0,25 mm in der Neubauer-Zählkammer.	71
Abbildung 25 a-f: Beispiele von Photographien der HOXA10-Gewebeschnitte, einer Kontroll- (K/13/6976) und MRKH-Probe (K/10/23100) aufgenommen mit einem Durchlichtmikroskop mit 200facher Vergrößerung.	72
Abbildung 26 a-e: Beispiele von Photographien der Pax8-Gewebeschnitte, einer Kontroll- (K/10/13091), einer MRKH- (K/10/23795) und einer 2. MRKH-Probe (K/09/19806) aufgenommen mit einem Durchlichtmikroskop mit 200facher Vergrößerung.	75
Abbildung 27 a-d: Beispiele von Photographien der CD31-Gewebeschnitte, einer Kontroll- (K/10/11238) und MRKH-Probe (K/10/15284) aufgenommen mit einem Durchlichtmikroskop mit 400facher Vergrößerung.....	78

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen unter Betreuung von Frau Professor Dr. Sara Brucker durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Privatdozentin Dr. Katharina Rall, Frau Dr. Simone Eisenbeis, Herrn Professor Dr. Harald Seeger (Immunzytologie) und Frau Privatdozentin Dr. Annette Stäbler (Pathologie).

Die Versuche an Zellkulturen wurden unter Zuarbeit von einer MTA, Frau Sabine Hofmeister, von mir eigenständig durchgeführt.

Für die HOXA10-, Pax8-, CD31-Studie wurde das Patientenkollektiv von mir eigenständig erstellt. Die Gewebeproben wurden vom Institut für Pathologie Tübingen zur Verfügung gestellt. Die immunhistochemische Färbung der histologischen Schnitte wurde von Frau Karen Greif durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung wurde unter Supervision von Frau Privatdozentin Dr. Annette Stäbler von mir eigenständig durchgeführt.

Alle im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Fotografien wurden von mir eigenständig angefertigt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Privatdozentin Dr. Birgitt Schönfisch durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ort, Datum

Juliana König

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Brucker SY, Eisenbeis S, König J, Lamy M, Salker MS, Zeng N, Seeger H, Henes M, Schöller D, Schönfisch B, Staebler A, Taran FA, Wallwiener D, Rall K.

Decidualization is Impaired in Endometrial Stromal Cells from Uterine Rudiments in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. Cell Physiol Biochem. 2017;41:1083-1097

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Diethelm Wallwiener für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau Professor Dr. Sara Brucker und Frau Privatdozentin Dr. Katharina Rall für ihre hervorragende, herzliche Betreuung und Zusammenarbeit, welche die Entstehung dieser Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

Herrn Professor Dr. Harald Seeger möchte ich für seine sachkundige, fachliche Hilfe und Begleitung durch die gesamten Entstehungsphase dieser Dissertation bedanken.

Frau Privatdozentin Dr. Annette Stähler danke ich sowohl für ihre Hilfe bei der Gewebeentnahme, als auch für ihre kompetente und wissenschaftliche Unterstützung.

Bei Frau Privatdozentin Dr. Birgitt Schönfisch bedanke ich mich für Ihre fundierte Beratung und Hilfe bei der statistischen Ausarbeitung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Simone Eisenbeis für ihre stetige intensive und sehr zuverlässige Betreuung, sowie für ihre freundliche und motivierende Art.

Frau Dr. Verena Henninger danke ich für ihre freundliche Hilfe bei den „ersten Schritten“ auf dem für mich neuen Gebiet.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Lisa Lange für ihre sachkundige Hilfe bei der Einarbeitung mit Zellkulturen und für ihre Freundschaft.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau Sabine Hofmeister für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken, die freundschaftliche Zusammenarbeit und für ihre fürsorgliche Unterstützung.

Vor allem aber bedanke ich mich bei meinem Partner, meinen Eltern, meiner Schwester, meiner Großmutter und meinen Freunden die mich stets liebevoll unterstützt haben.