

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel -

**Rolle der mikroRNA miR-142-3p bei der Pathogenese der Endometriose**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinische Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von Ludwig, Denise  
aus Münster, Deutschland

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof.Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Martin Götte

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster; Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

Referent: Priv.-Doz. Dr. Martin Götte

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

## **Zusammenfassung**

### **Rolle der mikroRNA miR-142-3p bei der Pathogenese der Endometriose**

Denise Ludwig

Das humane Endometrium unterliegt einem sich regelmäßig wiederholenden Menstruationszyklus, der durch Proliferation und Zelldifferenzierung, Desquamation und Regeneration gekennzeichnet ist. Die Endometriose beschreibt eine Krankheit, bei der sich Gebärmutterschleimhaut absiedelt und an ektopen Orten ansammelt. Aktuelle Forschungsergebnisse diskutieren die Beteiligung von mikroRNAs an der Pathogenese der Endometriose. MikroRNAs sind kleine, nichtkodierende RNAs, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Die vorliegende Promotionsarbeit gibt einen Überblick über den aktuellen Stand der Wissenschaft bezüglich der Beteiligung von mikroRNAs an der Pathogenese der Endometriose und erläutert konkret den Einfluss der mikroRNA miR-142-3p und ihrer potentiellen Zielgene auf die Pathogenese der Endometriose, der mithilfe funktioneller experimenteller Analysemethoden untersucht wurde. Dabei wurde die humane immortalisierte Endometriosezelllinie 12Z mit der miR-142-3p transfiziert und auf diesem Wege in den Zellen überexprimiert. Daraufhin wurden verschiedene Gen- und Proteinexpressionsanalysen je im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen durchgeführt, außerdem wurde das Invasions- und Proliferationsverhalten der Zellen analysiert. Es konnte eine signifikante Steigerung der Invasivität der 12Z-Zellen durch die Transfektion mit miR-142-3p gezeigt werden. Mithilfe einer qPCR konnte der regulatorische Einfluss der miR-142-3p auf verschiedene Zellmotilitäts-assoziierte Zielgene nachgewiesen werden. In der Videomikroskopie-Analyse zeigte sich, dass die mit miR-142-3p transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen sowohl eine erhöhte Geschwindigkeit aufwiesen, als auch eine weitere Strecke in der gleichen Zeit zurücklegten. Die im Folgenden beschriebenen Daten der vorliegenden Studie belegen die bislang unbekannt Rolle der mikroRNA mir-142-3p bei der Pathogenese der Endometriose.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2014

## **ERKLÄRUNG**

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Rolle der mikroRNA miR-142-3p bei der Pathogenese der Endometriose“

in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,  
unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Martin Götte:

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeines.....	1
1.2	Anatomie.....	2
1.2.1	Aufbau des Uterus.....	2
1.3	Endometriose.....	3
1.3.1	Epidemiologie.....	3
1.3.2	Ätiologie und Pathogenese.....	4
1.3.3	Symptome.....	7
1.3.4	Lokalisation.....	8
1.3.5	Pathologie.....	10
1.3.6	Stadieneinteilung.....	11
1.3.7	Diagnostik.....	11
1.3.8	Therapie.....	12
1.4	MikroRNAs.....	14
1.4.1	Allgemeines.....	14
1.4.2	Entdeckungsgeschichte der miRNAs.....	14
1.4.3	Biosynthese der miRNAs.....	15

1.4.4	Methodik der Analyse von miRNAs .....	15
1.4.5	MikroRNAs und ihre Rolle bei Pathogeneseprozessen .....	16
1.4.6	miR-142-3p.....	17
1.5	Fragestellung .....	18
2	Material und Methoden .....	20
2.1	Zellkultur.....	20
2.1.1	Zelllinie .....	20
2.1.2	Medien.....	21
2.2	Transfektion .....	21
2.3	Proliferationsassay / Zellviabilitätsassay .....	22
2.4	Invasionsassay.....	23
2.5	Videomikroskopie .....	25
2.6	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	26
2.7	PCR.....	27
2.7.1	Quantitative Mikro Real-Time-PCR.....	27
2.7.1.1	RNA-Präparation.....	28
2.7.1.2	Umschreiben der miRNA in cDNA .....	29
2.7.1.3	Real Time PCR .....	30
2.7.2	Quantitative Real-Time PCR .....	30

2.7.2.1	RNA-Extraktion .....	30
2.7.2.2	Reverse Transkription der mRNA in cDNA .....	31
2.7.2.3	Durchführung der Real Time PCR .....	32
2.8	Western Blot.....	33
2.8.1	Proteinlyse und –quantifizierung.....	33
2.8.2	SDS-PAGE Elektrophorese .....	34
2.8.3	Blotten .....	36
2.8.4	Entwicklung der Membran .....	37
2.8.5	Strippen der Membran .....	38
2.9	Statistik.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Nachweis der miRNA-Überexpression .....	39
3.2	Auswirkungen der Transfektion von miR-142-3p auf das Zellverhalten von 12Z-Endometriosezellen .....	41
3.2.1	Zellviabilität.....	42
3.2.2	Invasivität.....	43
3.2.3	Videomikroskopie .....	46
3.3	Untersuchung der Zielgene (mRNA-PCRs).....	49
3.4	Western Blot.....	53
3.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	54



4	Diskussion .....	57
4.1	Studien zur miR-142-3p .....	57
4.1.1	Diagnostischer und therapeutischer Ausblick .....	62
4.2	Kritische Beurteilung des Studienaufbaus.....	63
4.3	Fazit .....	65
5	Literaturverzeichnis.....	67

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy desoxyribonucleid acid
Ct	Cycle threshold
Ctrl.	Kontrolle
ddH <sub>2</sub> O	double distilled water / doppelt destilliertes Wasser
DNA / DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Δ	Delta
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii/und andere
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FKS	fötales Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
ggf.	gegebenenfalls
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
LH	luteinisierendes Hormon
Lig. / Ligg.	Ligamentum/ Ligamenta
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger ribonucleid acid

miRNA	micro ribonucleid acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n	Stichprobenmenge
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaVO <sub>3</sub>	Natriumvanadat
nt	Nukleotidsequenzlänge der Aminosäuren
O <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub>	Sauerstoff/Kohlenstoffdioxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pondus / potentia Hydrogenii
pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primary microRNA
qPCR	quantitative Real Time PCR
rAFS	American Society of Reproductive Medicine
RNA / RNS	Ribonukleinsäure
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
®	Copyright
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SI	Structural Index
siRNA	small interfering RNA
SNP	single-nucleotid-polymorphism
Taq	Thermus aquaticus
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
™	Unregistered Trade Mark

u.a.	unter anderem
v.	von
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## Maßeinheiten

l	Liter
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
kg	Kilogramm
g	Gramm
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
ng	Nanogramm
m	Meter
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
h	Stunde
min	Minute
sek	Sekunde
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
M	Molar
mM	Millimolar
$\mu$ M	Mikromolar
mA	Milliampere
V	Volt
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
rpm	revolutions per minute
Vol.	Volumen
%	Prozent

# **1 Einleitung**

## **1.1 Allgemeines**

Die Endometriose ist eine häufige hormonabhängige Erkrankung der geschlechtsreifen Frau, die durch eine Verschleppung der Gebärmutterschleimhaut (=Endometrium) gekennzeichnet ist (Kiechle, M., 2011). Das Endometrium ist ein sehr dynamisches Gewebe, welches durch hormonelle Steuerung zyklische Veränderungen erfährt. Es ist in 2 Schichten gegliedert: Das Stratum functionale wird im Rahmen der Menstruation abgestoßen und regeneriert sich dann aus dem darunter liegenden Stratum basale (Ulfig, N., 2011). So unterliegt das Endometrium einer steten Veränderung von Wachstum und Differenzierung.

MikroRNAs sind kleine, nichtkodierende RNAs, die die Genexpression regulieren. Wir haben noch nicht sehr lange Kenntnis über ihre Existenz, jedoch gibt es heute diverse Hinweise auf ihre Beteiligung an der Pathogenese verschiedener Krankheitsprozesse im menschlichen Körper. So wurde auch ihr Mitwirken an der Entstehung der Endometriose bereits mehrfach nachgewiesen (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2009).

Die miR-142-3p ist eine bislang recht unerforschte mikroRNA, doch auch ihre Beteiligung an der Entstehung von verschiedenen Krankheiten wurde nachgewiesen. Ob sie an der Pathogenese der Endometriose beteiligt ist, ist bislang ungewiss. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Schließung dieser Forschungslücke.

In meiner Dissertation werde ich zunächst das Krankheitsbild der Endometriose näher erläutern, dann aktuelle Diskussionen vorstellen, die die Beteiligung von mikroRNAs, insbesondere der miR-142-3p, an verschiedenen Krankheitsbildern erläutern. Schließlich werde ich meine Forschungsergebnisse vorstellen und diskutieren.

## **1.2 Anatomie**

### **1.2.1 Aufbau des Uterus**

Der Uterus (= Gebärmutter) ist ein birnenförmiges, muskelstarkes Hohlorgan von 7-9 cm Länge und wiegt 80-120 g bei der erwachsenen Frau. Die oberen zwei Drittel bilden den Körper, Corpus uteri, das untere Drittel bezeichnet man als Gebärmutterhals, Cervix uteri. Dazwischen befindet sich der ca. 0,5-1cm breite Isthmus uteri. Über den Tubenmündungen befindet sich der Fundus, der oberste Teil des Corpus. Die Tuben münden in die oberen Ecken eines Dreiecks innerhalb des Corpus, das als Cavum uteri beschrieben ist. Die Cervix ist untergliedert in die Portio supravaginalis und die Portio vaginalis, die in die Vagina hineinragt. Innerhalb der Cervix beschreibt man den Canalis cervix mit dem Ostium uteri internum (Mündung in Cavum uteri) und dem ostium uteri externum (Mündung in die Portio vaginalis cervicis). Der Begriff Anteversio uteri beschreibt den stumpfen, nach vorn offenen Winkel, der von den Längsachsen von Uterus und Vagina gebildet wird. Der Corpus ist gegenüber der Cervix ebenfalls abgeknickt, was man als Anteflexio uteri bezeichnet.

Der Uterus ist aus drei Schichten aufgebaut. Von innen nach außen lassen sich folgende Schichten unterscheiden:

- 1) Endometrium (=Tunica mucosa)
- 2) Myometrium (=Tunica muscularis)
- 3) Perimetrium (=Tunica serosa)

Das Endometrium, also die Gebärmutter Schleimhaut, besteht histologisch aus einschichtig hochprismatischem Zylinderepithel, das z.T. mit Zilien versehen ist. Das Drüsengewebe ist aufgebaut aus zwei Schichten, dem tief liegenden Stratum basale und dem darüber liegenden Stratum functionale, das zyklischen Veränderungen unterliegt und im Rahmen der Menstruation abgestoßen wird.

Die dickste Schicht des Uterus ist das Myometrium, also die Muskelschicht. Das Myometrium besteht aus glatter Muskulatur, die schichtweise unterschiedlich angeordnet ist.

Das Perimetrium bezeichnet das Peritoneum, welches den Uterus an der Vorder- und Hinterwand umgibt.

Seitlich ist der Uterus von Bindegewebslagen umgeben, die vor allem im Bereich der Zervix stärker ausgeprägt sind. Diese Bindegewebslagen bezeichnet man als Parametrium. Es enthält die Gefäße und Nerven, die den Uterus versorgen.

(Kiechle, M., 2011), (Schiebler, TH. et al., 2002)

### **1.3 Endometriose**

Die Endometriose ist definiert als eine benigne, hormonabhängige Erkrankung der geschlechtsreifen Frau, die durch eine ektope (=außerhalb des Cavum uteri) Ansammlung von endometrialem Drüsengewebe und Stroma gekennzeichnet ist (Kiechle, M., 2011). Sie ist assoziiert mit verschiedenen Symptomen wie zyklusabhängigen Unterleibschmerzen, Dysmenorrhö, Dyspareunie und Sterilität, kann jedoch auch asymptomatisch verlaufen und somit als Zufallsbefund diagnostiziert werden.

#### **1.3.1 Epidemiologie**

Die Endometriose ist eine häufige Erkrankung. Aussagen zur Häufigkeit sind jedoch nur eingeschränkt möglich, da die endgültige Diagnosestellung in der Regel laparoskopisch bzw. im Rahmen einer Laparotomie erfolgt (Stauber, M. et al., 2005) und man somit zunehmend die Erkrankung inzidentell diagnostiziert, auch wenn die Laparoskopie aufgrund von einer anderen Indikation durchgeführt wurde. Schätzungen zufolge sind 6-10% aller Frauen an Endometriose erkrankt, wenn man jedoch Frauen mit Unterbauchschmerzen oder unerfülltem Kinderwunsch betrachtet, leiden sogar 35-50% an



Endometriose (Giudice, LC., 2004). Dies wird auch dadurch begründet, dass in dieser Gruppe mehr Laparoskopien durchgeführt werden (Kiechle, M., 2011). Das typische Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose beträgt 20-40 Jahre (Stauber, M. et al., 2005).

**Tabelle 1: Endometriosehäufigkeit (Stauber, M. et al., 2005)**

Bei gynäkologischen Laparotomien	1-50%
Bei gynäkologischen Laparoskopien	5-53%
Bei Infertilität	15-24%
Bei Sterilität unbekannter Ursache	40-70%
Bei laparoskopischer Tubensterilisation	2-10%

### **1.3.2 Ätiologie und Pathogenese**

Die wissenschaftliche Erstbeschreibung erfolgte 1860 von v. Rokitansky, jedoch gibt es bis heute keinen eindeutigen Konsens über die Entstehung der Endometriose (Von Rokitansky, C., 1860). Es herrschen verschiedene Theorien vor, die am häufigsten anerkannte ist die Transplantationstheorie. Eindeutig jedoch ist, dass diese Erkrankung hormonabhängig ist, was durch die Tatsache belegt wird, dass die Endometriose durch Östrogene gefördert wird, was sich in fortschreitendem und rezidivierendem Wachstum äußert, durch Gestagene jedoch gehemmt wird (Kiechle, M., 2011). Die Hormonabhängigkeit ergibt einen Therapieansatz. Auch bei gesunden Frauen kommt es zu einer Verschleppung der Gebärmutter Schleimhaut, es handelt sich jedoch bei diesen Frauen um die Funktionalis, während bei Frauen, die an Endometriose erkrankt sind, durch die Hyperperistaltik des Uterus v.a. die Basalis verschleppt wird, die eine höhere Implantationstendenz hat.

Im Folgenden werden die verschiedenen Entstehungstheorien erläutert.

### 1. Transplantationstheorie

Hintergrund dieser Theorie ist, dass es bei bis zu 90% aller Frauen während der Menstruation zu einer retrograden Blutung (Verschleppung von abgestoßenem Endometrium über die Tubae uterinae in die Bauchhöhle (Haag, P. et al., 2010/11)) kommt, sich dieses Gewebe jedoch nur bei den Endometriose-Patientinnen implantiert (Kiechle, M., 2011). Begründet wird dies durch die bereits erläuterte Annahme, dass die Basalis eine größere Tendenz zeigt, sich festzusetzen als die Funktionalis. Belegt wird diese Theorie durch die Feststellung, dass Frauen mit länger andauernden und stärkeren Monatsblutungen eher an Endometriose erkranken als Frauen, die eine schwächere und kürzere Blutung haben (Stauber, M. et al., 2005). Außerdem scheint bei Endometriosepatientinnen der intrauterine Druck im Vergleich zu den gesunden Frauen erhöht zu sein, und es wird eine uterine Hyperperistaltik bei ihnen beschrieben. Diese beiden Faktoren begünstigen eine retrograde Menstruation. Die Implantation des Endometriums und dessen Wachstum wird durch Östrogene und Gestagene beeinflusst (Olive, DL., 2008). Östrogen weist eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum des Endometriums auf (Bulun, SE., 2009) und aktiviert zusätzlich das Immunsystem, z.B. durch eine Steigerung der Zytokinproduktion (Olive, DL., 2008). Gestagene dagegen führen über eine Senkung des Östrogenspiegels einerseits und eine direkte Wirkung auf das Endometrium andererseits durch einen Abbau der Gebärmutter Schleimhaut zu einem Rückgang der Beschwerden (Olive, DL., 2008), (Bulun, SE., 2009).

### 2. Metaplasietheorie

Diese Theorie beschreibt die Umwandlung von pluripotentem Zölomepithel in endometriales Gewebe, ausgelöst durch wiederholte Irritationen wie zum Beispiel Infektionen (Stauber, M. et al., 2005). Den Beweis für diese Theorie

liefert das sogenannte Rokitansky-Küster-Meyer-Hauser-Syndrom, bei dem Frauen mit rudimentärem Uterus ohne Endometrium ebenfalls an Endometriose erkranken. Das Gleiche kann bei Männern, die mit hohen Östrogendosen behandelt werden, beobachtet werden (Kiechle, M., 2011).

### 3. Induktionstheorie

Die Induktionstheorie ist eine Kombination aus der Transplantations- und der Metaplasietheorie. Der Stimulus für die Transformation ist in diesem Fall die retrograde Menstruation (Kiechle, M., 2011).

### 4. Immunsystem

Bei dieser Theorie spielt das menschliche Immunsystem eine Rolle in der Pathogenese der Endometriose. Es wird beobachtet, dass die Natürlichen Killerzellen gestört sind und es so zu einem mangelhaften Abbau des retrograd menstruierten Gewebes kommt (Kiechle, M., 2011). Ein weiterer Aspekt ist, dass Makrophagen im Peritoneum Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren, die ihrerseits als Stimulus auf die Endometrioseherde wirken und diese zur Proliferation anregen (Olive, DL., 2008). Belegt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen vermehrt Immunzellen gefunden werden (Olive, DL., 2008).

### 5. Genetik

Ein genetischer Hintergrund der Endometriose wird vermutet, ist jedoch noch nicht ausreichend bewiesen. Die Annahme wird durch die Beobachtung begründet, dass erstgradige weibliche Verwandte von Patientinnen, die an schwerer Endometriose leiden, ein erhöhtes Risiko haben, ebenfalls an Endometriose zu erkranken (Steffanson, H. et al., 2001). In Zwillingsstudien wurde herausgefunden, dass die Wahrscheinlichkeit zu erkranken zu 51% auf genetischen Faktoren beruht. Studien zeigten, dass Schwestern von Endometriose-Patientinnen ein 2-9fach erhöhtes Risiko hatten, selbst zu erkranken; litten diese Patientinnen unter schwerer Endometriose, war das

Risiko sogar 15fach erhöht (Kiechle, M., 2011). In der aktuellen Literatur findet man kontroverse Ergebnisse. So beschreiben Luong et al., dass sie keine Assoziation zwischen dem *KRAS*-single-nucleotid-Polymorphismus (SNP) rs61764370 und dem Risiko, an Endometriose zu erkranken, belegen können. SNPs sind Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang; rs61764370 befindet sich in der 3'-untranslatierten Region des *KRAS*-Gens und verhindert eine komplementäre Bindung durch die *let-7* mikroRNA (Luong, HTT. et al, 2012). Grechukhina et al. dagegen fanden bei 31% der Frauen mit Endometriose eine Variation im *KRAS*-Allel, was über erhöhte mRNA-Spiegel und eine gesteigerte Proteinexpression zu vermehrter Proliferation und Invasion führte. Diese Ergebnisse lassen also wiederum sehr wohl den Schluss zu, dass ein erblicher Polymorphismus der *KRAS*-Bindungsstelle für die *let-7* miRNA zu einer Endometriose führen könnte (Grechukhina, O. et al., 2012).

### 1.3.3 Symptome

Die Endometriose ist in ihrer Symptomatik nicht einheitlich. So gibt es Patientinnen, die unter zyklusabhängigen oder auch permanenten Schmerzen, v.a. Dysmenorrhöen, Dyspareunie und Rückenschmerzen leiden (Giudice, LC., 2004). Die Häufigkeiten der Symptome der Endometriosepatientinnen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Die Schmerzen werden u.a. dadurch erklärt, dass die Endometriose-Herde, wie das normale Endometrium auch, Prostaglandine produzieren, die zu den Beschwerden führen. Oft wird die Endometriose dadurch erkannt, dass die Patienten unter einem unerfüllten Kinderwunsch leiden (Stauber, M. et al., 2005). Die Endometriose kann jedoch auch asymptomatisch verlaufen und inzidentell, also als Zufallsbefund, im Rahmen einer Laparoskopie oder Laparotomie diagnostiziert werden. Die Schmerzsymptomatik hängt auch von der Lokalisation der Endometriose-Herde ab.

**Tabelle 2: Symptome der Endometriose (Stauber, M. et al., 2005)**

Sekundäre Dysmenorrhö	50-60%
Sterilität	30-50%
Zyklische Unterbauchschmerzen	30-40%
Dysurie	2-5%
Zyklische Hämaturie/ blutige Defäkation	<1%
Prämenstruelle Schmierblutungen/ Hypermenorrhö	5-15%
Dyspareunie	Nicht bekannt
Defäkationsbeschwerden	1-5%

#### **1.3.4 Lokalisation**

Die Endometrioseherde können sich an verschiedenen Orten ansammeln, meistens finden sie sich im Bereich der inneren Genitalien. Mit 60% befindet sich die häufigste Ansammlung am Lig. sacrouterinum, gefolgt von den Ovarien mit 52%. Extraabdominale Lokalisationen wie Lunge, Gehirn, Nabel oder Narbengewebe sind selten. Weitere Lokalisationen und ihre Häufigkeiten (in %) können nachfolgender Tabelle 3 entnommen werden.

**Tabelle 3: Lokalisationen von Endometrioseherden (Kiechle, M., 2011)**

Lig. Sacrouterinum	60
Ovar	52
Douglas-Raum	28
Lig.latum	16
Harnblase	15
Rektum	12
Mesosalpinx	10
Dünn-/Dickdarm	7
Tube	2-8
Appendix	2

Problematisch sind Ansammlungen im Bereich des Rektosigmoids, hier kann es, wenn der Darm mitbeteiligt ist, zu erheblichen Darmsymptomen bis hin zu zyklusabhängigen Darmblutungen kommen (Kiechle, M., 2011).

Komplikationen gibt es ebenfalls des Öfteren bei Befall der Ligg. sacrouterina, wenn es durch Kompression der Ureteren zu Stauungsniere kommt. Aus diesem Grund sollten Nieren und ableitende Harnwege bei Verdacht auf Endometriose immer auch sonographiert werden (Kiechle, M., 2011).

Eine besondere Form der Endometriose betrifft die Ovarien. Hier können sich sogenannte Teer- oder Schokoladenzysten bilden, wenn der Inhalt der Endometriosezysten eindickt. Diese Zysten können sehr groß werden und bluten ebenfalls zyklusabhängig bei jeder Menstruation mit.

Kommt es durch Befall der Tuben zu einem Tubenverschluss, so führt dies zu einer tubaren Sterilität (Stauber, M. et al., 2005).

Basierend auf den geschilderten Lokalisationen kann die folgende Einteilung der Endometriose vorgenommen werden:

- 1) Endometriosis genitalis interna
- 2) Endometriosis genitalis externa
- 3) Endometriosis extragenitalis

Die Endometriosis genitalis interna, auch Adenomyosis uteri genannt, ist eine Sonderform der Endometriose, die Zugehörigkeit zu dieser ist umstritten. Hierbei infiltriert Endometrium das Myometrium des Uterus, wodurch dieser hypertrophiert (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2010).

Bei der Endometriosis genitalis externa sammeln sich die Endometrioseherde an den Organen des kleinen Beckens und somit außerhalb des Uterus an (Kiechle, M., 2011).

Die Endometriosis extragenitalis beschreibt Ansammlungen außerhalb des kleinen Beckens.

### **1.3.5 Pathologie**

#### Makroskopie:

Makroskopisch sind dunkle, stecknadelkopfgroße erhabene Areale sichtbar (Stauber, M. et al., 2005). Manchmal bilden sie das Zentrum einer sternförmigen Narbe (Stauber, M. et al., 2005). Das Wachstum ist polypös und kann das umliegende Bindegewebe infiltrieren.

Aufgrund ihres Aussehens kann die Aktivität der Endometrioseherde beurteilt werden. So stellen sich aktive Herde als rote, polypöse, z.T. diffus verteilte Bläschen dar, die das Peritoneum infiltrieren. Begleitend können eine vermehrte Vaskularisierung und entzündete Bereiche beschrieben werden. Weniger aktive Herde sind von der Farbgestaltung her eher dunkelbraun bis blauschwarz. Ausgebrannte Herde ähneln weißlichem Narbengewebe.

#### Mikroskopie:

Das mikroskopische Bild ist bunt. Histologisches Merkmal ist das Vorkommen von endometrialen Drüsen und Stroma, die dem uterinen Endometrium ähneln. Die Endometrioseherde können jedoch auch fibrotisches Gewebe, Zysten und Blut enthalten. Hochdifferenzierte Drüsen und Stroma unterliegen denselben zyklusabhängigen Veränderungen wie das uterine Endometrium (Bulun, SE., 2009). Das Drüsenepithel kann jedoch auch weniger differenziert sein als das Ausgangsgewebe und die Hormonabhängigkeit verlieren. Zum Teil kommen auch hochdifferenzierte Drüsengewebe vor, die dem Tuben- oder Zervixepithel ähneln, die sich demzufolge von endometriumspezifischem Gewebe unterscheiden und dann trotz des hohen Differenzierungsgrades keiner Hormonabhängigkeit unterliegen (Stauber, M. et al., 2005).

Das Endometriosegewebe ist überwiegend mit Östrogenrezeptoren ausgestattet (Stauber, M. et al., 2005).

### **1.3.6 Stadieneinteilung**

Als Klassifikationssystem dient das Schema der „American Society of Reproductive Medicine“ (rAFS). Es beurteilt intraoperativ die Ausdehnung der Endometriose am Peritoneum und Ovar und die Infiltrationstiefe der Herde. Außerdem wird geschaut, ob Adhäsionen vorhanden und die Fimbrien verschlossen sind (Kiechle, M., 2011).

Wichtig auch für spätere Therapieansätze ist, dass der hier beschriebene Schweregrad nicht mit der Symptomatik und den subjektiven Beschwerden der Patientin zusammenhängen muss.

### **1.3.7 Diagnostik**

Den ersten Schritt zur Diagnosefindung liefert das klinische Bild der Patientinnen. Dieses beinhaltet zyklusabhängige Unterbauchschmerzen, Dyspareunie, evtl. prämenstruelle Schmierblutungen und weitere Symptome. In der Untersuchung sind schmerzhaft Knötchen im Septum rectovaginale und im Douglasraum zu tasten, als Beweis gelten blaue, rote oder braune Knoten im hinteren Scheidengewölbe (Kiechle, M., 2011). Sind die Ligg. Sacrouterina betroffen, so kann sich dies als sogenannter Portiolüftungsschmerz manifestieren, die Beweglichkeit des Uterus ist dann schmerzhaft (Stauber, M. et al., 2005). Eventuell sind Teer- oder Schokoladenzysten als echoarme Strukturen sonographisch darstellbar. In der Palpation fühlen sich diese teigig an und sind meist druckdolent (Stauber, M. et al., 2005).

Die endgültige Diagnose liefert jedoch die Laparoskopie, die Aufschluss über die Lokalisation und den Aktivitätsgrad der Endometriose gibt und ein Staging ermöglicht (Giudice, LC., 2004).



### 1.3.8 Therapie

Aufgrund der Variabilität der Beschwerden von Endometriose-Patientinnen gibt es keine einheitliche Therapieempfehlung. Sie umfasst die medikamentöse und operative Therapie, bei gering ausgeprägter Symptomatik kann dazu alternativ auch abgewartet werden (Kiechle, M., 2011). Wichtig jedoch ist, dass die Therapie immer individuell gestaltet wird, abhängig von Alter und Symptomatik der Patientin, bestehendem Kinderwunsch, Ergebnisse vorheriger Behandlungsversuche, Nebenwirkungen und Kosten der Therapie (Stauber, M. et al., 2005).

#### 1. Medikamentöse Therapie

Ziele der medikamentösen Therapie umfassen eine Reduktion des Schmerzes, eine Verringerung der Rezidivrate und eine Reduktion der bereits bestehenden Endometrioseläsionen (Bulun, SE., 2009). Ist die Endometriose noch nicht so stark ausgeprägt, kann eine Schmerztherapie mit Nichtsteroidalen Antiphlogistika und Spasmolytika ausreichend sein (Stauber, M. et al., 2005). Ist dies nicht der Fall, kann die Hormontherapie in Anspruch genommen werden. Hormonpräparate senken den Östrogenspiegel und führen im Verlauf zu einer Rückbildung der Endometrioseherde (Kiechle, M., 2011). Das in-vivo-Korrelat zu dieser Annahme ist die Beobachtung, dass sich bei Endometriosepatientinnen die Läsionen postmenopausal ebenfalls zurückbilden (Stauber, M. et al., 2005).

#### GnRH-Analoga

GnRH-Analoga binden längerfristig an den GnRH-Rezeptor der Hypophyse, was zu einer Herunterregulierung derselben und damit zu einem hypogonadotropen Hypogonadismus durch Abfall der Gonadotropine LH und FSH führt. Resultat sind eine sekundäre Ovarialinsuffizienz und Abfall des Estradiolspiegels. Durch den niedrigen Estradiolspiegel bilden sich die Endometrioseherde zurück. Da diese Hormonpräparate viele unerwünschte Wirkungen wie Hitzewallungen, Schlaflosigkeit, Depressionen und Osteoporose

haben und sehr teuer sind, wird von einer langfristigen Gabe abgeraten (Giudice, LC., 2004). Die Behandlung sollte ca. 3-6 Monate erfolgen (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2010).

### Gestagene

Gestagene haben zwei Wirkungsweisen: So senken sie ebenfalls über Suppression der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse den Östrogenspiegel, haben jedoch auch eine direkte Wirkung auf das Endometrium. Sie führen zur Dezidualisierung und Atrophie des eutopen Endometriums und der Endometrioseläsionen und mindern so die Menstruationsblutung, was zu einem Rückgang des Krankheitsbildes führt (Kiechle, M., 2011). Die unerwünschten Wirkungen umfassen Übelkeit, Wasserretention und Depressionen (Stauber, M. et al., 2005).

Eine weitere Therapieoption ist die Gabe von Ovulationshemmern im Langzyklus, also ohne die 7-tägige Einnahmepause (Kiechle, M., 2011).

Danazol ist ein weiteres Element der medikamentösen Therapie der Endometriose. Der Wirkmechanismus ist noch nicht geklärt, es wurden jedoch verschiedene Effekte beobachtet. So hemmt es einerseits die Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde und in den Gonaden, andererseits hemmt es die peripheren Steroidhormonrezeptoren. Danazol beeinflusst ebenfalls die Hypothalamus-Hypophysen-Achse und verhindert so LH- und FSH-Peaks. Schließlich wirkt es auch direkt an den Endometriosezellen, indem es durch Bindung an die Androgen- und Progesteronrezeptoren die Zellproliferation reduziert. Danazol ist beliebt, da es ein geringes Spektrum an unerwünschten Wirkungen aufweist. (Stauber, M. et al., 2005)

## 2. Operative Therapie

Bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch steht die operative Therapie im Vordergrund, insbesondere mikrochirurgische Lösung von Adhäsionen,

Rekonstruktion der Ovarien und Wiederherstellen der Fertilität der Patientinnen (Bulun, SE., 2009). Bei Patientinnen mit abgeschlossener Familienplanung ist die Beseitigung der Endometrioseläsionen und der Symptome vordergründig (Stauber, M. et al., 2005).

## **1.4 MikroRNAs**

### **1.4.1 Allgemeines**

MikroRNAs (miRNAs) sind kleine, endogene, nichtkodierende RNAs einer Größe von 18-24 Nukleotiden (nt), die die Genexpression regulieren (Neubauer & al., 2012). Durch Anlagerung an die mRNA von proteinkodierenden Genen steuern sie die translationale Repression und/oder mRNA-Degradation (Bartel, DP., 2004). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass miRNAs und ihre Ziel-mRNAs bei verschiedenen gynäkologischen Erkrankungen, so auch bei der Endometriose, eine unterschiedliche Expression zeigen (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2010). Diese von der Norm abweichende miRNA-Expression zeigt eine Assoziation mit verschiedenen Krankheiten wie Krebs, entzündlichen Krankheiten, Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und auch mit gynäkologischen Erkrankungen (Gilabert-Estelles, J. et al., 2012).

### **1.4.2 Entdeckungsgeschichte der miRNAs**

Unsere heutigen Erkenntnisse über diese kurzen, einzelsträngigen nichtkodierenden miRNAs entstammen einer Entdeckung im Jahr 1993: Die erste miRNA, 22 nt in Form einer Haarnadel, wird auf dem Gen *lin-4* in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Es zeigt sich, dass diese RNA an die LIN14 mRNA bindet und so deren Translation hemmt (Lee, RC. et al., 1993) (Wightman, B. et al., 1993). Sieben Jahre später wurde diese Entdeckung um die Beobachtung erweitert, dass *let-7* auf ähnliche Art und Weise die posttranskriptionale Gen-Regulation in Nematoden beeinflusst (Reinhart, BJ. et al., 2000). Dass miRNAs bei vielzelligen Organismen in Bezug auf die Genregulation eine Rolle spielen, wird durch die Tatsache belegt, dass *let-7*

nicht nur in Nematoden, sondern auch in verschiedenen Tieren, so auch in Säugetieren, nachgewiesen werden konnte (Wienholds, E., 2005).

### **1.4.3 Biosynthese der miRNAs**

Bis zur Entstehung der reifen miRNA müssen mehrere Schritte in Nukleus und Cytoplasma durchlaufen werden. Die Prozessierung der miRNA beginnt im Zellkern mit der Transkription der Vorstufe „pri (primary)-miRNA“ durch die Polymerase II. Diese wird nun zu einer weiteren Vorstufe, „pre (precursor)-miRNA“, mit charakteristischem „hairpin- oder stem loop“-Muster durch die RNase III Endonuklease Drosha und deren Bindungspartner Pasha/DGCR8 prozessiert und mithilfe des Enzyms Exportin 5 in das Cytoplasma geschleust. Dort wird die pre-miRNA durch das sogenannte Dicer-Enzym zur reifen miRNA prozessiert. In diesem Zustand findet eine Komplexbildung mit einem Multiproteinkomplex, dem RISC (RNA-induced silencing complex) statt. Durch Bindung an die 3'-untranslatierte Region (UTR) der mRNA wird bei komplementärer Bindung der Abbau der mRNA durch den RISC-Komplex induziert, bei nicht vollständig komplementärer Bindung wird die Translation unterdrückt. Auf diese Art und Weise kann eine miRNA an eine Mehrzahl von komplementären mRNAs binden, andererseits kann die UTR einer mRNA durch verschiedene miRNAs reguliert werden.

(Götte, M., 2010) (Bartel, DP., 2004) (Neubauer & al., 2012)

### **1.4.4 Methodik der Analyse von miRNAs**

Durch die im Laufe der Jahre stets anwachsende Zahl an identifizierten miRNAs wurden zur Analyse Microarrays entwickelt, die eine Vielzahl an miRNA-Gensonden beinhalten. Mithilfe dieser ist es möglich, die Expression eine Vielzahl von miRNAs parallel zu untersuchen und so miRNAs, die mit einer Krankheit assoziiert sind, zu identifizieren (Kong, W. et al., 2009). Es wurden darüber hinaus *in silico*-Algorithmen entwickelt, mit deren Hilfe die Ziel-mRNA der jeweiligen miRNA vorausgesagt werden konnten (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2010). Diese Modelle suchen in der Regel nach Ziel-mRNAs, die homolog

zu der 5' „Seed-Sequenz“ einer miRNA sind (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2010). Die hierbei gewonnenen Informationen sind in öffentlich zugänglichen Datenbanken abrufbar.

Der Gebrauch dieser *in silico*-Methoden ist zwar mittlerweile weit verbreitet, jedoch ist die experimentelle Überprüfung der miRNA-abhängigen Repression auf Protein- oder mRNA-Ebene weiterhin zwingend notwendig (Kuhn, D. et al., 2008). Den Goldstandard bilden hierfür qRT-PCR und Westernblots zusammen mit einem Luziferase-Assay (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2010).

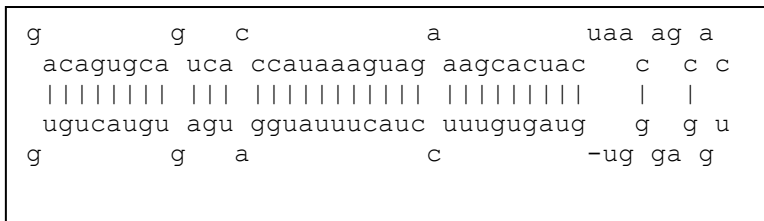
#### **1.4.5 MikroRNAs und ihre Rolle bei Pathogenese Prozessen**

Aktuelle Studien zeigen, dass die von der Norm abweichende Expression von miRNAs mit einer Reihe von benignen und malignen Erkrankungen, wie z.B. Endometriose, Endometrium-, Cervix- und Ovarial-Karzinom, assoziiert ist (Gilbert-Estelles, J. et al., 2012). Die Beteiligung von miRNAs wurde auch bei Erkrankungen außerhalb des weiblichen Genitaltrakts beschrieben. So zeigt sich eine Assoziation zwischen der abweichenden Expression von miRNAs und hämatologischen und kardiologischen Erkrankungen (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2009). In einer Reihe von Studien werden anders regulierte miRNAs bei Endometriosepatientinnen beschrieben. So identifizierten Pan et al. mithilfe eines Expressions-Profiles 48 miRNAs, die im ektopen vs. eutopen Endometrium unterschiedlich reguliert sind (Pan, Q. et al., 2007). Ohlsson Teague et al. beschreiben 22 anders regulierte miRNAs im ektopen vs. eutopen Endometrium, davon sind 14 hoch- und 8 herunterreguliert, wie auch beispielsweise die miR-142-3p (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2009). Auch Burney et al. identifizieren 6 anders regulierte miRNAs im frühen sekretorischen Endometrium bei Frauen mit vs. Frauen ohne Endometriose (Burney & al., 2009). Die hiesige Arbeitsgruppe zeigte die funktionelle Relevanz einer veränderten Expression der miR-145 in Brustkrebszellen (Götte, M. et al., 2010) und in Endometriosezellen (Adammeck, M. et al., 2013). Eine weitere Studie zeigt ebenfalls eine veränderte Expression von miRNAs im ektopen

Endometriumgewebe und beschreibt außerdem die endokrine Regulation der miRNA-Expression durch Sexualsteroid (Toloubeydokhti, T. et al., 2008).

#### 1.4.6 miR-142-3p

Bei der miR-142-3p handelt es sich um eine bisher recht unerforschte mikroRNA, die auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist.



**Abbildung 1: Struktur der humanen mikroRNA miR-142-3p (Faculty of Life Sciences, Univ. of Manchester, 2012)**

Sie wurde ursprünglich als hämatopoese-spezifische miRNA identifiziert (Chen, C. et al., 2004). In den letzten Jahren wurde eine fehlgeleitete Expression der miR-142-3p bei anderen Erkrankungen beobachtet, wie zum Beispiel bei verschiedenen Tumoren, immunologischen und anderen Erkrankungen. Besonders in der Gruppe der hämatoonkologischen Erkrankungen wurde eine veränderte Expression mehrfach beschrieben (Lv, M. et al., 2012), (Wang, XS. et al., 2012), (Bissels & al., 2011). So ist die miR-142-3p in T-Zellen von Leukämie-Patienten stark erhöht und mit deren Outcome assoziiert. Es wird vermutet, dass die miR-142-3p die Proliferation der T-Zellen mithilfe ihrer Targets cAMP, Proteinkinase A (PKA) und den Glukokortikoidrezeptor  $\alpha$  (GR $\alpha$ ) begünstigt. Dies könnte die miR-142-3p als potentielles Therapie-Target identifizieren (Lv, M. et al., 2012). Des Weiteren scheint die miR-142-3p an der Regulation der myeloischen Differenzierung in Leukämie-Stammzellen und bei der Akuten myeloischen Leukämie beteiligt zu sein. Es wurde gezeigt, dass die Expression der miR-142-3p bei der Akuten myeloischen Leukämie erniedrigt ist (Wang, XS. et al., 2012). Auch bei Tumorerkrankungen wurde eine veränderte Expression der miR-142-3p beobachtet. So wird eine veränderte Expression der miR-142-3p beim Kolorektalen Karzinom beschrieben (Chen, WC et al.,

2012). Auch beim Hepatocellulärem Karzinom (HCC) wird der miR-142-3p eine Bedeutung bei der Pathogenese zugeschrieben: So unterdrückt sie als negativer Regulator von *RAC1* die Migration und Invasion in HCC-Zellen (Wu, L. et al., 2011).

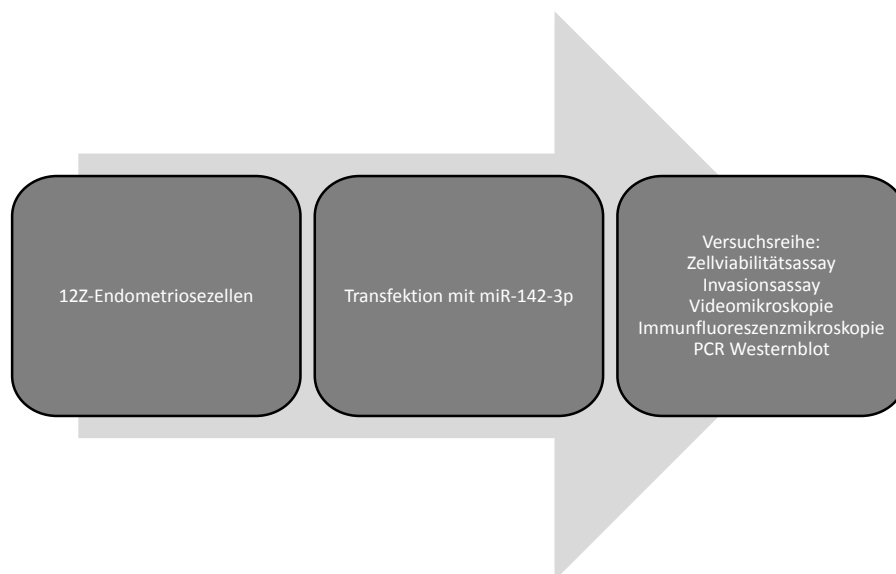
Neben *RAC1*, cAMP, Proteinkinase A und GR $\alpha$  sind bereits weitere Zielgene der miR-142-3p identifiziert worden. So ist die miR-142-3p über die Regulation von Rock2a und T-Boxgene 16 essentiell an der Hämatopoese und Kardiogenese in Zebrafischen beteiligt (Nishiyama, T. et al., 2012). Ein weiteres Target der miR-142-3p ist das Interleukin 6 (IL-6). Die miR-142-3p reguliert die IL-6-Produktion in Dendritischen Zellen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und spielt so eine wichtige Rolle bei der gram-negativen Sepsis (Sun, Y. et al., 2011).

Insgesamt wird einerseits deutlich, dass die miR-142-3p eine wichtige Rolle bei verschiedenen Krankheitsprozessen im menschlichen Körper spielt, dass andererseits aber die Erforschung der molekularen Grundlagen dieser Beteiligung noch in den Anfängen steckt. Die weitere Untersuchung der miR-142-3p ist somit ein sehr interessantes, aktuelles und ergiebiges Forschungsgebiet.

## **1.5 Fragestellung**

MiRNAs spielen im menschlichen Körper eine große Rolle bei der Steuerung von komplexen Prozessen, indem sie die Expression von Proteinen und Genen regulieren. Sie sind beteiligt an der Entstehung verschiedener Krankheiten, die sowohl benigne als auch maligne Erkrankungen umfassen. So wurde der Einfluss auf verschiedene Krebserkrankungen, die Endometriose, aber auch auf das blutbildende und auf das Herz-Kreislauf-System beschrieben (Gilbert-Estelles, J. et al., 2012) (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2009). In der hiesigen Forschungsgruppe wurde schon die Expression der mir-145 in Brustkrebs- (Götte, M. et al., 2010) und Endometriosezellen (Adammek, M. et al., 2013) untersucht.

Die erst seit 1993 bekannten einzelsträngigen, nichtkodierenden RNAs wurden zwar in den letzten Jahren zunehmend erforscht und die veränderte Expression zahlreicher miRNAs im ektopen Endometriumgewebe nachgewiesen (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2009) (Pan, Q. et al., 2007) (Burney & al., 2009), jedoch weist die aktuelle Literatur Lücken bezüglich aktueller experimenteller Forschungsergebnisse hinsichtlich der regulatorischen Funktion der beschriebenen miRNAs auf. Dieses Thema ist also generell noch relativ unerforscht, es zeigen sich jedoch möglicherweise neue Ansätze der Diagnostik und Therapie der Endometriose, die es noch genauer zu untersuchen gilt. Diese könnten einen großen Fortschritt für die Endometrioseforschung bedeuten. Die miR-142-3p ist im ektopen Endometriumgewebe im Vergleich zum eutopen Endometriumgewebe fehlreguliert (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2009). Datenbankanalysen zufolge könnte die miR-142-3p mehrere Gene regulieren, die Auswirkungen auf das Zellverhalten von Endometriosezellen zeigen. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Fehlregulation der miR-142-3p die Entstehung einer Endometriose begünstigen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit soll die potentielle Beteiligung der miRNA miR-142-3p bei der Pathogenese der Endometriose in einem Zellkulturmodell in vitro erforscht werden. Der schematische Ablauf der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Versuchsreihe**



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zelllinie**

Bei den 12Z-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die ein adhärentes Wachstum aufweist. Adhärenente Zelllinien bilden durch Zellvermehrung und –migration einen konfluenten Monolayer, was dazu führt, dass die Zellen das Wachstum einstellen, degenerieren und schließlich absterben (Helgason et al., 2013). Um ein angemessenes Wachstumsverhalten der Zellen gewährleisten zu können, muss man die Zellen deswegen passagieren, also nach Verdünnung neu aussäen. Hierbei sind aus Patientenbiopsien isolierte (nicht immortalisierte) Primärzellen jedoch nur in begrenztem Umfang wiederholt passagierbar.

Immortalisiert wurden die 12Z-Zellen in einem *in vitro*-Modell durch das Einbringen des DNA Tumor Virus SV40 T-Antigen, das durch Interaktion mit Proteinen des Zellzyklus die Apoptose der betroffenen Zellen verhindert, sodass sie proliferationsfähig bleiben, durchgeführt und beschrieben von Zeitvogel et al., (Zeitvogel, A. et al., 2001). Auch die mit dem SV40 T-Antigen transfizierten Zellen erreichen jedoch einen Zustand, in dem zwar keine Proliferation mehr möglich ist, in dem die Zellen jedoch noch immer lebensfähig sind. Dieser Zustand wird „crisis“ genannt. Zellen, wie z.B. die 12Z-Zelllinie, die es schaffen, diesen Zustand zu überwinden, haben dann die Eigenschaft, uneingeschränkt proliferieren zu können und sind somit immortal.

Da die Transformation mit SV40T-Antigen vor allem aktiv proliferierende Zellen betrifft (Zeitvogel, A. et al., 2001), zeigte sich, dass nur Zellen aus Biopsien aus hellroten Endometriose-Läsionen fähig waren, als primäre Kultur zu wachsen.

Die Zelllinie weist mRNA für die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  sowie für den Progesteron-Rezeptor auf, ebenso ist die Aromatase cytochrom P450, die die Umwandlung von Androgen zu Östrogen katalysiert, vorhanden

(Zeitvogel, A. et al., 2001). Die 12Z-Zellen sind Cytokeratin positiv und E-cadherin negativ, was das invasive Wachstumsverhalten dieser Zelllinie erklären könnte.

### **2.1.2 Medien**

Als Nährmedium wurde DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x, 4,5g/L Glucose, [+] L-Glutamin, [-] Pyruvate) [Gibco®] mit 10% FKS (Fötales Kälberserum) [PAA] und 1% Penicillin/Streptomycin [PAA] verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen [BD Falcon™] im Inkubator [CO<sub>2</sub>-Auto-Zero, Heraeus] bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt.

Um die Zellen passagieren zu können, wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen mit PBS [Gibco] gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurde je nach Größe der Flasche entweder 2,5ml (75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche) bzw. 5ml (175cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche) Trypsin/EDTA-Lösung (1x, 0,05%/0,02% in PBS) [PAA] auf die Zellen gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop [Axiovert 100, Zeiss] geprüft, ob es zu einer erfolgreichen Ablösung der Zellen gekommen war. Falls dies nicht der Fall war, wurde die Inkubationszeit verlängert. Bei erfolgreichem Ablösen der Zellen wurde nun die doppelte Menge PBS/10% FKS auf die Zellen gegeben, um die Trypsin/EDTA-Lösung zu inaktivieren. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium suspendiert. Die Zellen wurden im nächsten Schritt neu ausgesät.

## **2.2 Transfektion**

**Prinzip:** Bei der Transfektion wurden 12Z-Zellen mit miR-142-3p transfiziert. Dabei wurde mit Hilfe eines speziellen Reagenz die negativ geladene

Zellmembran überwunden und so die mikroRNA-Vorstufe ins Zellinnere transferiert.

**Durchführung:** Pro Ansatz wurden 2µl Dharmafect Transfektionsreagenz mit 78µl Optimem (=Lösung 1) in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 78µl Optimem mit 2µl miR-142-3p (=Lösung 2) bzw. mit miR-Kontrolle (=Lösung 3) in je einem Eppendorf-Gefäß gemischt und ebenfalls 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu den Lösungen 2 und 3 je ein Ansatz von Lösung 1 hinzugegeben und erneut 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Medium der mit Zellen besiedelten 6-Well-Platte wurde abgenommen und durch je 840µl Optimem/Well ersetzt. Nach Ende der Vorinkubation wurden 160µl des miR-142-3p- bzw. des Kontroll-miRNA-Mixes tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der 6-Well-Platte gemischt. Bevor die transfizierten Zellen in weiteren Experimenten genutzt wurden, inkubierten sie mindestens ca. 24 Stunden.

### **2.3 Proliferationsassay / Zellviabilitätsassay**

**Prinzip:** Das Proliferations-/MTT-/Zellviabilitätsassay dient der Quantifizierung noch lebender Zellen nach Zugabe einer toxischen Substanz verglichen mit den noch lebenden Kontrollzellen. Dies geschieht mithilfe des gelben, wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), der zu dem blau-violetten, wasserunlöslichen Farbstoff Formazan reduziert wird. Die Menge des mittels ELISA gemessenen Farbstoffes entspricht der Glykolyserate der jeweiligen Zellen (Schröterová, L. et al., 2009).

**Durchführung:** Die 12Z-Zellen wurden wie beschrieben mit der miR-142-3p transfiziert und anschließend inkubiert. Nach 24h folgte ein Mediumwechsel. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Dann wurden pro Well einer 96-Well-Platte 10000 Zellen in 100µl DMEM high Glucose (4,5g/l) 10% FCS ohne Phenolrot in

Dreifachwerten pipettiert und in den 5 folgenden Schritten jeweils einer 1:2-Verdünnung unterzogen. Eine Kontrolle, die nur 200µl Medium enthielt, diente als Leerwert. Nach einer Adhäsionszeit von 72h wurden 20µl der MTT-Reagenz (250mg MTT Pulver [Sigma] in 50ml PBS, steril filtriert) pro Well dazugegeben. Es folgte eine 4-stündige Inkubation bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub>, dann wurden 100µl eines Lyse-Puffers (10% SDS, 50% N,N-Dimethylformamid [Sigma] in destilliertem H<sub>2</sub>O, pH 4,7) in die Wells gegeben, der die Farbreaktion beendete. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Nach 20h wurden die Proben im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595nm photometrisch gemessen.

## 2.4 Invasionsassay

**Prinzip:** Der Versuchsaufbau besteht aus einem Kammersystem, in dem 2 Kompartimente durch eine poröse, auf der Oberfläche mit Matrigel beschichteten Membran voneinander getrennt werden. Verwendet wurden sogenannte Bio Coat®Matrigel®Invasion Chambers, von der jeweils eine pro Ansatz in einem Well einer 24-Well-Platte installiert wurde. Die Membran ist mit Poren durchsetzt. Matrigel enthält als Hauptbestandteile Laminin, Kollagen 4, Heparansulfat-Proteoglykane und Entactin. Somit ist es als rekonstituierte extrazelluläre Matrix zu verstehen und verschließt als solche die Membranporen, sodass nur Zellen mit der Fähigkeit zur proteolytischen Invasion die Membran überwinden und so von dem oberen in das untere Kompartiment gelangen konnten.

Im Versuch wurde die gewählte Zellzahl auf die Membranoberseite gebracht, beide Kompartimente mit Kulturmedium versehen und das untere Kompartiment mit nährstoffreichem Kulturmedium versetzt, das als Chemotaxans wirkte. Diesem chemotaktischem Reiz folgend durchwanderten die zur Invasion fähigen Zellen die Membran, bis sie sich an der Unterseite der Membran befanden. Dort konnten sie in einem letzten Schritt fixiert, gefärbt und schließlich auf einen Objektträger gebracht werden. Unter dem Mikroskop konnte nun die Quantität der mit miR-142-3p transfizierten Zellen mit der

Quantität der Kontroll- miRNA verglichen und so eine Aussage über das Invasionsverhalten der Zellen gemacht werden.

**Durchführung:** Pro Well wurden 200000 12Z-Endometriose-Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät und am darauffolgenden Tag nach bekanntem Verfahren transfiziert. Nach einem Mediumwechsel am frühen Morgen des nächsten Tages wurde nachmittags die gewünschte Zellzahl von 25000 Zellen pro Filter in 500µl Volumen in Doppelwerten auf die Filter gesetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde das Invasionsassay gestartet. Dazu wurden zunächst die 500µl Kulturmedium von den Filtern abgenommen und diese möglichst luftblasenfrei in je ein mit 750µl Kulturmedium mit 10%FCS gefülltes Well einer 24-Well-Platte gestellt. Anschließend wurden 500 µl DMEM10%/0% (ohne FCS) auf den Filter gegeben. Es folgte eine ca. 26-stündige Inkubation unter Zellkulturbedingungen. Der Invasionsstopp erfolgte am nächsten Tag. Dazu wurde eine 24-Well-Platte mit DiffQuick®Reaktionssystem vorbereitet, sodass pro Filter je 600µl DiffQuick 1-3 und H<sub>2</sub>O in jeweils einem Well vorgelegt wurden. Im ersten Schritt wurden die Filter zum Fixieren für 3 Minuten in die DiffQuick1-Lösung getaucht, anschließend kurz in DiffQuick2 gewaschen und schließlich für 7 Minuten in DiffQuick3 gestellt, welches die Zellen färbte. Die Filter wurden dann in das H<sub>2</sub>O gestellt, um die eben genannten Vorgänge zu beenden, anschließend wurden die Filter in einer größeren Menge H<sub>2</sub>O gewaschen.

Dann wurden Zellen samt Matrigel vorsichtig mit einem Q-Tip vom Filter entfernt, ohne diesen kaputt zu machen. Nachdem die Filter an der Luft getrocknet waren, wurden sie auf einen Objektträger gebracht. Dann folgte die Auswertung. Dazu wurde der Boden der Filter vorsichtig mit einem Skalpell hinausgeschnitten und mit der Außenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt. Dann wurde ein mit Eukitt bestrichenes Objektglas mit der bestrichenen Seite nach unten auf den Objektträger gelegt und eventuelle Luftblasen weggedrückt. Als die Objektträger getrocknet waren, erfolgte die Auswertung.

## 2.5 Videomikroskopie

**Prinzip:** Es wurden Fotos im Abstand von 10 Minuten von sowohl mit miR-142-3p transfizierten Zellen als auch von Kontrollzellen mithilfe von invertierten Mikroskopen [ID03 und Axiovert25, Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Deutschland] gemacht, die bezüglich Geschwindigkeit, zurückgelegter Strecke, Strukturindex und Fläche miteinander verglichen wurden.

**Durchführung:** Es wurden 450000 12Z-Zellen/Well in Doppelwerten in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Transfektion auf die bereits beschriebene Art. Es wurden kleine Flaschen mit 1ml einer Suspension aus 10µg Fibronectin in 1ml PBS gefüllt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. 24h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, 8h später wurden transfizierte Zellen und Kontroll-Zellen in die mit Fibronectin beschichteten Flaschen umgesetzt.

Die Flaschen wurden in beheizte Kammern von invertierten Mikroskopen [ID03 und Axiovert25, Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Deutschland] gesetzt. Die Zellmigration wurde 12h lang bei 37° aufgezeichnet, dabei wurden Videokameras [Modelle XC-ST70CE und XC-77CE, Hamamatsu/Sony, Japan] und PC-Frame-Grabber [Hamamatsu] verwendet. Es wurde alle 10 Minuten ein Foto gemacht, kontrolliert durch ein High-Performance Bild-Kontroll-System, sodass insgesamt für jede Probe 72 Bilder entstanden. Der Umfang der Zellen wurde mithilfe der AMIRA-Software [TGS Inc., San Diego, CA, USA] markiert. Die Zellen wurden dann im Hinblick auf Geschwindigkeit, zurückgelegte Strecke, Strukturindex und Fläche untersucht. Es wurden jene Zellen in die Analyse eingeschlossen, die das Bild nicht verließen, sich nicht teilten oder mit anderen Zellen kollidierten. Geschwindigkeit wurde definiert als zurückgelegte Strecke der Zelle pro Zeit, die Fläche der Zellen wurde bestimmt anhand der Pixelzahl und der Strukturindex repräsentiert die Form der Zelle und wird wie folgt berechnet (Stock, C. et al., 2005):

$$SI = (4 \pi A) / p^2$$

A ist dabei die Fläche, die von der Zelle bedeckt wird und p der Perimeter von A (Dunn, GA. et al., 1987). Ein SI (Structural Index) von 1 steht dabei für eine annähernd runde Zellform, ein SI von 0 für eine dendritische Zellform.

## 2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

**Prinzip:** Basierend auf Immunfluoreszenz werden mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie Proteine im subzellulären Bereich lokalisiert. Dazu macht man sich die Antikörperbindung zunutze: Gegen ein bestimmtes Protein gerichtete Antikörper werden an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, sodass bei erfolgreicher Bindung an das Antigen dessen Lokalisation durch Nachweis des Fluoreszenzlichts ermittelt werden kann. (Wiley Information Services GmbH, 2013)

**Durchführung:** Es wurden 12Z-Zellen ausgesät, 24h später wurden sie zum Teil mit der miR-142-3p transfiziert, ein Teil der Zellen wurde nicht transfiziert und diente somit als Kontrolle. Weitere 24h später erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 8h wurde eine 24Well-Platte in Dreifachwerten mit sowohl Fibronectin als auch Laminin vorbereitet. Dafür wurden Deckgläschen in Wells (wieder mit Kontrollwerten) mit 250µl Fibronectin in einer Konzentration von 10µg/ml PBS beschichtet. Am nächsten Morgen wurden die übrigen Wells mit einer Konzentration von 25µg/ml Laminin beschichtet, 30min. bei Raumtemperatur inkubiert, 1 Std. trocknen gelassen. Die Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und in einer Konzentration von 30000 Zellen/Well ausgesät. Die mit Fibronectin beschichteten Deckgläschen wurden vor dem Aussäen der Zellen mit etwas PBS gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen zunächst 10 Minuten mit Formalin fixiert, 2x mit je 400µl PBS/Well gewaschen und schließlich 5min. mit 200µl PBS/0,1% TritonX-100/Well inkubiert. TritonX-100 permeabilisiert Membranen und ermöglicht so den Antikörper-Zugang. Anschließend wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen und dann 10 min. mit 200µl/Well PBS/Aurion

BSAc in einer 1:10-Verdünnung blockiert. Es folgte die Inkubation mit 200µl des 1. Antikörpers in einer 1:100-Verdünnung mit Dako REAL™ Antibody Diluent bzw. ohne AK für die Negativkontrolle für 1h bei Raumtemperatur. Der Primär-AK erzeugte eine Bindung mit Vinculin. Nach 3 5-minütigen Waschschritten mit PBS erfolgte im Dunkeln die Inkubation mit sowohl dem Sekundär-AK Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG von Invitrogen in einer Verdünnung von 1:400 mit Dako REAL™ Antibody Diluent als auch Alexa Fluor®568 Phalloidin invitrogen in einer Verdünnung von 1:1000. Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG bindet an den Vinculin-bindenden Primärantikörper und erzeugt eine grüne Fluoreszenz, Alexa Fluor®568 Phalloidin färbt Aktin durch direkte Bindung und erzeugt eine rote Fluoreszenz. Von diesem Schritt an wurden die Proben im Dunkeln gehalten, in dem sie mit Aluminiumfolie umwickelt wurden. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, daran schlossen sich 3 5-minütige Waschschrritte mit PBS an. Im letzten Schritt wurden die Objektgläschen in Vectashield eingebettet und mit Nagellack auf Objektträgern fixiert. Diese wurden in Aluminiumfolie gewickelt bei -20° aufbewahrt und dann unter einem Konfokalmikroskop [Leica TCS SL] ausgewertet.

## 2.7 PCR

**Prinzip:** Die Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, zusätzlich ist es jedoch bei der Real-Time-PCR möglich, durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden die PCR-Produkte in Echtzeit zu quantifizieren. Somit weist diese Methode sowohl eine größere Empfindlichkeit als auch eine größere quantitative Genauigkeit auf (Higuchi, R. et al., 1993). In den im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritten wird zwischen der quantitativen Mikro Real-Time-PCR und der mRNA Real-Time-PCR unterschieden.

### 2.7.1 Quantitative Mikro Real-Time-PCR

Die 12Z-Endometriosezellen wurden kultiviert, in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit der miR-142-3p transfiziert. In diesem Vorversuch sollte eine



Überexpression der miR-142-3p in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden, was eine Grundlage für die folgenden Versuche darstellte.

### ***2.7.1.1 RNA-Präparation***

Die Extraktion der RNA erfolgte mithilfe des mirVana™ miRNA Isolation Kits [Ambion]. Die Zellen wurden wie gewohnt ausgesät und 24h später transfiziert. Weitere 72h später wurde dann das Medium abgesaugt und verworfen. Dann wurde einmal mit PBS gewaschen und das PBS gründlich abpipettiert. Dann wurden 375µl Lysis / Binding Buffer aus dem mirVana™ miRNA Isolation Kit - Puffer pro Ansatz auf die Zellen gegeben, die Zellen dann mithilfe eines Cellscrapers vom Boden gelöst und in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt. Das so gewonnene Lysat konnte entweder bei -80° gelagert oder direkt verarbeitet werden. Es wurden dann 37,5µl Homogenate Additive zu jeder Probe dazugegeben, die Proben mithilfe des Vortexers gemischt und dann 10 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 375µl Phenol-Chloroform zu den Proben gegeben, die Suspension 30-60 Sek. auf dem Vortexer gemischt und dann 5 Min. bei 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Ziel ist es, eine 2-Phasen-Grenze deutlich zu sehen, sollte dies nach 5 Min. nicht der Fall sein, so ist eine erneute Zentrifugation nötig. Von der oberen wässrigen Phase wurden dann 300µl abgenommen, in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und 375µl 100% Ethanol, das Raumtemperatur haben sollte, dazugegeben. Dieses Gemisch wurde mithilfe einer Pipette suspendiert. Die im Kit enthaltenen Filter wurden in die speziellen Tubes gesetzt und die Suspension aus Ethanol und Proben auf den Filter gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Sek., die das Ziel hatte, die RNA herauszufiltern. Der Durchfluss wurde verworfen, das Tube behalten und der Filter in drei Waschschritten gereinigt. Der erste Waschschrift erfolgte mit 700µl miRNA Wash Solution 1, daran schloss sich eine kurze Zentrifugation bei 10000rpm an. Dann folgte ein Waschgang mit 500µl miRNA Wash Solution 2/3 und erneute Zentrifugation bei 10000rpm. Dieser zweite Waschgang wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde der Filter 1 Min. bei 10000 rpm trocken zentrifugiert und in ein frisches Tube gegeben. Abschließend wurden 65µl der auf 95° vorgeheizten Elution Solution

auf den Filter gegeben und 20-30 Sek. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss, in dem sich nun die RNA befand, wurde gesammelt und photometrisch hinsichtlich der Menge an RNA untersucht. Dafür wurden je 3µl der RNA mit 57µl Nuklease freiem H<sub>2</sub>O verdünnt, für die anschließende Messung wurde das Gemisch in die für das Photometer [BioPhotometer, Eppendorf] vorgesehenen Küvetten [UVette®, Eppendorf] pipettiert. Die isolierte RNA wurde entweder bei -80° eingefroren oder direkt weiter verwendet.

### **2.7.1.2 Umschreiben der miRNA in cDNA**

Es wurde das TaqMan® miRNA Reverse Transcription Kit [Applied Biosystems] und der TaqMan® miRNA Assay mit dem Primer RNU6B verwendet. RNU6B ist ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“ und wird als solches von fast allen Zellen gleichermaßen exprimiert, sodass es als Kontrollsonde eingesetzt wird. Im Bereich der mikroRNA-Forschung wird RNU6B als eine von mehreren möglichen internen Kontrollen häufig eingesetzt (Götte, M., 2010).

Es wurde zunächst 1µl der RNA mit 360µl Nuklease freiem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 2ng/µl vorverdünnt. Dann wurde ein Mastermix aus 0,15µl dNTP 100mM-Lösung, 1µl MultiScribe Reverse Transkriptase, 1,5µl 10xBuffer, 0,19µl RNase Inhibitor und 4,16µl Nuklease freiem H<sub>2</sub>O für jede Probe angesetzt, sodass ein Gesamtvolumen von 7µl entstand. Dieses wurde dann in ein 0,5ml PCR Reaktionsgefäß [Eppendorf] vorgelegt und 5µl der verdünnten RNA und 3µl des Primers RNU6B hinzugefügt. Es erfolgte eine kurze Zentrifugation und eine 5-minütige Inkubation auf Eis, dann wurde die Mischung mithilfe des Thermocyclers [T Personal, Biometra] in den folgenden Schritten in cDNA umgeschrieben:

- 30 Minuten bei 16°C
- 30 Minuten bei 42°C
- 5 Minuten bei 85°C

Die Proben konnten entweder bei -20° eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden.

### **2.7.1.3 Real Time PCR**

Das Prinzip der Real Time PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion. Zusätzlich können jedoch die DNA-Kopien bereits während der Messung in der exponentiellen Phase mittels einer Fluoreszenz-Messung quantifiziert werden. Es wurde die TaqMan® miRNA Assay Sonde RNU6B verwendet, wobei 1µl der Sonde mit 10µl TaqMan® 2xPCR Master Mix und 7,67µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O angesetzt wurde, sodass ein Gesamtvolumen von 18,67µl entstand. Dieser Mix wurde zusammen mit 1,33µl der jeweiligen cDNA-Probe in Doppelwerten in eine 96-Well-PCR Reaktionsplatte überführt, sodass das Gesamtvolumen nun 20µl betrug. Es wurde das für die jeweilige Sonde korrekte Programm im PCR-Gerät [7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems] eingestellt. Die Proben durchliefen dann 40 Zyklen, die sich jedoch von der herkömmlichen PCR unterscheiden, da jeder Zyklus aus 2 Schritten besteht: Zunächst die initiale Aktivierung bei 95° für 10 Min. und danach zyklisch die Denaturierung bei 95° für 15 Sek., und die Primerhybridisierung/Annealing und Elongation/Extending bei 60°C (1 Min.).

### **2.7.2 Quantitative Real-Time PCR**

Die 12Z-Zellen wurden nach der bekannten Methode kultiviert, in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit miR-142-3p transfiziert. Es sollte untersucht werden, inwiefern sich die Überexpression der miR-142-3p auf die Expression verschiedener Gene bei Endometriosezellen auswirkt. Es wurden folgende Schritte durchgeführt:

- RNA-Extraktion
- Reverse Transkription der mRNA in cDNA
- Durchführung der Real-Time-PCR

#### **2.7.2.1 RNA-Extraktion**

Um die PCR durchführen zu können, musste die RNA zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Dazu wurde das Medium abgenommen, und verworfen, 2

Mal mit PBS gewaschen und anschließend 400 µl Lysis-Puffer dazugegeben. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen vorsichtig mit umgekehrter Pipettenspitze vom Boden der 6-Well-Platte abgelöst und dann jeweils in 1 Eppendorf-Gefäß überführt. Im weiteren Verlauf wurde das InnuPREP® RNA Mini Kit [Analytikjena] verwendet. Zunächst wurde je 1 Filter D in ein „Receiver Tube“ gestellt, der Inhalt der Eppendorf-Gefäße auf die Filter gegeben und 2 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Ergebnis war, dass sich die RNA nun im „Receiver Tube“ befand, sodass Filter D verworfen werden konnte. Dann wurden 400 µl 70% Ethanol in das Receiver Tube gegeben, um die RNA zu fällen. Anschließend wurde je ein Filter R in ein neues Receiver Tube gestellt und der Inhalt des alten Receiver Tubes auf diesen neuen Filter gegeben. Nach einer erneuten 2-minütigen Zentrifugation bei 12000 rpm wurde dieser Filter in ein neues Receiver Tube überführt. Nach 2 Waschschrritten mit erst 500µl HS und anschließender 1-minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm und dann 750µl LS mit folgender 1-minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm konnte das Filtrat verworfen und der Filter in ein neues Receiver Tube gestellt werden. Es folgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm. Im folgenden Schritt wurde der Filter in ein Elution Tube gestellt. 30µl RNase-freies Wasser hinzugefügt und 1 Minute bei RT inkubiert, anschließend 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert.

### ***2.7.2.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA***

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit [Fermentas Life Science] verwendet. Zunächst wurden 1µg der RNA-Proben in ein 0,5ml PCR Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC-Wasser (NRA-frei) auf 10µl aufgefüllt. Dann wurde je 1µl Random Hexamer dazugegeben, sanft gemischt und anzentrifugiert, eine 5-minütige Erwärmung bei 65°C im Thermocycler RT1 [Biometra] folgte. Das Gesamtvolumen betrug nun 11µl. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt. Parallel dazu wurde für die Reverse Transkription ein Mastermix aus 4µl 5xReaction Buffer, 1µl RiboLock Ribonuclease Inhibitor (20U/µl), 2µl dNTP-mix (10mM) und 2µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) je Probe hergestellt. Nach Ende der

Inkubationszeit wurden je 9µl des Mastermix zu den Proben gegeben. Das Gesamtvolumen betrug nun 20µl.

Nun erfolgte eine Inkubation im Cycler RT2 nach dem folgenden Schema:

- 5 Minuten bei 25°C
- 60 Minuten bei 37°C
- 5 Minuten bei 70°C

Abschließend wurden die Eppendorf-Gefäße mit 80µl Nucleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 100µl aufgefüllt. Die Proben konnten entweder bei -20° eingefroren oder direkt weiter verarbeitet werden.

### **2.7.2.3 Durchführung der Real Time PCR**

Verwendet wurde ein herkömmliches PCR-Gerät sowie spezielle Sonden aus TaqMan® Gene Expression Assays [Applied Biosystems]. Als Kontrollsonde diente die 18S rRNA TaqMan®-Sonde (hs 99999901\_s1), ebenfalls ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“.

Folgende Sonden wurden untersucht:

- *Rac1* (hs 01902432 s1)
- *ROCK2* (hs 00153074 m1)
- *EGF* (hs 00153181 m1)
- *PGRMC2* (hs 01128672 m1)
- *ITGAV* (hs 00233808 m1)
- *KLF4* (hs 00358836 m1)
- *Notch1* (hs 00413187 m1)
- *MYL9* (hs 00697086 m1)
- *IL6ST* (hs 00174360 m1)
- *FLT1* (hs 01052936 m1)

Detailinformationen zur Lage der meist Exon-übergreifenden Sonden finden sich auf der Herstellerseite (Life Technologies Corporation, 2012).

Zu Beginn wurde gemäß der Anzahl der Sonden ein Ansatz aus 1,25µl der jeweiligen TaqMan®-Sonde, 12,5µl TaqMan® 2xPCR Master Mix und 8,75µl Nuklease freiem H<sub>2</sub>O hergestellt. Pipettiert wurden dann 22,5µl von diesem Mix und 2,5µl der jeweiligen Probe in Doppelwerten in eine 96-Well-PCR Reaktionsplatte. Das Gesamtvolumen betrug somit 25µl. Der Ablauf der Real Time PCR gleicht dem oben beschriebenen Ablauf.

## **2.8 Western Blot**

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse sollte die durch PCR gesehene veränderte Genexpression bei den mit miR-142-3p transfizierten Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dazu wurden die 12Z-Zellen kultiviert, in 6-Well-Platten ausgesät und mit der miR-142-3p transfiziert.

Folgender Primärantikörper (AK) wurde eingesetzt:

- Cdc25-AK

Es wurde ein Kontrollexperiment mit Tubulin durchgeführt, um die Quantität der Proteinmenge in den jeweiligen Proben unabhängig überprüfen zu können.

Dazu wurde der folgende Antikörper eingesetzt:

- Mouse-anti-human Tubulin AK [Sigma],  
1:4000 verdünnt

### **2.8.1 Proteinlyse und –quantifizierung**

Als erstes mussten die Proteine lysiert und quantifiziert werden. Dazu wurde das Medium verworfen und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Zunächst wurde ein Gemisch aus 50ml RIPA-Puffer (20mM Tris pH 7,4, 137mM NaCl, 1% Triton X-100 (V/V), 2mM EDTA), 10 µl Proteinase-Inhibitorcocktail, 10µl NaVO<sub>3</sub> (1mM)

[Sigma], 100µl NaF (10 mM) [Sigma] und 100µl β-Glycerolphosphat (10 mM) hergestellt. Von dieser Mischung wurden 200µl pro Well dazugegeben. Nun konnten mithilfe eines Cellscrapers die Zell-Lysate vom Boden der Wells abgelöst und in ein Eppendorf Tube pipettiert werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Dann wurden die Proben 20 Min. bei 4° und 1100 rpm im Thermo Mixer Comfort [Eppendorf] gemischt und anschließend 10 Min. bei 4° und 13000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellett wurde verworfen und der Überstand in ein neues Eppendorf Tube pipettiert. Das Protein-Lysat konnte direkt weiterverarbeitet oder bei -20° gelagert werden. Der Proteingehalt der Proben wurde in Bezug auf einen Blank-Wert (RIPA-Puffer ohne Protein) mithilfe des Pierce BCA™ Protein Assays [Thermo Scientific] in Doppelwerten bestimmt. Dazu wurde im Sinne einer 1:5-Verdünnung 20µl H<sub>2</sub>O in Doppelwerten in eine 96-Well-Platte vorgelegt und 5µl der Probe bzw. im Falle des Leerwertes des RIPA-Puffers dazu pipettiert. Anschließend wurden 200µl der BCA™ Protein Assay Reagenzien (Verhältnis: 6ml Lösung A und 100µl Lösung B) in die Wells gegeben, was zu einem grünen Farbumschlag führte. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit. Zu diesem Zeitpunkt konnte man makroskopisch bereits anhand des Farbumschlags zu Violett erkennen, welche Proben viel Protein enthielten. Im ELISA-Reader [Versamax microplate reader, Molecular Devices] erfolgte dann bei einer Wellenlänge von 562nm die photometrische Messung.

### **2.8.2 SDS-PAGE Elektrophorese**

Die SDS-PAGE Elektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wird durchgeführt, um Moleküle nach ihrer jeweiligen Größe, also ihrem Molekularem Gewicht in kDa, aufzutrennen. Die Moleküle durchlaufen ein mit einem elektrischen Gradienten versehenes Polyacrylamidgel. Durch das SDS sind die Teilchen negativ geladen, wandern Richtung Pluspol des Gels und müssen durch die Poren des Gels gelangen, was je nach Größe der Teilchen unterschiedlich gut gelingt.

Zunächst wurden mithilfe des BIORAD®-Systems [BioRad Laboratories] 12%ige Polyacrylamidgele gegossen, ein Trenngel und ein Sammelgel, die sich durch unterschiedliche Puffer unterscheiden. Für das Trenngel wurden 1,332ml 30% Acrylamid/Bis Solution (N,N'-methylene-bis-acrylamid) [BioRad Laboratories], 1,596ml Trenngelpuffer 2,5fach (1,875 M TrisCl pH 8,9 [Roth], 0,25% SDS pH 8,9 [Sigma]), 1,068ml ddH<sub>2</sub>O, 3,636µl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin) [BioRad Laboratories] und 36,38µl APS (Ammoniumpersulfat 0,1g/ml ddH<sub>2</sub>O) [BioRad Laboratories] gemischt und zwischen die Glasplatten gefüllt, bis diese ca. zu  $\frac{3}{4}$  gefüllt waren. Das Gel wurde mit gesättigtem 1-Butanol [Merck] überschichtet, bis die Apparatur fast voll war. Dies hatte einerseits den Zweck, die Polymerisation zu fördern, andererseits die Luft zu verdrängen, sodass eine glatte Oberfläche entstand. Das Gel wurde 30 Minuten stehen gelassen, um aushärten zu können, dann wurde das Butanol abgegossen, das Gel mit etwas Wasser gespült und die restliche Flüssigkeit mit einem Filterpapier aufgesaugt. Im nächsten Schritt wurde das Sammelgel aus 0,259ml Acrylamid, 0,31ml Sammelgelpuffer 5fach (0,3M TrisCl pH 6,7 [Roth], 0,5% SDS pH 6,7 [Sigma]), 0,93ml ddH<sub>2</sub>O, 1,875µl TEMED und 14,02µl APS hergestellt und ebenfalls zwischen die Glasplatten und somit auf das Trenngel gefüllt. Nun wurden die Kammern für die Proteinproben mit Hilfe eines speziellen Kammes [BioRad Laboratories] geformt, indem der Kamm ohne Luftblasen in das Gel gesteckt wurde. Nach einer weiteren 30-minütigen Aushärtephase wurde der Kamm entfernt, die Gelplatten in das Mini-PROTEAN® Tetra System [BioRad Laboratories] eingesetzt und das System mit 1-fach Laufpuffer (5fach Stammlösung: 0,5M TrisCl [Roth], 1,92M Glycin [Merck], 0,5% SDS [Sigma], pH 8,8) aufgefüllt. Die Proteinkonzentrationen wurden wie bereits erläutert mit dem BCA-Test berechnet und die Proben dann mit 1/5 ihres Volumens an 5fachem SDS-Additiv (1,25ml 1M Tris-Hcl, pH 6,7, 1ml Glycerol, 3ml 10% SDS, 1,5mg Bromphenolblau [Merck], 0,5ml β-Mercaptoethanol [Merck]) und mit 1/3 des Volumens von SDS-Additiv an β-Mercaptoethanol [Merck] gemischt. Das Mercaptoethanol bricht die Disulfidbrücken auf, das SDS-Additiv denaturiert die Proteine und ist für deren negative Ladung verantwortlich, das Bromphenolblau



färbt die Proben blau, sodass diese sichtbar werden. Das hergestellte Gemisch wurde 5 Min. lang bei 95° mit dem Block Heater [Stuart Scientific] erhitzt und dann kurz bei 13000 rpm an zentrifugiert. Die Platte wurde mit Laufpuffer aufgefüllt, der durch die beinhalteten Salze den Stromfluss fördert. Nun wurden je 20µl der Proben in die geformten Taschen pipettiert, in die erste Tasche wurden 3µl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder Markers [Fermentas] gefüllt, der neben den aufgetragenen Proben mitlief und als Marker diente. Nun schloss sich die Elektrophorese an, zunächst ca. 20 Min. bei 10mA (Proben durchlaufen das Sammelgel), dann ca.30 Min. bei 25mA (Proben durchlaufen das Trenngel).

### **2.8.3 Blotten**

Für das sogenannte Blotting wurde das Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell System [BioRad Laboratories] verwendet. Zunächst wurden Filter (Extra thick blot paper Protean® XL-Size extra thick blot paper) [BioRad Laboratories] und die Nitrozellulose-Membran (Amersham™ Hybond™ ECL Membran) [GE Healthcare] vorbereitet. Dafür wurde der Filter in Blottingpuffer (0,25M TrisCl, 1,92M Glycin, 20% Methanol, pH 8,4 [Merck]) 10 Minuten lang bei 4° eingeweicht, die Membran 2 Min. in ddH<sub>2</sub>O aktiviert und dann ebenfalls in dem Blottingpuffer 10 min. bei 4° eingeweicht. Anschließend wurde die Blotting-Apparatur vorbereitet, in dem zunächst der feuchte Filter und die feuchte Membran geschichtet, darauf das SDS-PAGE Gel gelegt und das Ganze mit einem weiteren feuchten Filter abgedeckt wurde. Dieses Konstrukt wurde zwischendurch immer wieder mit einer Rolle glattgestrichen, um die Luftblasen zu entfernen und das Fließen von Strom somit zu verhindern. Im nächsten Schritt wurde bei 16V 40 Min. geblottet, wobei die Bande vom Gel auf die Membran übertragen wurde. Anschließend wurde der Blot nach Entnahme der Membran aus dem System mithilfe von Ponceau-S solution [Sigma] getestet. Die Membran wurde dann mehrfach mit ddH<sub>2</sub>O gespült, somit entfärbt und anschließend für 1h mit Skim-Milk (2,5g Skim Milk Powder [Fluka®] in 100ml 1fach TBST (10fach TBS-Stocklösung: 10mM TrisHCl, 150mM NaCl [Applichem], pH 7,6; 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt mit 1ml Tween®20 [Sigma])) auf

dem Wippen blockiert. Die Skim-Milk blockiert die unspezifischen Proteine, sodass diese nicht sichtbar werden. Es folgten drei 5-minütige Waschschriffe mit TBST. Nun wurde der Primärantikörper (CDc25) im Sinne einer 1:1000-Verdünnung (0,5g BSA (Bovine Serum Albumin) [Sigma] in 10ml TBST und 10µl Antikörper) auf die Membran gegeben und mit Parafilm abgedeckt über Nacht bei 4° inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper verworfen und die Membran drei Mal 5 Min. mit TBST gewaschen. Dann wurde der Sekundärantikörper im Sinne einer 1:2000-Verdünnung mit Skim-Milk (10ml Skim-Milk und 5µl Antikörper) auf die Membran gegeben und 1h auf dem Wippen inkubiert.

Es wurde folgender Sekundärantikörper verwendet:

- Anti-Rabbit, POD-markiert [Calbiochem®]

Es folgten drei 5-minütige Waschschriffe mit TBST.

#### **2.8.4 Entwicklung der Membran**

Das Entwickeln der Membran erfolgte in der Dunkelkammer. Zunächst wurde die Hyperkassette™ [Amersham pharmacia biotech] mit einer Klarsichtfolie ausgelegt. Die Membran wurde nun in der Klarsichtfolie in der Hyperkassette fixiert und für 1 Min. mit dem Pierce® Enhanced Chemoluminescence (ECL) Western Blot Substrate behandelt (1:2 Mischung aus SuperSignal® Peroxid Solution und SuperSignal® Enhancer Solution), welches die Chemolumineszenz des Sekundärantikörpers durch die Peroxidaseaktivität aktiviert, sodass der Röntgenfilm geschwärzt werden kann. Es wurde ein Röntgenfilm (CL-XPosure™ Film 18x24 cm) [Thermo] entsprechend der Größe der Membran ausgeschnitten, auf die Membran gelegt und belichtet. Die Belichtungszeit richtete sich jeweils nach dem nachzuweisenden Protein. Daran schloss sich die Entwicklung durch Eintauchen der Membran in eine Entwicklerlösung [AGFA] für 20-30 Sek.an, es folgte ein kurzes Eintauchen in ddH<sub>2</sub>O, in 1%ige Essigsäure [Merck] und zum Schluss in eine Fixierlösung [AGFA]. Abschließend wurde der Film noch einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und

schließlich mit einem Haartrockner getrocknet. Der Film wurde beschriftet und konnte entweder bei  $-20^{\circ}$  eingefroren oder durch Strippen dem Nachweis eines weiteren Proteins zugeführt werden.

### **2.8.5 Strippen der Membran**

Die folgenden Schritte fanden auf dem Wippen statt. Zunächst wurde die Membran zwei Mal 5 Min. mit Strippinglösung (7,5g Glycin, 8,76g NaCl, 1l ddH<sub>2</sub>O, pH 2,5), anschließend für 20 Min. mit der Strippinglösung behandelt. Dies führt zu einer Denaturierung und somit zum Ablösen der an die Antigene gebundenen Antikörperkomplexe. Es folgten drei 5-minütige Waschschriffe mit TBST, dann eine 1-stündige Blockierung mit Skim-Milk bei Raumtemperatur. Erneut drei 5-minütige Waschschriffe mit TBST. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation des Primär-Antikörpers (Tubulin) im Sinne einer 1:4000-Verdünnung (2,5µl Antikörper auf 1000µl BSA und TBST (5g BSA in 10ml TBST)) über Nacht bei  $4^{\circ}$  auf dem Wippen. Es schloss sich das oben beschriebene Prozedere an, als Sekundär-Antikörper diente jedoch Anti-Mouse [Calbiochem®] in einer 1:10000-Verdünnung mit Skim-Milk.

## **2.9 Statistik**

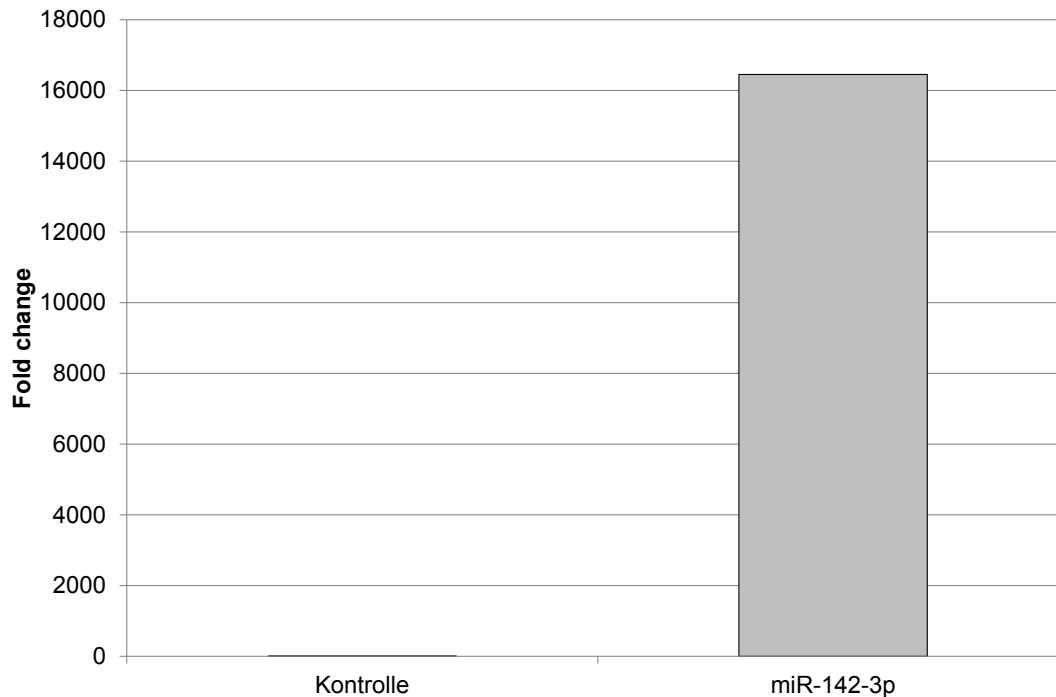
Die Statistische Analyse der MTT-Zellviabilitätsassays sowie der qPCR-Analysen erfolgte mit Hilfe des Student's t-test (zweiseitig, nicht gepaart) anhand von mindestens 3 unabhängigen Replikaten. Ein p-Wert  $<0,05$  zeigte hierbei eine statistische Signifikanz an.

### **3 Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit ist es, die mikroRNA miR-142-3p hinsichtlich ihrer Rolle bei der Pathogenese der Endometriose zu untersuchen. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der in den vorherigen Kapiteln erläuterten Experimente beschrieben.

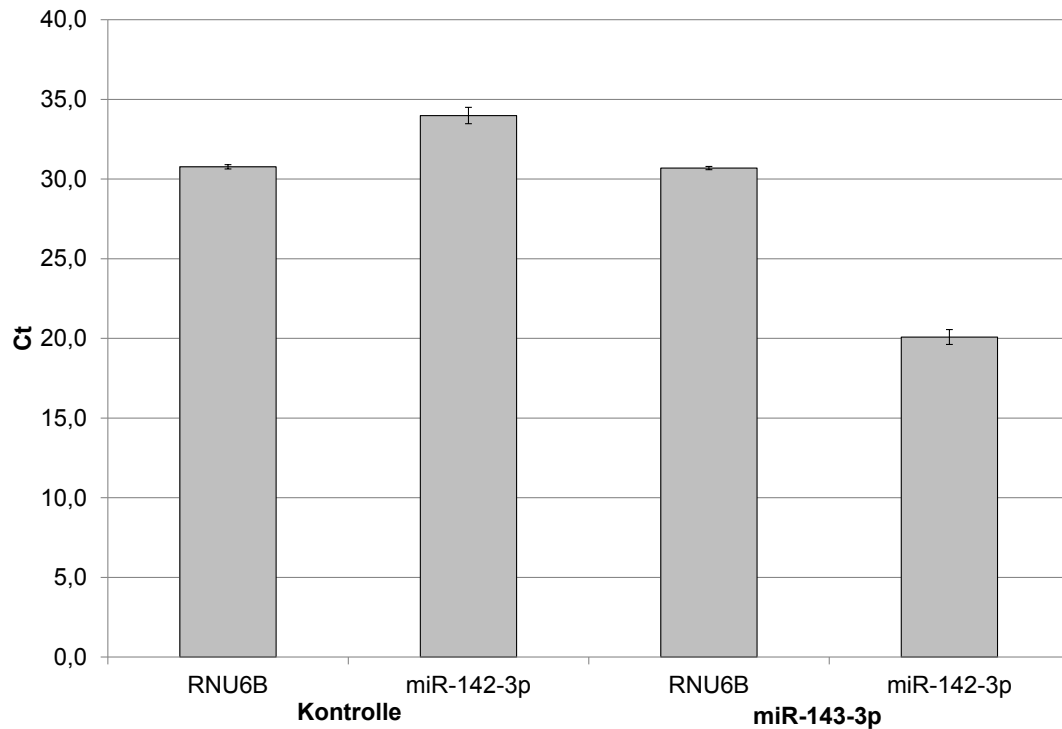
#### **3.1 Nachweis der miRNA-Überexpression**

Die im Material- und Methodenteil beschriebenen funktionellen Tests basieren alle auf einem Vergleich von miR-142-3p überexprimierenden 12Z-Zellen mit als Kontrolle dienenden nicht-transfizierten 12Z-Zellen. Dazu wurde zunächst die miRNA der transfizierten Zellen und die der Kontroll-Zellen isoliert, in einem nächsten Schritt in cDNA umgeschrieben und schließlich mittels quantitativer mikro Real-Time-PCR analysiert. Dieser Versuch wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Der Fold change beschreibt die Größendifferenz eines zweiten Wertes als Multiplum eines ersten (Kontroll)-Wertes. Die folgende Abbildung zeigt den Erfolg der Überexpression der miR-142-3p in den transfizierten Zellen.



**Abbildung 3: Nachweis der Überexpression von miR-142-3p nach erfolgreicher Transfektion von mikroRNA-Vorstufen in 12Z-Zellen**

Für die folgende Abbildung wurden die  $\Delta$ Ct-Werte errechnet und zu der Expression der kleinen RNA RNU6B (ein housekeeping gene, das als solches in fast allen Zellen exprimiert ist) in Bezug gesetzt. Ct steht für „threshold cycle“, also Schwellenwert-Zyklus, und beschreibt den Beginn des Zyklus, in dem zum ersten Mal eine exponentielle Genamplifikation stattfindet (Livaka, KJ. et al., 2001). Der  $\Delta$ Ct-Wert entsteht durch Subtraktion des Ct-Wertes des Housekeeping-Gens vom Ct-Wert der mit miR-142-3p transfizierten Zellen.



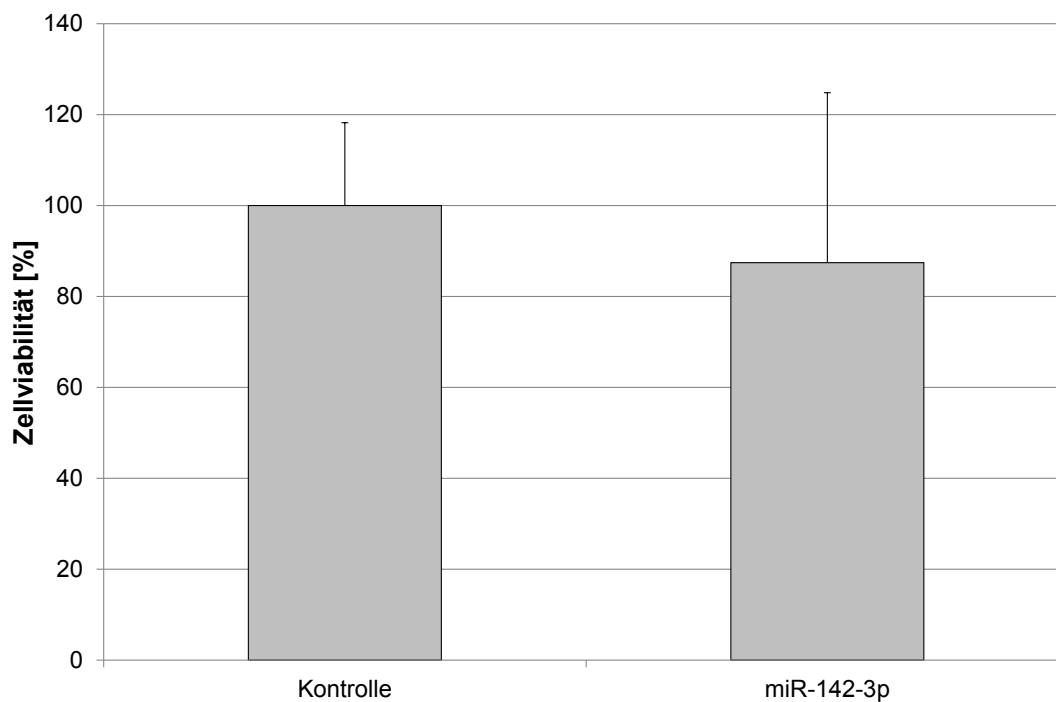
**Abbildung 4:** mRNA-Ct, Expression der miR-142-3p bezogen auf das Housekeeping-Gen RNU6B, quantifiziert mittels real-time-PCR. Ein niedriger Ct-Wert entspricht einer höheren Expression.

### 3.2 Auswirkungen der Transfektion von miR-142-3p auf das Zellverhalten von 12Z-Endometriosezellen

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, wie sich die Transfektion mit miR-142-3p auf das Zellverhalten der 12Z-Endometriosezellen auswirkt. Dafür wurden funktionelle Assays durchgeführt und die transfizierten Zellen hinsichtlich ihrer Proliferations- und Invasionstendenz mit den als Kontrolle dienenden nicht-transfizierten Zellen verglichen.

### 3.2.1 Zellviabilität

Wie im Material- und Methodenteil beschrieben wurden die transfizierten Zellen in einer seriellen Verdünnung ausgesät und nach einer Adhäsionszeit von 72 Std mit der MTT-Farbreagenz inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Std erfolgte die Auswertung mittels ELISA-Reader. Das Experiment erfolgte in Dreifachwerten, deren Mittelwert in Bezug auf den Leerwert analysiert wurde.



**Abbildung 5: Zellviabilitätsassay; Relative Anzahl der 12Z-Endometriosezellen nach Transfektion mit miR-142-3p unter Einsatz von 10000 Zellen/100 $\mu$ l; gemessen nach einer Kultivierungsdauer von 72h**

Die Grafik (Abb. 5) stellt den Mittelwert der Ergebnisse in Bezug auf den relativen Mittelwert der Kontrolle (auf 100% gesetzt) dar.

Wie die Abbildung zeigt, ist das Proliferationsverhalten der Zellen nach der Transfektion mit miR-142-3p herabgesetzt, es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Es fand sich eine gemittelte

Proliferationsrate der transfizierten Zellen von 87,4% ( $p= 0,38$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle (100%).

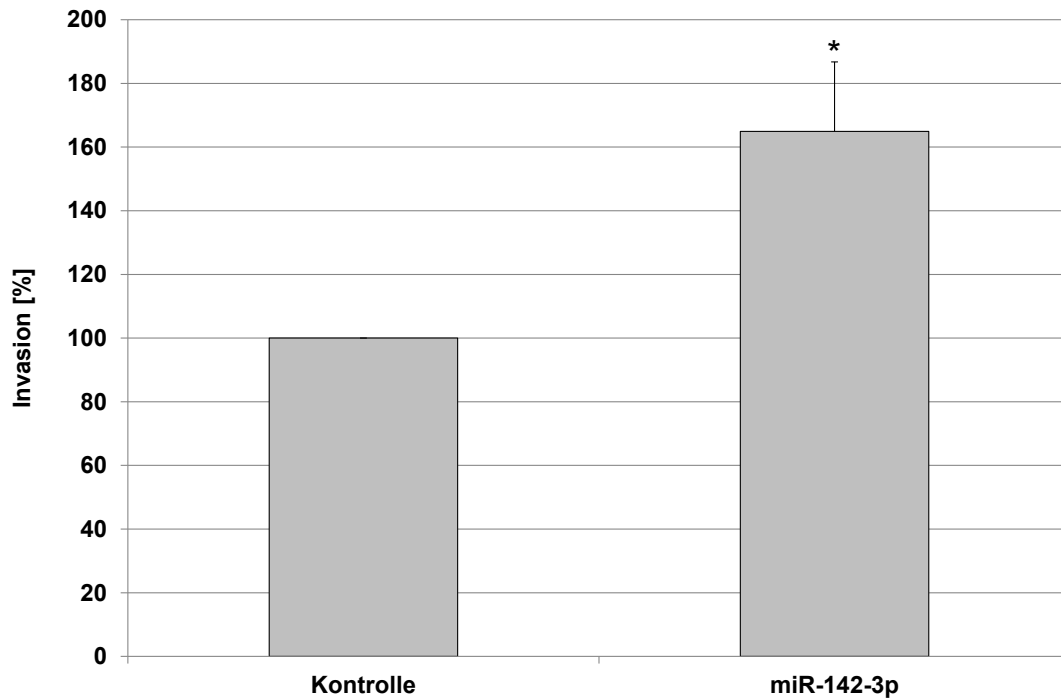
### **3.2.2 Invasivität**

Mithilfe des Invasionsassays wurde untersucht, inwiefern sich die Transfektion der 12Z-Endometriosezellen mit miR-142-3p im Vergleich zur Negativkontrolle auf deren Invasionsverhalten auswirkt. Verwendet wurden Bio Coat®Matrigel®Invasion Chambers, auf deren Membranoberseite die Zellen in der gewünschten Zellzahl aufgetragen wurde. Eine chemotaktische Substanz an der Unterseite der Filter bedingte die Durchwanderung der Zellen durch den Filter. Die Zellen wurden angefärbt, auf einem Objektträger fixiert und konnten dann mikroskopisch untersucht werden. Die Auswertung erfolgte dann mithilfe einer speziellen Software [Zeiss Axiovision]; pro Filter wurden zwei Aufnahmen (50fache Vergrößerung) erzeugt und der Mittelwert für jeden einzelnen Filter gebildet. Die Fallzahl betrug jeweils  $n=10$ .

Aus den verschiedenen Versuchen wurden Mittelwerte errechnet. Die relative Veränderung der Invasivität [%] ist in Abb. 6 in Bezug auf die Negativkontrolle (=100%) dargestellt.

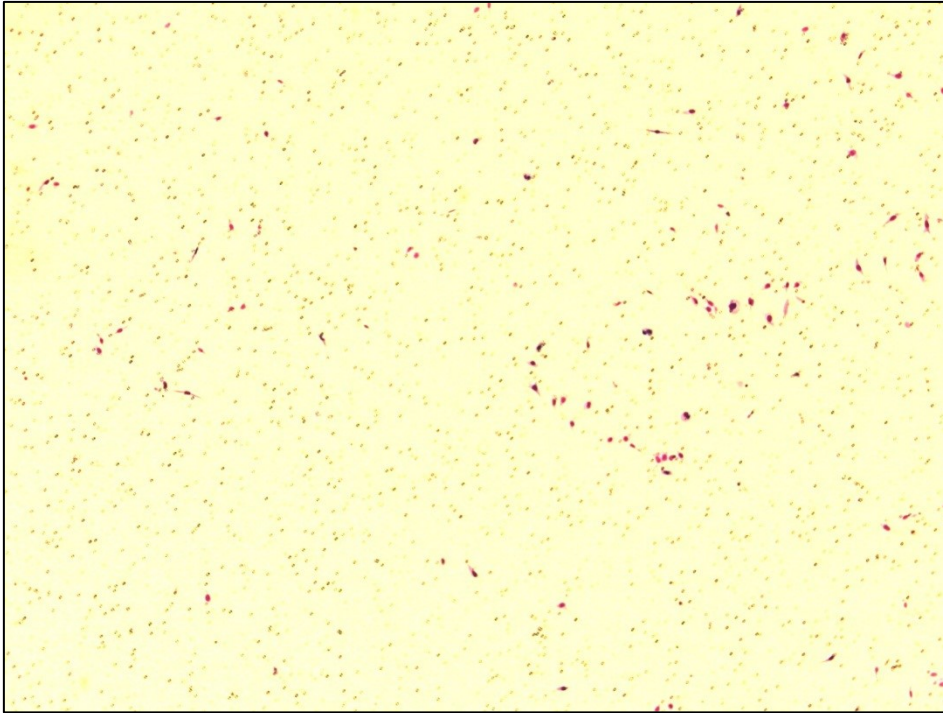
Es zeigt sich ein um mehr als das 1,5-fache (164,91%) signifikant gesteigertes Invasionsverhalten bei den mit miR-142-3p transfizierten Zellen ( $p<0,05$ ).



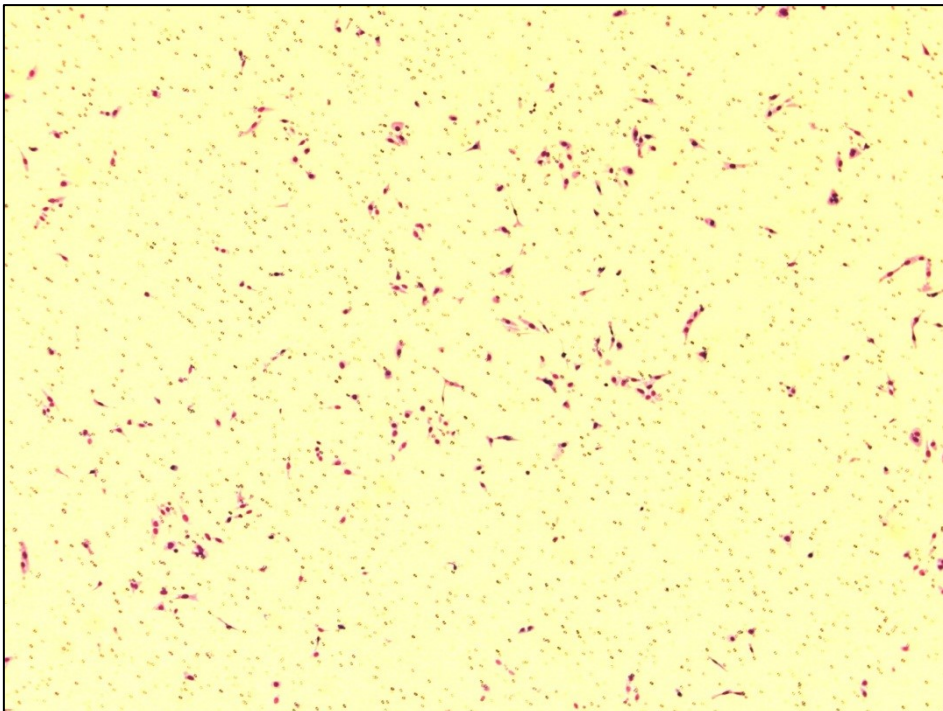


**Abbildung 6: Invasionsassay; Relative Anzahl der invasiven 12Z-Endometriosezellen nach Transfektion mit miR-142-3p unter Einsatz von 25000 Zellen/500µl pro Filter; gemessen nach einer Adhäsionszeit von 24h und einer Invasionszeit von 26h; \*,  $P < 0,05$**

Nachfolgend sind die Ergebnisse exemplarisch durch repräsentative Abbildungen der verschiedenen Filter dargestellt. Die invasiven Zellen sind lila angefärbt, die Poren des Filters sind z.T. als deutlich kleinere schwarze Punkte im Bild auszumachen.



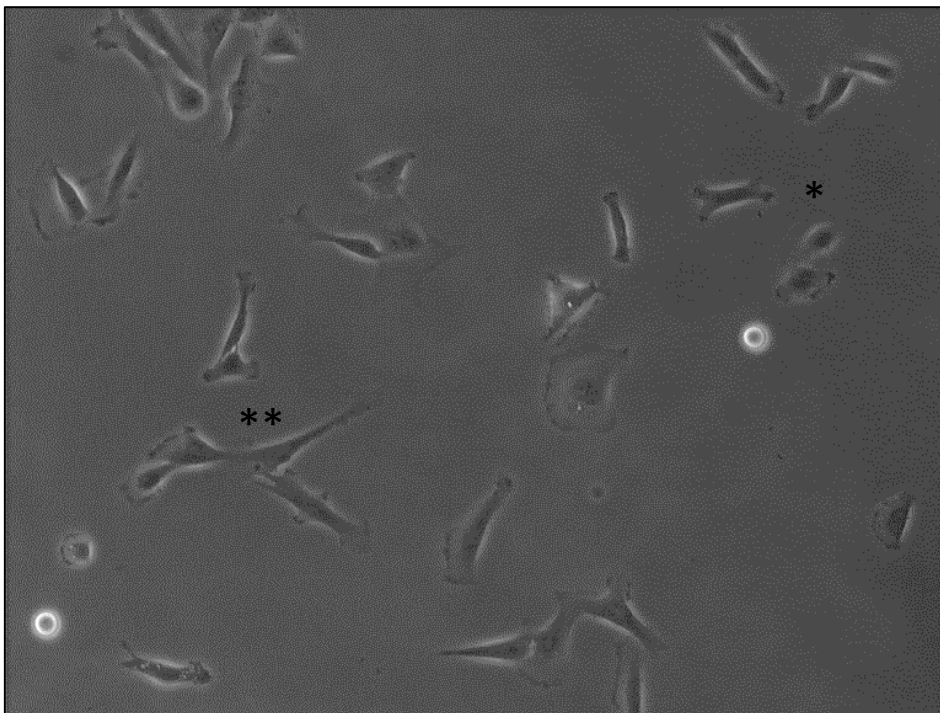
**Abbildung 7:** *Invasionsassay mit 12Z-Endometriosezellen nach Transfektion mit der Negativkontrolle (50fache Vergrößerung)*



**Abbildung 8:** *Invasionsassay mit 12Z-Endometriosezellen nach Transfektion mit miR-142-3p (50fache Vergrößerung)*

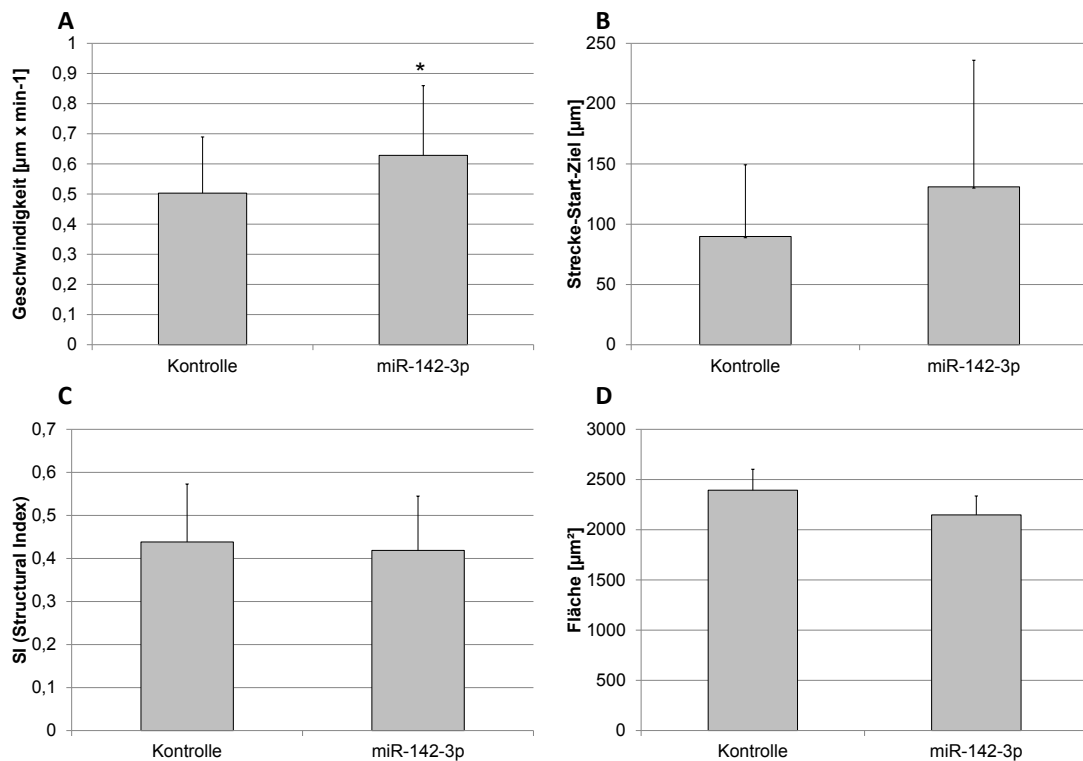
### 3.2.3 Videomikroskopie

Anhand der Videomikroskopie wurde untersucht, ob sich die Transfektion der 12Z-Zellen mit miR-142-3p auf die Geschwindigkeit der Zellen, auf die von ihnen zurückgelegte Strecke, auf ihren Strukturindex und auf ihre Fläche auswirkt. Die Ergebnisse wurden mit nicht-transfizierten Kontrollzellen verglichen. Dafür wurden die 12Z-Endometriosezellen nach der Transfektion (Kontrollzellen wurden nicht transfiziert) in mit Fibronektin bestrichene Flaschen gesetzt, ihr Migrationsverhalten 12h in beheizten Kammern unter invertierten Mikroskopen beobachtet und alle 10 Minuten als Foto festgehalten. Die Auswertung beinhaltet nur Zellen, die das Bild nicht verließen, sich nicht teilten und nicht mit anderen Zellen kollidierten; zudem wurden Mittelwerte innerhalb der 4 Kategorien berechnet und in den Grafiken dargestellt.



**Abbildung 9: Aufnahme der Videomikroskopie. Die Zellen stellen sich rund (\*;  $SI=1$ ) oder verzweigt (\*\*;  $SI=0$ ) dar.**

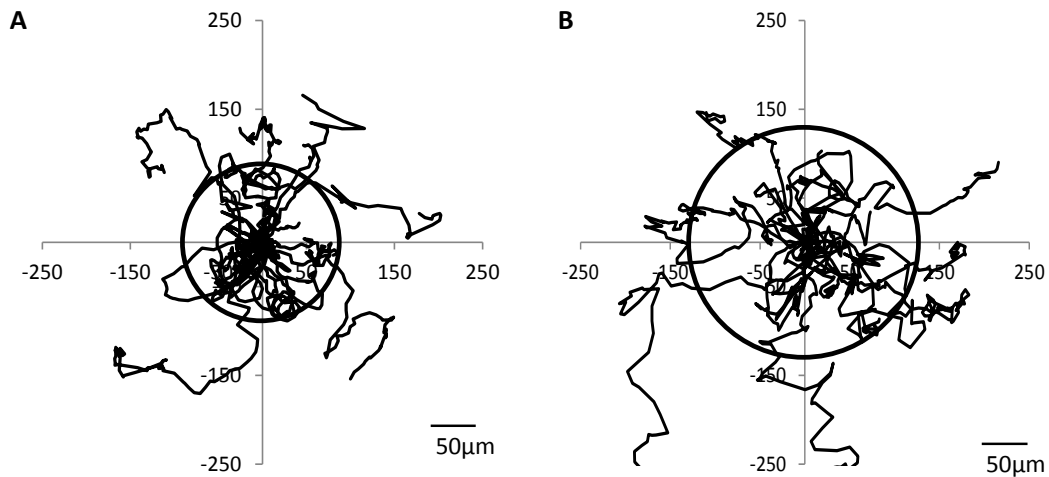
Die Auswertung der Videomikroskopie zeigt eine signifikant gesteigerte Geschwindigkeit bei den transfizierten Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle (0,63 [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ] vs. 0,50 [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ],  $p= 0,03$ ).



**Abbildung 10: A Videomikroskopie-Geschwindigkeit; B Strecke Start-Ziel; C Structural Index; D Fläche - \*,  $P < 0,05$**

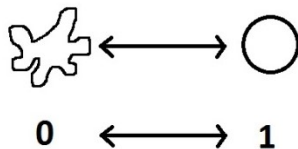
Bezüglich der zurückgelegten Strecke (gemessen an Start-Ziel-Strecke) ist eine deutlich weitere Strecke bei den transfizierten als bei den nicht-transfizierten Zellen festzustellen (130,99[ $\mu\text{m}$ ] vs. 89,83[ $\mu\text{m}$ ],  $p=0,057$ ).

Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht den annähernd signifikanten Unterschied bezüglich der von den Zellen zurückgelegten Strecke. Das Diagramm bildet die tatsächlich zurückgelegten Wegstrecken ab und stellt so auch Wegpunkte dar, die nicht auf der direkten Verbindung zwischen Start- und Zielpunkt liegen.



**Abbildung 11: Spinnendiagramm; Darstellung der tatsächlich zurückgelegten Wegstrecken; A Kontrolle; B miR-142-3p**

Wie bereits erläutert beschreibt der Strukturindex (SI) die Form der Zelle. So weist eine annähernd runde Zellform einen SI von 1 auf, während eine verzweigte Zelle durch einen SI von 0 dargestellt wird. Dies soll durch die folgende Abbildung verdeutlicht werden.



**Abbildung 12: Strukturindex; 0=verzweigt, 1=rund**

Die Zellen weisen unabhängig davon, ob sie mit der miR-142-3p transfiziert wurden oder nicht, einen sehr ähnlichen Strukturindex auf (0,42 vs. 0,44,  $p=0,58$ ).

Auch bezüglich der Fläche von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen ist kein signifikanter Unterschied festzustellen, so ist die Fläche der transfizierten

Zellen nur geringfügig kleiner als die der nicht-transfizierten Zellen (2393,85[ $\mu\text{m}^2$ ] vs. 2147,88[ $\mu\text{m}^2$ ],  $p=0,4$ ).

### 3.3 Untersuchung der Zielgene (mRNA-PCRs)

Die 12Z-Endometriosezellen wurden transfiziert, die RNA präpariert und in cDNA umgeschrieben. Diese konnte dann, basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen Real-Time-PCR, auf Zielgene untersucht werden. Das Experiment wurde ebenfalls im Vergleich zur Negativkontrolle (also mit nicht-transfizierten Zellen) durchgeführt, um zu erforschen, ob die Transfektion der Zellen mit miR-142-3p die Expression von Zielgenen verändert, welche mit dem Phänotyp der veränderten Motilität in Zusammenhang stehen könnten. Welche Zielgene potentiell durch die miR-142-3p reguliert werden, ergab sich u.a. aus der Analyse der DIANA-Datenbank (=miRGen) (Megraw, M. et al., 2007). Dabei dienen Algorithmen wie z.B. PicTar, TargetScanS oder miRanda der Identifizierung der potentiellen Zielgene (=predicted targets) (Betel & al., 2008).

Die nachfolgende Tabelle 4 beinhaltet einerseits Beschreibung und Funktion der verschiedenen predicted targets, andererseits den zugehörigen Algorithmus. Die Informationen basieren auf Angaben der DIANA/miRGen und microRNA.org-Datenbanken (Betel & al., 2008) (Megraw, M. et al., 2007).

**Tabelle 4: Beschreibung der Zielgene.** (Megraw, M. et al., 2007), (Lai, EC., 2004), (Yamamura, K. et al., 2007)

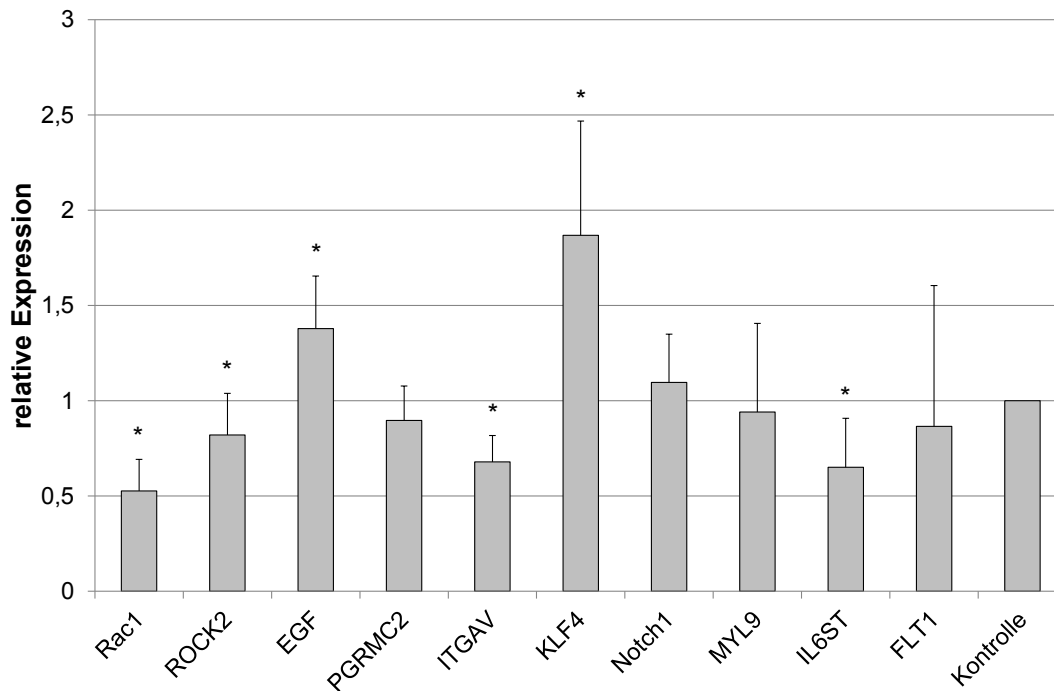
Zielgen	Beschreibung	Funktion	Algorithmus
Rac 1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 precursor (p21-Rac1) (Ras- like protein TC25). [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:P63000]	Rac 1 ist eine kleine (ca.21kDa) zytoskelett-modulierende GTPase und gehört zu der Subfamilie der Rho-GTPasen.  Funktionen: Regulation von  -Zell-Zyklus  -Zell-Zell-Adhäsion  -Zell-Motilität (durch Aktin-Filament-Polymerisation)	PicTar (4,5-Way)  TargetScanS

		<p>-Migration und Proliferation von epithelialen Zellen</p> <p>-Lamellopodien-Biogenese</p>	
<b>ROCK 2</b>	<p>Rho-associated protein kinase 2 (EC 2.7.11.1) (Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 2) (p164 ROCK-2) (Rho kinase 2). [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:O7511]</p>	<p>= intrazelluläre Serin-/Threonin-Kinase</p> <p>-Aktiviert durch RhoA GTPasen</p> <p>-Modulatoren des Zytoskeletts und der Zellmotilität</p>	<p>PicTar (4,5-Way)</p> <p>TargetScanS</p>
<b>EGF</b>	<p>Pro-epidermal growth factor precursor (EGF) [Contains: Epidermal growth factor (Urogastrone)]. [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:P01133]</p>	<p>=Wachstumsfaktor, Signalmolekül bei der Einleitung der Mitose.</p> <p>Funktion über Bindung an EGFRs (Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren):</p> <p>-Aktivierung von MAP-Kinasen</p> <p>-Regulierung von Peptidyl-Tyrosin-Phosphorylierung</p> <p>-Regulation der Zell-Proliferation</p> <p>-DNA-Replikation</p>	<p>miRanda (microrna.org)</p>
<b>PGRMC2</b>	<p>Membrane-associated progesterone receptor component 2 (Progesterone membrane-binding protein) (Steroid receptor protein DG6). [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:O15173]</p>	<p>=Progesteron-Rezeptor (membranassoziiert)</p>	<p>miRanda (microrna.org)</p>
<b>KLF4</b>	<p>Krüppel-like factor 4 (Epithelial zinc-finger protein EZF) (Gut-enriched krueppel-like factor). [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:O43474]</p>	<p>=Pluripotenzfaktor, ein für die Stammzellfunktion wichtiger Transkriptionsfaktor</p>	<p>PicTar (4-Way)</p>
<b>Notch 1 *</b>		<p>= Transmembran-Rezeptor, reguliert lokale Zell-Zell-</p>	<p>Nicht bekannt</p>

		Kommunikation und Signalkaskaden; u.a. durch Interaktion mit IL6ST	
<b>MyI 9</b>	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform (Myosin RLC) (Myosin regulatory light chain 9) (LC20). [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:P24844]	=strukturelle Komponente des Muskels.  Reguliert Muskelkontraktion durch ATPase-modulierende Aktivität	miRanda (microrna.org)
<b>IL6ST</b>	Interleukin-6 receptor beta chain precursor (IL-6R-beta) (Interleukin 6 signal transducer) (Membrane glycoprotein 130) (gp130) (Oncostatin M receptor) (CD130 antigen) (CDw130). [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:P40189]	=Transmembranprotein, ist als solches ein Cytokin-Rezeptor  -Funktioniert als  Entzündungsmodulator	PicTar (4,5-Way)  TargetScanS
<b>Flt1</b>	Vascular endothelial growth factor receptor 1 precursor (EC 2.7.10.1) (VEGFR-1) (Vascular permeability factor receptor) (Tyrosine-protein kinase receptor FLT) (Flt-1) (Tyrosine-protein kinase FRT) (Fms-like tyrosine kinase 1). [Source:Uniprot/SWISS PROT;Acc:P17948]	=Tyrosin-Protein-Kinase,  Kontrolliert Zell-Proliferation und -Differenzierung	miRanda (microrna.org)

Das unten stehende Diagramm zeigt die Ergebnisse der Real-Time-PCR in Form eines Balkendiagrammes. Dargestellt sind die jeweiligen relativen Expressionen der verschiedenen Zielgene.





**Abbildung 13: Expression der Zielgene. Gezeigt ist der Expressionsunterschied von miR-142-3p-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. N≥3, \*, P<0,05**

Bei der Analyse der Ergebnisse der Real-Time-PCR zeigte sich bei mehreren Zielgenen ein Unterschied in der Expression im Vergleich zu den Zellen, bei denen die miR-142-3p durch Transfektion überexprimiert war. So zeigt sich z.B. bei *Rac1* eine signifikant verminderte Regulation bei den transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (fold change=0,53, p= 0,00093), ebenso bei *ROCK2* (fold change= 0,82, p= 0,009). Auch der Zelladhäsionsrezeptor *ITGAV* ist verglichen mit den nicht-transfizierten Zellen herunterreguliert (fold change= 0,68, p= 0,002), ebenso der Entzündungsmodulator *IL6ST* (fold change=0,65, p= 0,002). Der Wachstumsfaktor *EGF* weist im Vergleich zu den Kontrollzellen dagegen eine gesteigerte Expression bei den transfizierten Zellen auf (fold change=1,38, p= 0,02), so auch *KLF4*, welches ein bedeutsamer Transkriptionsfaktor für die Stammzellfunktion ist (fold change=1,87, p= 0,001). Die ebenfalls untersuchten Zielgene *PGRNC2* (fold change=0,9, p=0,22), *MYL9* (fold change=0,94, p=0,77) und *FLT1* (fold change=0,87, p=0,58) zeigen eine nicht signifikante Herunterregulation bei den transfizierten Zellen, *Notch1* ist im

Vergleich zu den Kontrollzellen etwas stärker exprimiert, dies ist jedoch ebenfalls nicht signifikant (fold change=1,1, p=0,39).

### 3.4 Western Blot

Mithilfe des Westernblots sollten die auf der Transfektion basierenden Veränderungen, die auf Genebene in den PCRs herausgefunden wurden, auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dazu wurden die 12Z-Endometriosezellen mit miR-142-3p bzw. einer Negativkontroll-miRNA transfiziert und Proteinlysate gewonnen, die dann mittels SDS-PAGE Elektrophorese durch ein elektrisch geladenes Polyacrylamidgel nach der jeweiligen Größe der Moleküle aufgetrennt wurden. Anschließend wurden sie auf eine Nitrozellulose Membran [Amersham™ Hybond™ ECL Membran] übertragen. Dann wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper Cdc25c und dem Kontroll-Antikörper Mouse-anti-human Tubulin AK [Sigma] inkubiert und die entstandenen Banden auf einen Röntgenfilm transferiert.

Die folgende Abbildung zeigt, dass sich die auf Genebene nachgewiesenen Unterschiede zwischen transfizierten und nicht-transfizierten 12Z-Endometriosezellen nicht auf Proteinebene nachweisen lassen. Die Banden auf dem Röntgenfilm zeigen keinen Unterschied. Tubulin ist ein sogenanntes „housekeeping protein“ und dient somit in diesem Experiment als Referenz.

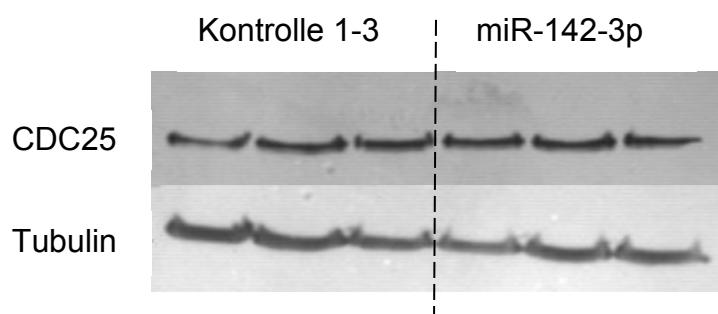


Abbildung 14: *Western-Blot-Analyse der Expression von CDC25 auf Proteinebene*

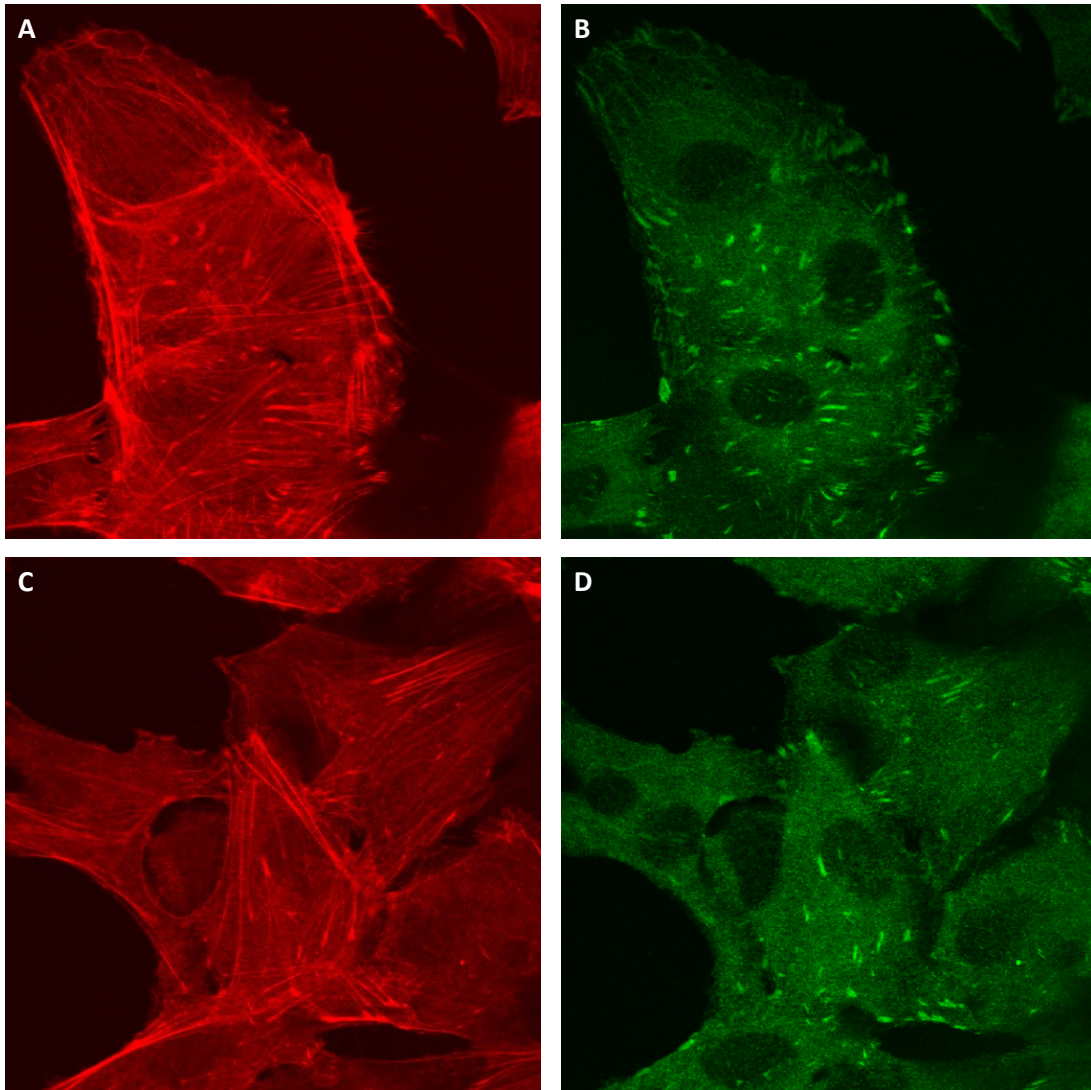
### 3.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Überprüfung möglicher durch die miR-142-3p induzierter morphologischer Veränderungen des Zytoskeletts wurden mit Kontrolle- bzw. miR-142-3p transfizierte Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet. Hierzu erfolgte eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mithilfe des Aktin-bindenden Proteins Phalloidin, welches mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff [Alexa Fluor®568] gekoppelt vorlag.

Fokale Adhäsionen wurden mittels eines Vinculin-Antikörpers dargestellt, welcher über einen mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff [Alexa Fluor® 488] gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde.

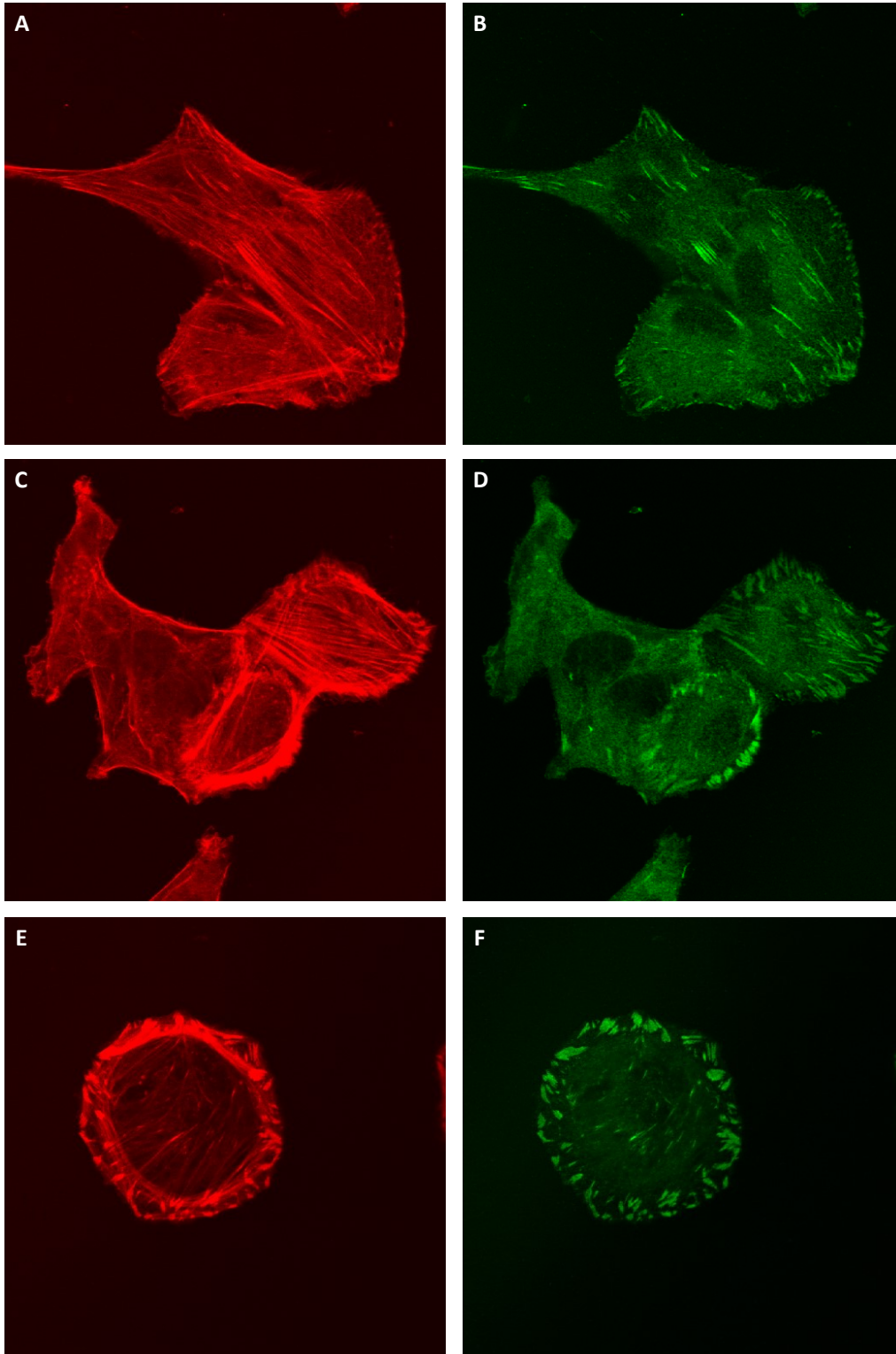
Die Zellen wurden entweder auf einem Fibronectin- oder einem Laminin-Substrat ausgesät, wobei Fibronectin eher für eine interstitielle, Laminin eher für eine Basalmembran-ähnliche Matrix repräsentativ ist.

Eine Untersuchung mittels konfokaler Lasermikroskopie ergab, dass alle Zellen in der Lage waren, fokale Kontakte und Aktin-Stressfasern auszubilden (Abb. 15/16). Insgesamt zeigten alle Versuchsansätze eine starke Heterogenität in der Ausbildung zytoskelettaler Strukturen. Auf dem Fibronectin-Substrat ließ sich kein klarer Unterschied in der Ausbildung fokaler Kontakte und Aktin-Stressfasern zwischen Kontroll- und miR-142-3p-transfizierten Zellen ausmachen (Abb. 15).



**Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung des Zytoskeletts auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen. A Kontrolle Actin; B Kontrolle Vinculin; C miR-142-3p Actin; D miR-142-3p Vinculin**

Im Falle der Laminin-Matrix war in den miR-142-3p-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine Tendenz zur Verlagerung der fokalen Kontakte in die Zellperipherie zu beobachten (Abb. 16). Hierbei ist diese Beobachtung aufgrund der Heterogenität der zytoskelettalen Morphologie als rein qualitativer Trend anzusehen.



**Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung des Zytoskeletts auf Laminin-beschichteten Deckgläschen. A Kontrolle Actin; B Kontrolle Vinculin; C miR-142-3p Actin; D miR-142-3p Vinculin; E miR-142-3p Actin (runde Zelle); F miR-142-3p Vinculin (runde Zelle)**

## **4 Diskussion**

### **4.1 Studien zur miR-142-3p**

Das Konzept, dass die Fehlregulation von mikroRNAs bei der Pathogenese der Endometriose eine Rolle spielt, ist nach dem jetzigen Stand der Forschung weitgehend akzeptiert und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit weiter bestätigt. Wir haben in einem in-vitro-System die erfolgreiche Transfektion einer immortalisierten Endometriose-Zelllinie mit der mikroRNA miR-142-3p mittels Real-Time-PCR nachgewiesen. Dabei wurden Veränderungen im Zellverhalten der transfizierten Zellen festgestellt. So zeigte sich unter anderem eine gesteigerte Invasivität und Zellmotilität bei den mit miR-142-3p transfizierten Zellen. Die Beobachtung, dass mikroRNAs die Motilität von Endometriosezellen beeinflussen können, wird durch die Erkenntnis von Adamek et al. unterstützt, die ebenfalls ein invasives Verhalten von 12Z-Zellen, beeinflusst durch die Expression der mikroRNA miR-145, beschreiben (Adamek & al., 2013). Die nachgewiesene gesteigerte Invasivität und erhöhte Zellmotilität bei den mit miR-142-3p transfizierten Zellen stützen die Pathogenese-Theorien der Endometriose. So begünstigt die gesteigerte Bereitschaft zur Invasion derjenigen Zellen, die eine Überexpression der miR-142-3p aufweisen, bei Endometriose-Patientinnen die vermehrte Einnistung von Endometrium an ektopen Orten. Auch die nachgewiesene erhöhte Zellmotilität bei den transfizierten Zellen passt zu der Pathogenese der Krankheit. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die transfizierten Zellen durch die erhöhte Zellmotilität ein größeres Bestreben zur Absiedelung zeigen. Interessant wäre es weiter zu untersuchen, ob es einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Expression der miR-142-3p und der Zellmotilität gibt.

Im Rahmen unserer Forschungsarbeit haben wir neue Erkenntnisse bezüglich der Endometrioseforschung gewonnen. So haben wir beispielsweise mehrere Zielgene der miR-142-3p identifiziert. Dabei handelt es sich vorrangig um Gene, die maßgeblich am veränderten Zellverhalten der transfizierten Zellen beteiligt

sind. In unseren Studien konnten wir weltweit zum ersten Mal beweisen, dass die besagten vorhergesagten Gene (predicted targets) durch die mikroRNA miR-142-3p in Endometriosezellen reguliert werden. Viele dieser Gene sind für die Zellbeweglichkeit von entscheidender Bedeutung. So auch *Rac1*, welches bereits 2011 als Zielgen der miR-142-3p beschrieben wurde (Wu, L. et al., 2011). *Rac1* ist als zytoskelettmodulierende GTPase maßgeblich an zellulären Prozessen beteiligt. Diese umfassen den Zellzyklus, Zell-Zell-Adhäsion, zelluläre Motilität und epitheliale Differenzierung. Auch wir konnten zeigen, dass *Rac1* bei den transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant herunterreguliert war und die miR-142-3p somit als Negativregulator von *Rac1* bezeichnet werden kann. Kontrollexperimente unserer Arbeitsgruppe an 12Z-Zellen und weiteren Zellsystemen zeigten jedoch, dass das *Rac1*-Protein eine sehr hohe Stabilität bzw. eine sehr geringe Abbaurrate aufweist, so dass sich die durch miR-142-3p vermittelte Regulation auf mRNA-Ebene innerhalb des Zeitfensters unserer Versuche nicht auf der Proteinebene auswirkte. Somit lässt sich die in vitro beobachtete veränderte Motilität miRNA-transfizierter Zellen nicht primär auf die Regulation von *Rac1* zurückzuführen. In vivo könnte sich diese Regulation jedoch möglicherweise bei Patientinnen, die eine längerfristige Fehlregulation der miR-142-3p aufweisen, auch auf Proteinebene auswirken, wenn das *Rac1*-Protein schließlich seinem natürlichen „Turnover“ unterliegt.

Im Gegensatz dazu beeinflusst auch die Serin-/Threonin-Kinase *ROCK2* die Zellmotilität und wird durch Überexpression der miR-142-3p signifikant herunterreguliert. Pharmakologische Inhibitorstudien haben in einer Vielzahl von Zellsystemen einen Migrations-steigernden Effekt der Hemmung von *ROCK2* zeigen können, der unter anderem auf eine verstärkte *Rac1*-Aktivierung zurückzuführen war. Es wurde ebenfalls eine gesteigerte Invasion durch eine Inhibition von *ROCK* beobachtet. (Salhia, B. et al., 2005) (Breyer & al., 2011).

Der Wachstumsfaktor *EGF* ist in bedeutendem Maße an der Mitoseeinleitung beteiligt. In unseren Studien zeigte sich eine gesteigerte *EGF*-Expression bei den transfizierten Zellen. Über eine Bindung an den *EGF*-Rezeptor (EGFR)

reguliert *EGF* Zellproliferation und DNA-Replikation. Dies resultiert in der Theorie, dass eine gesteigerte *EGF*-Expression zu einer vermehrten DNA-Replikation führt, was wiederum die Metaplasietheorie bestärkt: So könnte man vermuten, dass die intensivierete Replikation die Transformation von pluripotentem Zölomepithel in Endometriumgewebe begünstigt. Des Weiteren könnte man annehmen, dass die verstärkte Gewebeproliferation zu einer gesteigerten Abstoßungsbereitschaft und somit zur Verschleppung des Gewebes an Orte außerhalb der Gebärmutter führt. Trotz erhöhter *EGF*-Expression wurde in unseren Experimenten eine verminderte Zellproliferation miR-142-3p-exprimierender Zellen beobachtet, was möglicherweise auf die miRNA-abhängige Regulation weiterer Proliferations-regulierender Faktoren hindeutet. Hierbei könnte beispielsweise die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene negative Regulation des IL-6-Rezeptors *IL6ST* eine Rolle spielen. Sun et al. (Sun, Y. et al., 2011) konnten einen Zusammenhang zwischen miR-142-3p und der IL-6 Signaltransduktion herstellen, indem sie eine Regulation von IL-6 durch die mikroRNA belegten. Die Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen weist eine erhöhte Konzentration von IL-6 auf, es wird sogar ein positiver Zusammenhang zwischen Anzahl und Größe roter (also aktiver) Endometrioseläsionen und der Konzentration von IL-6 in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen angenommen (Iwabe, T. et al., 2000).

In unseren Studien zeigte sich, dass der Rezeptor des Entzündungsmodulators IL-6 in den miR-142-3p-transfizierten Zellen herunterreguliert war. Dies könnte zu einer verminderten Reaktion der Zellen auf IL-6 führen.

Wie bereits im Einleitungsteil beschrieben, wirken Zytokine stimulierend auf die Endometrioseherde. Durch eine Herunterregulierung des entsprechenden Rezeptors könnte langfristig die Entzündungsaktivität in Endometrioseläsionen reduziert werden.

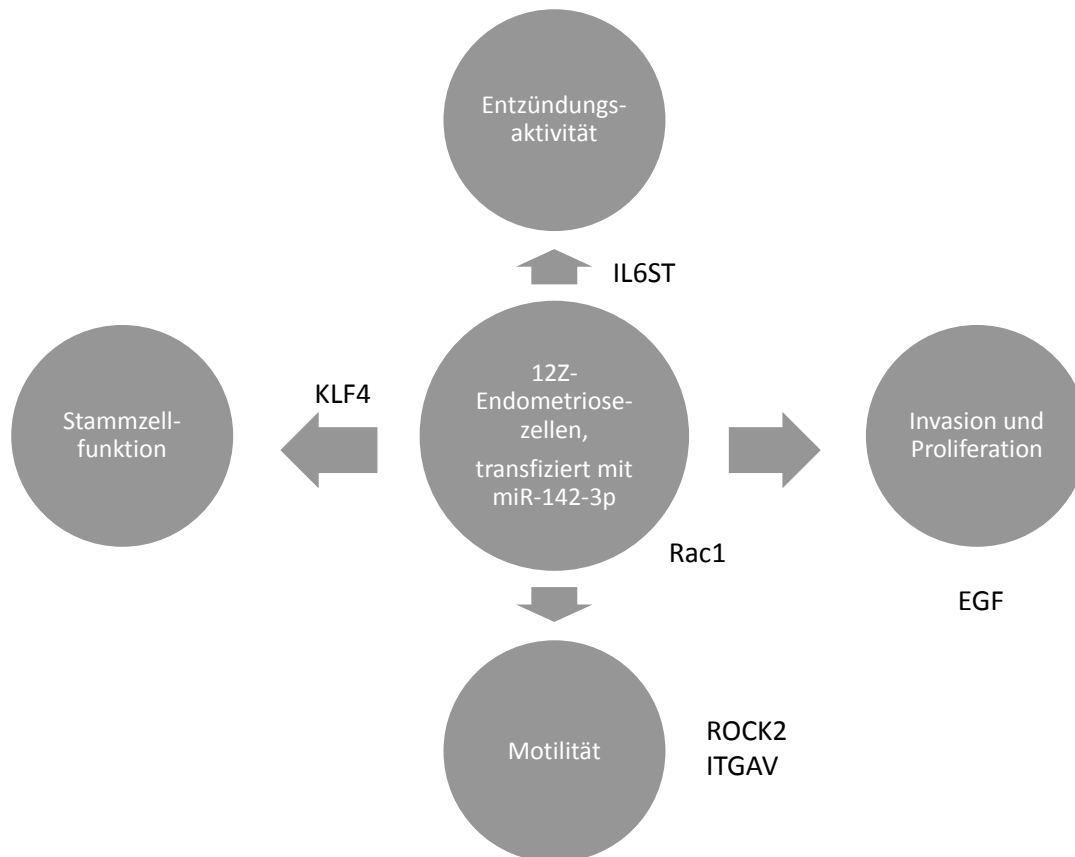
Auch der Zelladhäsionsrezeptor *ITGAV* wurde durch die Transfektion mit miR-142-3p signifikant herunterreguliert. *ITGAV* moduliert ebenfalls Zytoskelett und



Zellbeweglichkeit und könnte so die Entstehung einer Endometriose begünstigen (Fu, G. et al., 2012). Im Rahmen der Krebsforschung (in diesem Fall Ovarial-Karzinom) wurde ebenfalls gezeigt, dass die Überexpression von mikroRNAs zu einer Herunterregulation von *ITGAV* führt (Ohyagi-Hara, C. et al., 2013).

*KLF4* ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der Stammzellfunktion eine wichtige Rolle spielt (Parasramka, MA. et al., 2012) (Takahashi, K. et al., 2006). Im Gegensatz zu der hiesigen Arbeitsgruppe, die zeigte, dass *KLF4* durch die Transfektion der Zellen mit miR-145 herunterreguliert wird, zeigte sich im Zuge unserer Experimente durch die Transfektion mit miR-142-3p eine signifikant gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors. Für die Theorie, dass das Endometrium eine Stammzellaktivität aufweist, gibt es bereits entscheidende Beobachtungen. So wurde zum Beispiel der klonale Ursprung endometrialer Drüsen nachgewiesen (Sassona, IE. et al., 2008), es wurde Nachweis über die Expression verschiedener Markerproteine, die für Stammzellen typisch sind, erbracht und ein hohes Differenzierungspotenzial der Zellen des Endometriums beobachtet (Sassona, IE. et al., 2008), (Götte, M. et al., 2008) (Gargett, CE. et al., 2009). Eine Dysfunktion der Stammzellfunktion korreliert mit den verschiedenen Theorien zur Ätiologie der Endometriose. Die von uns beschriebene veränderte Expression von *KLF4* unterstützt eben diese Theorie, nämlich dass die Auswirkung auf die Stammzellfunktion die Entstehung einer Endometriose begünstigt.

Eine zusammenfassende Darstellung der Auswirkung der Transfektion mit miR-142-3p auf das Zellverhalten von 12Z-Endometriosezellen auf Genebene ist Abbildung 17 zu entnehmen.



**Abbildung 17: Auswirkungen der veränderten Expression der Zielgene auf das Zellverhalten von mit miR-142-3p-transfizierten 12Z-Zellen**

In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnten wir die Auswirkungen der Transfektion mit miR-142-3p auf die zytoskelettalen Eigenschaften der 12Z-Zellen nur bedingt nachweisen. So zeigte sich bei den mit Fibronectin beschichteten Deckgläschen kein eindeutiger Unterschied zwischen Kontrollzellen und den mit miR-142-3p transfizierten Zellen bezüglich der Ausbildung von fokalen Kontakten und Aktin-Stressfasern. Bei den mit Laminin beschichteten Deckgläschen jedoch konnte in dieser Hinsicht ansatzweise ein Unterschied zwischen Kontrollzellen und miR-142-3p-transfizierten Zellen festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte durch die veränderte Regulation des Zelladhäsionsrezeptors Integrin alpha V, der durch die Transfektion von miR-142-3p signifikant herunterreguliert wird (Abb. 13), bedingt sein. Dass sich diese Veränderung auf dem Fibronectin-Substrat nicht widerspiegelt, könnte

daran liegen, dass der Effekt von dem Matrix-Substrat abhängig ist. Diese Erkenntnisse ergänzen unsere Beobachtungen bei der Durchführung von Invasionsassays; hierbei zeigte sich ein signifikant gesteigertes Invasionsverhalten bei den mit miR-142-3p transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das in dieser Versuchsreihe verwendete Matrigel enthält als einen Hauptbestandteil Laminin (jedoch kein Fibronectin), somit könnte ein Zusammenhang zwischen der in der Immunfluoreszenz beobachteten veränderten Lokalisation der fokalen Kontakte und dem gesteigerten Invasionsverhalten vermutet werden.

Diese Beobachtungen sollten jedoch aufgrund der sehr heterogenen Darstellung des Zytoskeletts mit Bedacht interpretiert und als Tendenz angesehen werden.

Eine detailliertere Untersuchung der zytoskelettalen Struktur in miR-142-3p-transfizierten Zellen, die auf unterschiedlichen extrazellulären Matrix-Substraten kultiviert wurden, erscheint in zukünftigen Studien lohnenswert.

#### **4.1.1 Diagnostischer und therapeutischer Ausblick**

Nun stellt sich die Frage, ob die oben beschriebenen neuen Erkenntnisse die Diagnostik und Therapie der Endometriose weiter vorantreiben. Die Diagnostik der Endometriose ist zum Teil langwierig und erfordert in den meisten Fällen eine Laparoskopie, um die Diagnose endgültig zu sichern (s.o.). Für die Zukunft wäre es hilfreich, wenn man die Diagnose mittels nicht-invasiver Serum-Marker stellen könnte. Dies würde zumindest einem Teil der Patientinnen die Operation ersparen und eventuell die Zeit bis zur Diagnosestellung wesentlich verkürzen. Wir haben im Rahmen dieser Arbeit zwar nur einen kleinen Ausschnitt der predicted targets der miR-142-3p untersucht und es könnte noch weitere Faktoren geben, die die verschiedenen Signalwege und Wirkweisen der Endometriosezellen beeinflussen. Dennoch haben wir eben jene beschriebenen Faktoren gefunden. Diese Faktoren und miRNAs im Allgemeinen weiter

hinsichtlich ihrer möglichen Funktion als Serum-Marker zu untersuchen bietet einen neuen, interessanten und umfangreichen Forschungsansatz.

Es gibt zwei Therapiearme der Endometriose, den medikamentösen und den operativen (s.o.). Vordergründig sind dabei die Schmerzreduktion, eine Verringerung der Rezidivrate und das Erzielen des Rückgangs bereits vorhandener Endometrioseläsionen. Einen Ansatz, die Erkrankung in ihren Ursprüngen zu heilen, gibt es bislang noch nicht, zumindest nicht beim Menschen. Die Hemmung von miRNAs scheint hier ein plausibler und verlockender Ansatz zu sein. Im Tiermodell zeigten sich bereits interessante therapeutische Erfolge; hier bekamen Affen intravenös miRNA-Antagonisten appliziert, was über einen Abbau von miR-122 zu einer dosisabhängigen Reduktion des Plasma-Cholesterinspiegels führte (Elmén, J. et al., 2008). Beim Menschen sollte man mit der Anwendung von miRNA-Inhibitoren jedoch vorsichtig sein. Das Problem ist, dass die miRNAs viele verschiedenen Zielgene steuern und somit auch viele verschiedene Effekte, zum Teil unspezifisch, zu erwarten sind. Es ist kaum möglich, diese Vielzahl von Effekten zu überblicken, sodass durch die Hemmung der miRNAs eine große Zahl an unerwünschten Wirkungen zu erwarten ist. Dies resultiert in dem Appell, bei der Testung und Anwendung von miRNA-Inhibitoren zurückhaltend zu sein. Bevor diese auch beim Menschen angewendet werden, sollte noch viel Forschung in diesem bislang recht unerforschten Gebiet betrieben werden.

## **4.2 Kritische Beurteilung des Studienaufbaus**

In den zusammengefassten Studien der Publikationen von Neubauer et al. und Ohlsson Teague et al. ist die miR-142-3p in Gewebe von Endometriosepatientinnen herunterreguliert (Neubauer & al., 2012), (Ohlsson Teague, EMC. et al., 2009). In unseren Studien führte eine experimentelle Hochregulation zu einem invasiveren Zellverhalten. Dies könnte als Widerspruch gedeutet werden. Dieser vermeintliche Widerspruch kann dadurch erklärt werden, dass wir in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Arbeit in der Zellkultur nur epitheliale Zellen für die Experimente verwendet haben. Die

Arbeitsgruppe Ohlsson Teague et al. jedoch arbeitete mit klinischen Proben, die demzufolge ein gemischtes Zellbild aufweisen. Als solche enthielten die Proben zusätzlich Gewebe, Stroma und Leukozyten. Diese Erkenntnis könnte ein unterschiedliches Zellverhalten und somit die abweichende Expression der miR-142-3p in den Endometriosezellen erklären. Des Weiteren kann man die Diskrepanz dadurch erklären, dass wir in unseren Experimenten durch die Transfektion eine extrem hohe Überexpression der miR-142-3p induziert haben. Dieses hohe Maß an Überexpression ist in einem in-vitro-System zwar zu realisieren, spiegelt jedoch nicht die physiologischen Verhältnisse, wie sie in unserem Körper vorherrschen, wider.

Dennoch haben wir im Rahmen dieser Dissertation mit unseren Experimenten valide neue Erkenntnisse bezüglich der Endometrioseforschung gewonnen. So konnten wir mithilfe verschiedener Experimente das regulatorische Potential von miRNAs belegen, und wir haben herausgefunden, welche Prozesse durch die Regulation der miR-142-3p beeinflusst werden. Wir konnten einen Einfluss der miR-142-3p auf die Invasivität und Motilität von 12-Z-Endometriosezellen sowie auf verschiedene Zielgene nachweisen. An dieser Stelle sei zu erwähnen, dass die miR-142-3p laut Datenbanken noch viele weitere Zielgene potentiell reguliert, die wir aus finanziellen und Zeitgründen jedoch nicht untersucht haben. Dies könnte im Sinne weiterer Forschungsarbeit erfolgen. Des Weiteren könnte man die Fallzahlen erhöhen (z.B. bei der Videomikroskopie) oder andere Experimente anwenden (Nachweise auf Proteinebene), um die Erkenntnisse zu festigen und auszubauen. So könnte mithilfe eines Luziferase-Assays zusätzlich spezifisch gezeigt werden, dass die Wirkung der miR-142-3p auf die Ziel-mRNA-Expression über die 3'-untranslatierte Region erfolgt. Für die Targets *ROCK2* (Nishiyama, T. et al., 2012) und *Rac1* (Wu, L. et al., 2011) wurde dies in der Vergangenheit schon gezeigt. Aus Kosten- und Zeitgründen war uns dies jedoch leider nicht möglich. Dies sollte Bestandteil weiterer Untersuchungen in der Zukunft sein.

Kritisch zu bemerken sei ebenfalls die Tatsache, dass in unseren Experimenten lediglich eine einzige Zelllinie, nämlich die immortalisierte 12Z-

Endometriosezelllinie, verwendet wurde. So kann man nicht ausschließen, dass die durch uns erlangten Erkenntnisse nicht von der Zelllinie abhängig sind und man eventuell bei denselben Experimenten mit einer anderen Zelllinie zu anderen Ergebnissen kommen würde. Neben einer anderen Zelllinie könnte man ebenfalls die Verwendung einer Primärkultur in Betracht ziehen. Nachteile der Primärkultur sind jedoch die eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit, die Unmöglichkeit der langfristigen Kultivierbarkeit und die limitierte Verfügbarkeit von Patientenproben. Auch spiegelt wie bereits erwähnt die von uns durch Transfektion erreichte Konzentration an miR-142-3p nicht die physiologischen Bedingungen wider, sodass Rückschlüsse auf Prozesse in vivo nur bedingt möglich sind.

Einige der Veränderungen des Zellverhaltens, die durch die Transfektion der Zellen mit miR-142-3p bedingt sind, passen zu unserem heutigen Krankheitsverständnis und der Pathologie der Endometriose, einige jedoch auch nicht. Dies zeigt wiederum deutlich, wie komplex dieses Thema ist und dass noch viel Forschungsarbeit nötig ist, um dieses bedeutsame Krankheitsbild vollständig zu erfassen.

### **4.3 Fazit**

Die Endometriose ist eine häufige benigne Erkrankung der geschlechtsreifen Frau, deren Pathogenese noch immer nicht vollständig erfasst ist. Die im Rahmen meiner Dissertationsarbeit erlangten neuen Erkenntnisse belegen die Bedeutung von miRNAs bei der Pathogenese und ihr mögliches therapeutisches Potential bei dem Krankheitsbild Endometriose.

Wir haben im Rahmen unserer Arbeit gezeigt, dass die miR-142-3p verschiedene Prozesse reguliert, die für die Endometriose wichtig sind. Hierbei wurden durch die forcierte Überexpression der miR-142-3p in den Endometriosezellen einige Prozesse, die die Endometriose begünstigen, verstärkt, andere wiederum wurden gehemmt. Dies zeigt abermals die Komplexität der im Rahmen der Endometriose beteiligten Prozesse in vivo.

Zukünftig könnten auf dieser Arbeit aufbauend weitere mikroRNAs und ihre targets auf ihr regulatorisches Potential hin untersucht werden, um die bislang lückenhaften Erkenntnisse bezüglich Pathogenese der Endometriose zu vervollständigen und weitere Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten zu erlangen.

## 5 Literaturverzeichnis

Adammek, M. et al. (2013). MicroRNA miR-145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors. *Fertil Steril*, 99(5), S. 1346-1355.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. (2010). *www.awmf.org*. Abgerufen am 29. März 2013 von <http://leitlinien.net>.

Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), S. 281-297.

Betel, D., et al. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research*, 36, S. 149-153.

Bissels, U., et al. (2011). Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 29(5), S. 847-57.

Breyer, J., et al. (2011). Inhibition of Rho kinases increases directional motility of microvascular endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 83(5), S. 616-626.

Bulun, SE. (2009). Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, 360(3), S. 268-279.

Burney, R., et al. (2009). MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.*, 15(10), S. 625-31.

Chen, C. et al. (2004). MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science*, 303(5654), S. 83-86.



- Chen, WC et al. (2012). microRNA expression pattern and its alteration following celecoxib intervention in human colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine*, 3(6), S. 1039–1048.
- Dunn, GA. et al. (1987). A unified approach to analysing cell motility. *Journal of cell science. Supplement*, 8, S. 81-102.
- Elmén, J. et al. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, 452(7189), S. 896-9.
- Faculty of Life Sciences, Univ. of Manchester. (2012). *miRBase*. Abgerufen am 07. August 2012 von <http://www.mirbase.org>
- Fu, G. et al. (2012). *Integrin and Cell Adhesion Molecules*. Humana Press.
- Gargett, CE. et al. (2009). Isolation and Culture of Epithelial Progenitors and Mesenchymal Stem Cells from Human Endometrium. *Biology of Reproduction*, 80(6), S. 1136-45.
- Gilabert-Estelles, J. et al. (2012). Role of microRNAs in Gynecological Pathology. *Current medicinal chemistry*, 19(15), S. 2406-2413.
- Giudice, LC. (2004). Endometriosis. *The Lancet*, 364(9447), S. 1789–1799.
- Götte, M. (2010). MicroRNAs in breast cancer pathogenesis. *Minerva Ginecologica*, 215(3), S. 559-71.
- Götte, M. et al. (2008). Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. *Journal of Pathology*, 62(6), S. 317-29.
- Götte, M. et al. (2010). miR-145-dependent targeting of Junctional Adhesion Molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene*, 29(50), S. 6569-6580.

- Grechukhina, O. et al. (2012). A polymorphism in a let-7 microRNA binding site of KRAS in women with endometriosis. *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), S. 206-217.
- Haag, P. et al. (2010/11). *Gynäkologie und Urologie*. Breisach/Rh.: Medizinische Verlags- und Informationsdienste.
- Helgason et al. (2013). *Basic Cell Culture Protocols; Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
- Higuchi, R. et al. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)*, 11(9), S. 1026-30.
- Iwabe, T. et al. (2000). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promotes Proliferation of Endometriotic Stromal Cells by Inducing Interleukin-8 Gene und Protein Expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(2), S. 824-829.
- Kiechle, M. (2011). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- Kong, W. et al. (2009). Strategies for profiling MicroRNA expression. *Journal of Cellular Physiology*, 218(1), S. 22-25.
- Kuhn, D. et al. (2008). Experimental validation of miRNA targets. *Methods*, 44(1), S. 47-54.
- Lai, EC. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*, 131(5), S. 965-973.
- Lee, RC. et al. (1993). The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), S. 843-54.
- Life Technologies Corporation. (2012). *mRNA & Long Non-Coding RNA Assay Search Tool*. Abgerufen am 4. Juni 2011 von

<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html>

- Livaka, KJ. et al. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), S. 402-408.
- Luong, HTT. et al. (2012). No evidence for genetic association with the let-7 microRNA-binding site or other common KRAS variants in risk of endometriosis. *Human Reproduction*, 27(12), S. 3616-3621.
- Lv, M. et al. (2012). An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nature*, 26(4), S. 769–777.
- Megraw, M. et al. (2006). miRGen: A database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Research*, 35, S. 149-155.
- Megraw, M. et al. (2007). miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleid Acids Research*, 35, S. 49-55.
- Neubauer, C., & al., e. (2012). MicroRNAs and the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Endometriosis*, 4 (1), S. 1-16.
- Nishiyama, T. et al. (2012). miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(4), S. 755–761.
- Ohlsson Teague, EMC. et al. (2009). MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis. *Mol Endocrinol*, 23(2), S. 265-75.
- Ohlsson Teague, EMC. et al. (2010). The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Human Reproductive Update*, 16(2), S. 142-165.

- Ohyagi-Hara, C. et al. (2013). miR-92a Inhibits Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells by Inhibiting Integrin  $\alpha 5$  Expression. *The American Journal of Pathology*, 182(5), S. 1876-89.
- Olive, DL. (2008). Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists for Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, 359(11), S. 1136-1142.
- Pan, Q. et al. (2007). The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Molecular human reproduction*, 13(11), S. 797-806.
- Parasramka, MA. et al. (2012). A role for low-abundance miRNAs in colon cancer: the miR-206/Krüppel-like factor 4 (KLF4) axis. *Clinical Epigenetics*, 4(1):16.
- Reinhart, BJ. et al. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), S. 901-906.
- Salhia, B. et al. (2005). Inhibition of Rho-Kinase Affects Astrocytoma Morphology, Motility, and Invasion through Activation of Rac1. *American Association for Cancer Research*, 65(19), S. 8792-8800.
- Sassona, IE. et al. (2008). Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, S. 106-115.
- Schiebler, TH. et al. (2002). *Anatomie*. Springer.
- Schröterová, L. et al. (2009). Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicology in Vitro*, 23(7), S. 1406–1411.
- Stauber, M. et al. (2005). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

- Steffanson, H. et al. (2001). Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Human Reproduction*, 17(3), S. 555-559.
- Stock, C. et al. (2005). Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *The Journal of Physiology*, 567, S. 225-238.
- Sun, Y. et al. (2011). Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood*, 117(23), S. 6172-83.
- Takahashi, K. et al. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), S. 663-76.
- Toloubeydokhti, T. et al. (2008). The Expression and Ovarian Steroid Regulation of Endometrial Micro-RNAs. *Reproductive Sciences*, 15(10), S. 993-1001.
- Ulfig, N. (2011). *Kurzlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Von Rokitansky, C. (1860). Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus and Ovarilsarkomen. *Zeitung der Gesellschaft der Aerzte Wien*, 37, S. 577-593.
- Wang, XS. et al. (2012). MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Blood*, 119(21), S. 4992-5004.
- Wienholds, E. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters*, 579(26), S. 5911–5922.
- Wightman, B. et al. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C.elegans*. *Cell*, 75(5), S. 855-862.

- Wiley Information Services GmbH. (2013). *ChemgaPedia*. Abgerufen am 12. Juni 2013 von <http://www.chemgapedia.de/vsengine/glossary/de/immunfluoreszenzmikroskopie.glos.html>
- Wu, L. et al. (2011). MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration. *FEBS Letters*, 585(9), S. 1322–1330.
- Yamamura, K. et al. (2007). Notch ligand Delta-1 differentially modulates the effects of gp130 activation on interleukin-6 receptor alpha-positive and -negative human hematopoietic progenitors. *Cancer Science*, 98(10), S. 1597-1603.
- Zeitvogel, A. et al. (2001). Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *American Journal of Pathology*, 159(5), S. 1839-52.



## **7 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Martin Götte für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die herausragende und umfassende Betreuung und die stets prompte kritische Durchsicht und Verbesserung meiner Manuskripte. Außerdem bedanke ich mich bei dem Laborteam der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, insbesondere bei Frau Birgit Pers und Frau Kathrin Brüggemann, für die gute Einarbeitung und technische Assistenz.

Herrn Christian Stock danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Videomikroskopie. Ohne seine Hilfe und das zur Verfügung stellen der Räumlichkeiten des Instituts für Physiologie in Münster wäre mir diese Versuchsreihe nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Freund David, der mir bei der Gestaltung der Grafiken große Hilfe geleistet hat.

Der umfassendste Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für ihre stete Unterstützung und die Ermöglichung dieses wunderbaren Studiums.